

Université de Montréal

**Le rôle des importines dans le ciblage à la membrane nucléaire interne de la glycoprotéine M  
de l'herpès simplex de type 1**

*Par*

Catherine Vandal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M. sc.)  
en microbiologie et immunologie

Novembre 2020

© Catherine Vandal, 2020



Université de Montréal

Département de microbiologie, immunologie et infectiologie, Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Le rôle des importines dans le ciblage à la membrane nucléaire interne de la glycoprotéine M  
de l'herpès simplex de type 1**

*Présenté par*

**Catherine Vandal**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Nicolas Chomont**

Président-rapporteur

**Roger Lippé**

Directeur de recherche

**Daniel Zenklusen**

Membre du jury

## Résumé

La glycoprotéine M (gM) est une protéine virale transmembranaire qui est conservée dans la famille des *Herpesviridae*. Malgré son rôle non essentiel *in vitro* chez la plupart des virus de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, dont l'herpès simplex de type 1 (VHS-1), gM est impliquée à plusieurs étapes de leur cycle viral et sa déplétion entraîne une diminution de la production virale. Pour effectuer ses diverses fonctions, gM est ciblée dynamiquement à plusieurs compartiments cellulaires au cours de l'infection, dont le noyau, le réseau trans-Golgi et la membrane plasmique. Chez le VHS-1, gM est la première glycoprotéine détectée aux membranes nucléaires, et ce, dès 4 heures après le début de l'infection. Des expériences effectuées précédemment dans notre laboratoire ont démontré que la localisation de gM au noyau à 4hpi est un processus actif, viral-dépendant et spécifique qui succède sa traduction au réticulum endoplasmique. Or, sa fonction au noyau n'est toujours pas élucidée, ni le mécanisme lui permettant d'atteindre ce compartiment tôt durant l'infection. D'ailleurs, aucun des partenaires d'interaction connus de gM n'a été identifié comme participant à ce ciblage, soulevant des questions quant au mécanisme utilisé par la glycoprotéine virale pour atteindre le noyau. Notre hypothèse est que gM emprunte le transport nucléocytoplasmique de la cellule pour être activement ciblée à la membrane nucléaire interne par l'intermédiaire des importines.

Afin d'étudier le rôle des importines dans la localisation de gM tôt dans l'infection, chaque importine a été déplétée par ARN interférent dans des cellules 143B. À la suite d'une infection de 4h, la localisation de gM a été déterminée par microscopie confocale suivie d'analyses qualitatives en 2D et en 3D. Les résultats obtenus suggèrent que les importines ne participent pas significativement au ciblage de gM aux membranes nucléaires à cette étape de l'infection. Ces observations ouvrent la porte à d'autres mécanismes de transport qui devront être étudiés afin de mieux comprendre le ciblage de gM à ce compartiment et, éventuellement, y déterminer son ou ses rôles dans le cycle viral de l'herpès.

**Mots-clés** : VHS-1, glycoprotéine M, transport nucléocytoplasmique, importines, membranes nucléaires, protéines transmembranaires, microscopie confocale, ARN interférents.



## Abstract

Glycoprotein M (gM) is a viral transmembrane protein that is conserved in the *Herpesviridae* family. Despite its non-essential role *in vitro* in most viruses of the *Alphaherpesvirinae* subfamily, including herpes simplex virus type 1 (HSV-1), gM is involved at several stages of their viral cycle and its depletion leads to a decrease in viral production. To perform its various functions, gM is dynamically targeted to several cellular compartments during infection, including the nucleus, the trans-Golgi Network and the plasma membrane. In HSV-1, gM is the first glycoprotein detected at nuclear membranes as early as 4 hours after the onset of infection. Previous experiments conducted in our laboratory have shown that the localization of gM to the nucleus at 4hpi is an active, viral-dependent and specific process that follows its translation at the endoplasmic reticulum. However, its function at the nucleus is still not elucidated, nor is the mechanism by which it reaches this compartment early during infection. Moreover, none of gM's known interacting partners have been identified as participants in this targeting, raising questions about the mechanism used by the viral glycoprotein. Our hypothesis is that gM takes advantage of the nucleocytoplasmic transport of the cell to be actively targeted to the inner nuclear membrane via importins.

In order to study the role of the importins in the localization of gM early in the infection, each importin was depleted by interfering RNA in 143B cells. After a 4-hour infection, gM localization was determined by confocal microscopy followed by 2D and 3D qualitative analysis. The results obtained from these experiments suggest that importins do not significantly participate in the targeting of gM to nuclear membranes at 4hpi. These observations open the door to other transport mechanisms that will need to be studied in order to better understand the targeting of gM to this compartment and to eventually determine its role(s) in the herpes viral cycle.

**Keywords:** HSV-1, glycoprotein M, nucleocytoplasmic transport, importins, nuclear membranes, transmembrane proteins, confocal microscopy, interfering RNA.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xv
Chapitre 1 – Introduction.....	1
1.1 L'herpès simplex de type 1.....	1
1.1.1 Historique.....	1
1.1.2 Classification.....	2
1.1.3 Maladies et traitements.....	3
1.1.4 Intérêts du VHS-1 en recherche.....	7
1.1.5 Structure du VHS-1.....	8
1.1.6. Cycle viral.....	11
1.2 Glycoprotéine M du VHS-1.....	24
1.2.1 gM chez les <i>Herpesviridae</i> .....	24
1.2.2 Gène et structure protéique.....	25
1.2.3 Maturation de gM.....	26
1.2.4 Fonctions de gM.....	26
1.3 Le transport nucléocytoplasmique des protéines.....	29
1.3.1 Transport nucléocytoplasmique des protéines solubles.....	29

1.3.2 Transport nucléocytoplasmique des protéines membranaires.....	43
1.3.3 Détournement viral du transport nucléocytoplasmique .....	50
Chapitre 2 – Objectif et hypothèse de recherche.....	52
Chapitre 3 – Matériels et méthodes .....	53
3.1 Cellules et virus .....	53
3.2 Anticorps .....	53
3.3 Analyse de la séquence protéique de gM et de Kpn $\alpha$ 4 .....	54
3.4 Production de plasmides pour CRISPR.....	54
3.5 Transfection des plasmides eSpCAS9.....	56
2.11 Immunobuvardage .....	56
3.6 Transfection des DsiRNA .....	57
3.7 Viabilité cellulaire .....	58
3.8 Infection .....	58
3.9 Immunofluorescence et localisation cellulaire de gM .....	59
3.10 Analyse 3D.....	60
3.11 Extraction d'ARN et RT-qPCR .....	61
3.12 Statistiques .....	62
Chapitre 4 – Résultats .....	63
4.1 Analyse de la séquence protéique de gM.....	63
4.2 Déplétion des importines ciblées par DsiRNA.....	64
4.3 Effet des importines sur la localisation de gM par analyse confocale en 2D .....	69
4.4 Mise en place d'une méthode de quantification relative par microscopie confocale en 3D .....	76
Chapitre 5 – Discussion .....	81



5.1 Les importines dans le cycle viral du VHS-1 .....	81
5.2 Les importines dans la localisation de gM à 4hpi .....	82
5.2.1 La redondance du transport nucléocytoplasmique .....	84
5.3 Les mécanismes alternatifs du ciblage de gM à la MN .....	85
5.3.1 Le mécanisme de diffusion-rétention .....	85
5.3.2 Le « Piggybacking » .....	86
5.3.3 Le mécanisme dépendant d'un INM-SM .....	86
5.3.2 Les mécanismes indépendants des importines .....	87
Chapitre 6 – Conclusion.....	89
Références bibliographiques.....	91
Annexes .....	121

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> –	Description des 9 HHV et des principales maladies qui leurs sont associées .....	3
<b>Tableau 2.</b> –	Nomenclature des karyophérines- $\beta$ médiant l'import de cargos .....	35
<b>Tableau 3.</b> –	Nomenclature des karyophérines- $\alpha$ retrouvées chez l'humain.....	37
<b>Tableau 4.</b> –	Séquences utilisées pour produire les ADNdb codant pour l'ARNg.....	56
<b>Tableau 5.</b> –	Séquences utilisées pour cibler l'ADNc lors de la qPCR .....	62
<b>Tableau 6.</b> –	Nomenclature des gènes du VHS-1 et des protéines y étant associées .....	121



## Liste des figures

Figure 1.	Structure d'un virion du VHS-1. ....	8
Figure 2.	Structure du génome viral. ....	9
Figure 3.	Reconstitution d'un virion par microscopie électronique cryogénique. ....	9
Figure 4.	Représentation schématique des principales étapes du cycle lytique du VHS-1. ....	13
Figure 5.	Mécanisme d'entrée du VHS-1 dans une cellule. ....	14
Figure 6.	Mécanisme de la réplication du génome viral. ....	18
Figure 7.	Étapes menant à la formation d'une capsid. ....	19
Figure 8.	Représentation schématique des 4 types de capsides produites par le VHS-1 et leurs principales composantes. ....	20
Figure 9.	Principales étapes de la sortie virale selon le modèle du double enveloppement. ....	22
Figure 10.	Représentation schématique de la structure de gM. ....	26
Figure 11.	La membrane nucléaire et ses principales composantes. ....	30
Figure 12.	Représentation schématique d'un pore nucléaire inséré dans la membrane nucléaire. ....	32
Figure 13.	Structure de Kpn $\beta$ 1 et de ses répétitions HEAT. ....	36
Figure 14.	Structure et domaines de l'importine- $\alpha$ . ....	39
Figure 15.	Rôles du domaine IBB dans la voie d'import classique. ....	40
Figure 16.	Représentation du cycle d'import d'un cargo et du recyclage subséquent des importines. ....	42
Figure 17.	Les principaux modèles de transport des PTM à la MNI. ....	45
Figure 18.	Comparaison des structures de l'importine- $\alpha$ et de l'importine- $\alpha$ -16. ....	49
Figure 19.	Représentation schématique des 4 calques utilisés pour l'analyse 3D. ....	61
Figure 20.	La séquence protéique de gM possède 1 SLN et 4 INM-SM présumés. ....	64
Figure 21.	Les DsiRNA utilisés contre Kpn $\alpha$ 4 ciblent aussi ses deux isoformes. ....	66
Figure 22.	La déplétion de Kpn $\beta$ 1 et IPO4 n'est pas affectée par une diminution de la concentration des DsiRNA, mais celles-ci conservent leur efficacité. ....	67

**Figure 23. La déplétion par ARN interférent affecte légèrement la viabilité cellulaire, mais offre une déplétion efficace des importines. ....68**

**Figure 24. Le taux d'infection est variable entre les différentes conditions étudiées.....70**

**Figure 25. Les contrôles testés n'affectent pas visuellement la localisation de gM au noyau à 4hpi.....71**

**Figure 26. Les importines- $\beta$  n'affectent pas visuellement la localisation de gM au noyau à 4hpi.....74**

**Figure 27. TNPO2, IPO13 et Kpn $\alpha$ 6 semblent affecter légèrement la localisation de gM.....76**

**Figure 28. Les techniques d'analyse de la MP et de la MP artificielle sont similaires et permettent d'associer le signal de gM à la cellule correspondante.....77**

**Figure 29. Les importines testées n'affectent pas significativement la distribution de gM dans la cellule lors d'une analyse 3D.....78**

## Liste des sigles et abréviations

aa : Acide aminé

AB HS : AlamarBlue High-Sensitivity

ARNi : ARN interférent

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine triphosphate

CVSC : Anglais pour « *Capsid Vertex Specific Component* »

DTM : Domaine transmembranaire

FG : Phénylalanine-Glycine

gM : Glycoprotéine M

GDP : Guanosine diphosphate

GTP : Guanosine triphosphate

HHV : Anglais pour « *Human Herpes virus* »

Hpi : Heures post-infection

HSPG : Protéoglycane à héparane sulfaté

ICP : Anglais pour « *Infected Cell Protein* »

Imp $\beta$ s : Importines bêta

Kb : Kilobase

KDa : KiloDalton

Kp $\alpha$  : Karyophérine alpha

Kp $\beta$  : Karyophérine bêta

LBR : Anglais pour « *Lamin B Receptor* »

MN : Membrane nucléaire

MNI : Membrane nucléaire interne

MNE : Membrane nucléaire externe

MOI : Anglais pour « *Multiplicity Of Infection* »

NEC : Anglais pour « *Nuclear Egress Complex* »

NUP : Nucléopore

PTM : Protéine transmembranaire  
RE : Réticulum endoplasmique  
RTN : Récepteur de transport nucléaire  
SEN : Signal d'export nucléaire  
SLN : Signal de localisation nucléaire  
SLNc : Signal de localisation nucléaire classique  
SNC : Système nerveux central  
TGN : Anglais pour « *Trans-Golgi Network* »  
VHS-1 : Virus de l'Herpès Simplex de type 1  
VHS-2 : Virus de l'Herpès Simplex de type 2  
VP : Anglais pour « *Viral Protein* »

*À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.*





## Remerciements

Enfin! Cette grande épopée, que sont les études supérieures, tire finalement à sa fin. C'est avec soulagement, mais aussi avec une reconnaissance infinie, que je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail; je n'y serais jamais arrivée sans vous.

Je tiens premièrement à remercier mon directeur de maîtrise, le **Dr Roger Lippé**, de m'avoir accueilli non pas une fois, mais deux fois au sein de son laboratoire. Un stage et une maîtrise, ça fait beaucoup de temps à m'endurer!

Un autre ÉNORME merci à tous les étudiants du laboratoire; **Hugo, Kendra, Mackenzie, Josiane, Christopher, Jonas et Bitá**. Une équipe de feu, composée de personnes extraordinaires possédant chacune une personnalité attachante et un amour profond pour la science, qui a rendu cette aventure mémorable. Je n'oublierai jamais les sessions de danse au milieu du laboratoire avec Mackenzie ou le dépanneur maintenu par Mayerline. Je souhaite adresser un merci tout particulier à Bitá, dont les connaissances et l'expérience ont été d'une grande aide tout au long de mon parcours.

Merci à nos deux responsables de laboratoire, nos anges gardiennes, **Johanne et Marie-Josée**. Votre présence a été et est indispensable pour tous les étudiants et le laboratoire. Vos connaissances, votre aide précieuse, vos encouragements et votre bonne humeur contagieuse ont fait toute la différence! Merci. Merci. Merci!

J'aimerais prendre le temps de mentionner **Elke et Philippe**, sans qui ce projet aurait été impossible! Ils ont répondu à mes questions incessantes tout au long de ma maîtrise et ont joué un rôle indispensable dans le développement de mes compétences en matière de qPCR et de microscopie. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions, jour après jour, semaine après semaine, avec toujours le même entrain et une passion palpable envers la science.

Un autre remerciement tout spécial à **Joseph**. Merci de m'avoir écouté, de m'avoir encouragé et de m'avoir conseillé avec ta bonne humeur indestructible et ta logique implacable. Nos débats et discussions m'ont été d'une grande aide pour boucler ce projet de maîtrise.

Je ne peux pas écrire des remerciements sans mentionner mes chères et précieuses amies; **Maëilly, Sandra et Catherine**. Vous m'avez écouté parler et reparler de la science sans arrêt depuis le secondaire... et ce n'est pas terminé! Merci tout simplement d'être dans ma vie depuis maintenant plus de dix ans; je vous aime d'un amour inconditionnel!

J'aimerais terminer ces remerciements en exprimant toute ma gratitude envers deux personnes exceptionnelles et très spéciales (à mon humble opinion); mes parents. **Maman et Papa**, merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir accompagné au travers de toutes ces années d'études. 20 ans à m'aider à étudier, à me reconforter, à me cuisiner de bons petits plats, ça ne s'oublie pas... Aucun mot n'est assez puissant pour vous communiquer toute la gratitude et le respect que j'ai envers vous. Je vous aime.

Pour terminer, il ne me reste plus qu'une seule chose à vous dire...

**J'ai fini!**

# Chapitre 1 – Introduction

Les virus sont des organismes se situant à la limite des domaines du vivant et du non-vivant et leur classification fait l'objet d'un grand nombre de débats dans la communauté scientifique [1-4]. Ces micro-organismes sont composés d'un manteau protéique nommé « capsid » protégeant le matériel génétique qui est retrouvé sous forme d'ADN ou d'ARN. Certains possèdent une couche externe additionnelle, l'enveloppe, qui est dérivée des membranes de la cellule hôte infectée [5]. À titre de parasites obligatoires, les virus ne possèdent pas la totalité de la machinerie nécessaire à leur réplication et doivent donc infecter un hôte pour se répliquer [6]. D'ailleurs, la majorité des organismes cellulaires connus jusqu'à ce jour, tant les bactéries que les archées et les cellules eucaryotes, peuvent être infectés par un ou des virus [7]. Il a même été découvert que des virus géants pouvaient être infectés par d'autres virus [8]. Des études métagénomiques soutiennent que les virus sont les micro-organismes les plus abondants dans l'environnement et qu'ils ont joué et jouent toujours un rôle central dans l'évolution [7, 9]. Parmi tous ces virus, certains sont des pathogènes importants de l'humain et évoluent avec ce dernier depuis des millions d'années [10]. Ceci est le cas des virus de la famille des *Herpesviridae*, dont certains membres sont retrouvés de façon ubiquitaire dans la population humaine [11]. Ce présent chapitre se concentrera sur la biologie du virus de l'herpès simplex de type 1 (VHS-1) et des interactions avec son hôte, mais discutera aussi rapidement des autres virus herpétiques affectant l'homme.

## 1.1 L'herpès simplex de type 1

### 1.1.1 Historique

Les premiers écrits faisant mention de lésions s'apparentant à l'herpès génital remontent au 3<sup>e</sup> millénaire av. J.-C. [12]. Or, il faut attendre la Grèce antique et le corpus hippocratique pour que le mot *Herpes*, qui signifie *ramper*, soit pour la première fois associé à un ensemble de lésions ulcéreuses de la peau capable de se propager [13]. Le mot herpès est alors utilisé pour décrire des symptômes découlant de différentes maladies. La définition moderne de l'herpès telle qu'on

la connaît est introduite seulement dans les années 1700 par Daniel Turner et Robert Willan [13, 14]. Plus d'un siècle s'écoule avant que Vidal, en 1873, constate que l'herpès est une maladie infectieuse en inoculant à des sujets le liquide provenant de leurs propres pustules [15]. Cette observation est appuyée en 1924 par Gruter lorsqu'il isole le VHS-1 et montre que l'herpès est transmissible entre les individus en l'inoculant d'un lapin à un autre [14, 16]. De façon inquiétante et intrigante, Andrewes et Carmichael observent que la présence d'anticorps neutralisants dans le sang des personnes n'empêche pas une infection subséquente [17]. Doerr apporte une réponse à cette intrigue en 1939. Il est le premier virologue à postuler que la nature récurrente des lésions herpétiques chez une personne ne découle pas de nouvelles infections, mais plutôt d'une réactivation endogène du virus [17]. En effet, la capacité d'établir une latence pour ensuite se réactiver chez un hôte infecté est une caractéristique commune des virus herpétiques humains et est particulièrement marquée dans le cas du VHS-1.

### 1.1.2 Classification

Les virus herpétiques sont représentés par plus d'une centaine d'espèces et forment l'ordre des *Herpevirales*, dont les membres sont connus pour infecter une grande variété d'hôtes [18]. Des trois familles découlant de cet ordre, celle des *Herpesviridae* inclut tous les virus capables d'infecter l'homme [19]. Les critères d'inclusion de cette famille sont principalement la structure particulière du virion et la capacité à produire une latence chez l'hôte infecté [20]. Les 9 virus herpétiques humains (HHV) connus à ce jour sont répartis entre trois sous-familles; *Alpha-*, *Beta-* et *Gammaherpesvirinae*, et plusieurs genres (**Tableau I**) [19]. La répartition entre les sous-familles est basée sur les propriétés biologiques de chaque virus. Celles-ci incluent la vitesse de réplication, la capacité à infecter un nombre restreint ou diversifié d'hôtes et les types cellulaires ciblés lors du maintien de la latence [20-22]. Les 9 HHV causent chez l'humain un ensemble de maladies pouvant aller des simples lésions de la peau aux cancers (**Tableau I**).

**Tableau 1.** – Description des 9 HHV et des principales maladies qui leurs sont associées

Sous-famille	Nom scientifique	Nom commun	Maladies associées
<i>Alphaherpesvirinae</i>	HHV-1	Virus herpès simplex de type 1 (VHS-1)	Herpès labial, encéphalite, herpès néonatal, kératite [12]
	HHV-2	Virus herpès simplex de type 2 (VHS-2)	Herpès génital [12]
	HHV-3	Virus varicelle-zona (VVZ)	Varicelle/Zona [23].
<i>Betaherpesvirinae</i>	HHV-5	Cytomégalovirus (CMV)	CMV congénital, maladies associées aux greffes d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques [24, 25]
	HHV-6A/6B		Roséole infantile [26, 27].
	HHV-7		Roséole infantile [28]
<i>Gammapherpesvirinae</i>	HHV-8	Virus herpétique associé au sarcome de Kaposi (VHSK)	Sarcome de Kaposi, lymphome primitif des séreuses, maladie de Castleman multicentrique [29, 30]
	HHV-4	Virus Epstein-Barr (VEB)	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, carcinome du nasopharynx [31, 32]

### 1.1.3 Maladies et traitements

Une récente analyse publiée par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime que près du deux tiers de la population mondiale âgée de 0 à 49 ans vit avec une infection au VHS-1 [33]. Celle-ci est habituellement bénigne, mais peut mener à des complications graves ou même menacer le pronostic vital de certaines personnes [34]. Le meilleur traitement reste la prévention en évitant les contacts oraux et génitaux avec les personnes infectées, plus particulièrement celles présentant une infection active. Lorsque l'infection est établie, il est impossible d'éliminer le virus de l'organisme, et ce, malgré la disponibilité d'un grand nombre d'antiviraux [35].

#### 1.1.3.1 Maladies

Quoique mentionné la plupart du temps lors d'une atteinte orale, l'herpès de type 1 peut aussi causer l'herpès génital, même si cette pathologie est le plus souvent associée à l'herpès de type 2 [33]. Les VHS-1 et VHS-2 peuvent donc infecter ces deux sites, malgré une préférence

respective pour la partie supérieure du corps et les organes génitaux [35]. Une personne infectée reste porteuse du virus tout au long de sa vie et peut transmettre l'herpès à des individus sains lors d'épisodes de réaction virale [17]. Ces dernières ne sont pas toujours accompagnées de symptômes, ce qui facilite la transmission [33, 35, 36]. Tout comme la plupart des virus herpétiques humains, la sévérité des maladies causées par l'herpès est étroitement associée à l'état immunitaire de l'hôte [37]. Ainsi, l'herpès peut causer un grand éventail de maladies, passant des simples lésions sur les lèvres à des atteintes neurologiques graves pouvant entraîner la mort. Outre les maladies directement associées au VHS-1, le rôle de ce virus fait l'objet de plusieurs études depuis les dernières années dans des atteintes neurologiques telles que l'Alzheimer et la sclérose en plaques [38-42]. À la suite de l'infection lytique des cellules épithéliales de la bouche, le VHS-1 induit une infection latente dans les neurones situés au niveau du ganglion trigéminal. Lors d'une réactivation virale, le virus infectieux est à nouveau transporté jusqu'aux cellules épithéliales pour s'y répliquer. Or, les neurones du ganglion trigéminal représentent, avec le système olfactif, une porte d'entrée importante menant jusqu'au système nerveux central (SNC) [38]. La réactivation récurrente du VHS-1 dans le SNC serait l'un des nombreux facteurs menant au développement et à l'évolution de ces maladies neurodégénératives. À la lumière de ces observations, l'étude du VHS-1 et la production de vaccins ou d'antiviraux pourraient jouer un rôle important dans la prévention ou le contrôle de ces atteintes neurologiques [40, 43].

#### *Présentation des maladies chez les personnes immunocompétentes*

Chez les individus immunocompétents, l'infection primaire est très souvent asymptomatique, mais peut aussi être accompagnée de fièvre, d'ulcères au site de l'infection et d'une inflammation des ganglions [12, 44]. La réactivation du virus à la jonction entre la peau et les muqueuses, notamment sur les lèvres et les organes génitaux, mène à la formation d'ulcères causant une sensation de brûlure [12]. Les symptômes sont moins sévères que ceux observés lors de la primo-infection et se résorbent d'eux-mêmes en moins de deux semaines [34]. Dans le cas de l'herpès génital, les personnes infectées par le VHS-1 ont un pronostic clinique plus favorable que celles atteintes par le VHS-2; elles vivent moins d'épisodes de réactivation virale au cours de leur vie et les symptômes sont habituellement plus légers [35]. La réactivation du virus est

souvent associée à des perturbations telles qu'une exposition aux rayons UV, une opération ou un changement hormonal [12]. Dans de rares cas, le virus peut s'attaquer aux yeux. Cette infection peut affecter plusieurs composantes de l'œil, dont la paupière, la cornée ou la conjonctive [45]. Sans traitement approprié, des complications graves nécessitant une greffe peuvent survenir à la suite de la destruction de la cornée et de la perte de la vision [46]. Une autre complication rare, mais très dangereuse, d'une infection au VHS-1 est l'encéphalite herpétique. Celle-ci est causée par la réactivation du virus dans le SNC d'une personne infectée [34]. La mortalité est importante, mais celle-ci passe de 70 à 15% en présence de traitements [12, 44]. Plus de la moitié des personnes survivant à une encéphalite herpétique garderont des séquelles neurologiques importantes, et ce, malgré une prise en charge médicale adéquate [12, 34, 44].

#### *Présentation des maladies chez les personnes immunosupprimées*

L'état immunitaire de l'hôte joue un rôle primordial dans le contrôle de l'infection par le VHS-1 [37]. Ainsi, les personnes immunosupprimées à la suite d'une greffe ou d'une maladie sont plus susceptibles de développer des maladies sévères en lien avec l'herpès [12]. Parmi cette liste se trouvent les œsophagites, les encéphalites et les hépatites d'origine herpétique [35]. Au contraire de l'hôte immunocompétent, les symptômes en lien avec une réactivation virale sont plus fréquents, douloureux et prennent plus longtemps à se résorber [34, 35]. On note aussi l'apparition de souches du VHS-1 résistantes à l'acyclovir, l'antiviral de première ligne contre l'herpès, chez des hôtes immunosupprimés [34, 47]. Chez le nouveau-né, le VHS-1 cause une maladie très grave nommée l'herpès néonatal [35]. Elle est transmise de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou par contact post-accouchement avec un porteur [44]. L'herpès néonatal se présente sous trois formes différentes; la forme disséminée, la forme localisée et la forme neurologique [44]. De ces trois manifestations, la majorité des décès est attribuable à la forme disséminée et les survivants conservent habituellement des séquelles neurologiques [34, 35, 47]. Les deux autres formes, beaucoup moins mortelles, doivent toutefois être traitées par antiviraux afin d'empêcher leur évolution en une forme disséminée [35, 47].



### 1.1.3.2 Traitements

#### *Antiviraux*

Les antiviraux utilisés contre le VHS-1 sont habituellement des analogues de nucléosides et partagent donc plusieurs caractéristiques avec les nucléosides retrouvés dans la cellule [22, 48]. Ces analogues possèdent des modifications dans leur structure qui leur permettent d'agir principalement sur la réplication de l'ADN en bloquant son élongation [48]. L'acyclovir, un analogue acyclique de la guanosine, est l'antiviral habituellement prescrit en première ligne pour traiter les infections au VHS-1 grâce à sa faible toxicité [49-51]. Afin d'être actif, ce composé nécessite 3 phosphorylations [50]. Alors que les deux dernières phosphorylations sont effectuées par des enzymes cellulaires, la première est spécifique à la thymidine kinase du virus [50]. Sous sa forme active, l'acyclovir rivalise avec la désoxyriboguanosine triphosphate pour l'ADN polymérase virale et bloque l'élongation de la chaîne d'ADN par l'absence d'un groupe hydroxyle à son extrémité 3' [50]. Outre l'acyclovir, le famciclovir et le valacyclovir sont aussi utilisés en première ligne de traitement et agissent par des mécanismes similaires [49, 51]. Chez les hôtes immunocompromis ou subissant un traitement antiviral à long terme, des souches résistantes à l'acyclovir peuvent faire surface [47]. Elles possèdent souvent des mutations dans la thymidine kinase qui l'inactive, rendant ainsi les médicaments de première ligne inefficaces [50]. Des antiviraux de deuxième ligne peuvent alors être utilisés, tels que le foscarnet et le cidofovir. Malgré une toxicité accrue, l'avantage de ces composés est qu'ils ne dépendent pas de la thymidine kinase virale afin d'être activés [49, 51]. D'autres antiviraux à base de peptides, d'oligonucléotides ou d'anticorps monoclonaux sont actuellement testés afin d'inhiber l'entrée du virus dans les cellules [52, 53]. Ces composés interagissent plutôt avec les glycoprotéines d'entrée du virus ou leurs récepteurs. Comme mentionné par *Antoine et al.*, l'utilisation d'une combinaison d'antiviraux pour traiter l'herpès pourrait avoir comme effet de limiter l'apparition de souches résistantes et d'améliorer l'efficacité du traitement [52].

#### *Vaccins*

Plusieurs vaccins ont été testés au cours des dernières décennies alors que d'autres sont actuellement en essais cliniques de phase I et II [54]. Malgré des résultats prometteurs dans les

modèles animaux, tous les vaccins préventifs et thérapeutiques ont échoué à conférer une résistance significative contre le virus ou à diminuer les épisodes de réactivation virale chez l'humain [47]. La complexité du cycle viral du VHS-1 et notre compréhension limitée des réactions immunitaires impliquées dans l'infection figurent parmi les multiples raisons faisant obstacle à l'élaboration d'un vaccin efficace [55, 56]. Plusieurs types de vaccins ont été testés; vaccins à ADN, vaccins à protéines recombinantes, vaccins à virus atténué et vaccins sous-unitaires à partir de glycoprotéines virales [35, 54, 55]. Les efforts sont pour la plupart concentrés sur l'élaboration d'un vaccin contre le VHS-2, mais ces avancées pourraient aussi bénéficier à la conception d'un vaccin contre le VHS-1. Ceci est possible, car les deux virus possèdent une très grande homologie [54].

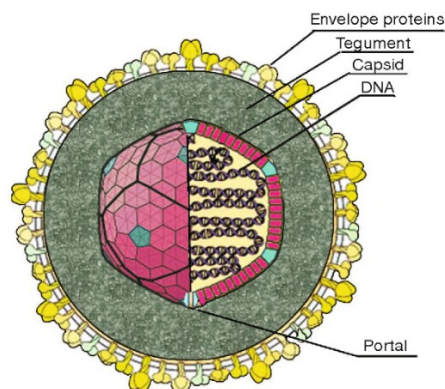
#### **1.1.4 Intérêts du VHS-1 en recherche**

Le VHS-1 a été le sujet d'innombrables recherches depuis sa découverte et sa biologie est relativement bien connue. Son génome de grande taille, sa capacité à infecter un ensemble impressionnant de types cellulaires et son niveau de dangerosité relativement faible ne sont que quelques critères qui font de ce virus un candidat de choix dans le domaine thérapeutique [57-59]. Le VHS-1 a d'ailleurs été le premier virus oncolytique approuvé par la FDA (pour « *Food and Drug Administration* ») pour son utilisation contre des mélanomes [57]. Cette forme de thérapie consiste en l'utilisation de virus modifiés et atténués dans le but de causer spécifiquement la mort des cellules cancéreuses [60]. Ces virus peuvent agir de deux façons; soit en tuant directement les cellules cancéreuses, soit en favorisant la réponse immunitaire antitumorale par l'ajout de transgènes à leur génome [57]. Le VHS-1 est un candidat idéal pour ces deux techniques. Son cycle viral lytique termine toujours par la mort de la cellule infectée et une proportion appréciable de son génome code pour des gènes non essentiels [57]. Ceux-ci peuvent être remplacés par des transgènes qui agiront sur l'environnement immunosuppresseur causé par la tumeur [60]. Malgré les nombreux avantages du VHS-1, sa capacité à infecter le SNC remet en cause la sécurité de son utilisation chez les patients [57]. De plus, la déplétion ou la modification de gènes viraux causent dans la plupart des cas une diminution de l'efficacité du virus autant sur les cellules saines que cancéreuses [57, 59]. Les recherches actuelles tentent d'augmenter la spécificité du virus oncolytique tout en préservant son efficacité. L'une des techniques consiste à rediriger le virus

vers des récepteurs hautement exprimés chez les cellules cancéreuses [59]. Ceci est possible par la modification des glycoprotéines du virus, forçant un changement dans son tropisme cellulaire [57]. Les virus, dont le VHS-1, offrent ainsi une nouvelle approche dans le traitement des cancers. Cette branche de la virologie gagne d'ailleurs de plus en plus d'attention et de popularité.

### 1.1.5 Structure du VHS-1

La structure du VHS-1 est typique des virus de la famille des *Herpesviridae* et consiste en un génome à ADN linéaire double-brin, d'une capsidie icosaédrique, d'un tégment et d'une enveloppe lipidique dérivée des membranes de la cellule infectée (**Figure 1**) [21, 61]. Le diamètre du virion mature est d'environ 225nm [62]. Ses principales composantes architecturales sont discutées plus extensivement dans les sous-sections suivantes.



**Figure 1. Structure d'un virion du VHS-1.**

Représentation schématique d'un virion mature du VHS-1 contenant les 4 structures principales; (de l'extérieur vers l'intérieur) L'enveloppe virale (jaune), le tégment (vert), la capsidie (rose) et le génome à ADN (mauve). *Figure reproduite et modifiée avec la permission de Springer Nature [63].*

#### 1.1.5.1 Le génome

Le génome du VHS-1 est composé d'une seule copie d'ADN double-brin linéaire de 152 kilobases (kb) (**Figure 2**) [61, 64]. Celui-ci est fortement condensé dans la capsidie sous la forme d'anneaux concentriques vers l'extérieur et d'un cœur désordonné en son centre [65]. Deux séquences uniques contiennent la majorité des gènes du génome viral; la séquence unique courte ( $U_s$ ) et la séquence unique longue ( $U_L$ ). Ainsi, la majorité des gènes du VHS-1 sont nommés selon leur position sur le génome et utilisent le préfixe  $U_L$  ou  $U_s$ . Les protéines résultant de la

transcription de ces gènes sont désignées protéine  $U_L/U_S$  ( $pU_L/pU_S$ ), VP (pour « *Viral Protein* ») ou ICP (pour « *Infected Cell Protein* ») (Voir Tableau 6 en annexe) [66, 67]. Trois autres séquences sont retrouvées dans l'ADN viral et bordent  $U_S$  et  $U_L$ . Des copies inversées de la séquence  $c$  sont retrouvées aux extrémités de  $U_S$  alors que  $U_L$  est flanquée par des copies inversées de la séquence  $b$ . Finalement, des copies de la séquence  $a$  délimitent le génome du VHS-1 et séparent aussi les deux séquences uniques (**Figure 2**) [61, 68, 69].

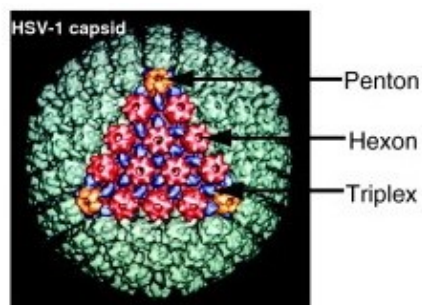


**Figure 2. Structure du génome viral.**

$U_L$  : Séquence unique longue,  $U_S$  : Séquence unique courte,  $a b c$  : Séquences répétées,  $a' b' c'$  : Séquences répétées inversées. *Figure reproduite et modifiée avec la permission de Springer Nature [70].*

#### 1.1.5.2 La capsid

De forme icosaédrique, la capsid du VHS-1 possède 20 faces et 12 sommets et fait 125nm de diamètre (**Figure 1, région rose et Figure 3**) [71]. Elle est hautement symétrique et est composée de 162 sous-unités protéiques et structurales nommées les capsomères [61]. Ces capsomères, formés d'hexons ou de pentons, sont liés entre eux par des trimères protéiques [61, 72].



**Figure 3. Reconstitution d'un virion par microscopie électronique cryogénique.**

Le triangle coloré représente l'une des 20 faces du virion. Une face est composée de pentons (orange), d'hexons (rouge) et de trimères (bleu). *Figure reproduite et modifiée avec la permission d'Elsevier [71].*

Seul 1 des 12 sommets de la capsid diffère structurellement des autres et représente le portail. L'un de ses rôles consiste à permettre l'entrée et la sortie de l'ADN [71]. Cette structure est composée de 12 copies de  $pU_L6$  et partage des similarités avec le portail des bactériophages

à ADN double brin [73]. Le terme nucléocapside est employé lorsqu'il est question de la capsidie contenant le génome viral.

#### 1.1.5.3 Le tégment

Le tégment est une structure protéique se situant entre la capsidie et l'enveloppe du virus (**Figure 1, section verte**). Il représente une composante majeure du virion en termes de volume, du nombre et de la quantité de protéines [22, 66]. Il est formé de milliers de protéines cellulaires et virales, dont plusieurs sont conservées dans la famille des *Herpesviridae* [74]. Vingt-trois protéines virales et un ensemble de protéines cellulaires ont été identifiées comme appartenant au tégment du VHS-1 par spectrométrie de masse [66, 75]. Sa structure est flexible et dynamique tout au long du cycle viral, ce qui rend son étude ardue [76]. Schématiquement, le tégment est segmenté en deux structures, soit la couche interne et la couche externe. Les protéines sont catégorisées entre ces deux couches selon leur association avec la capsidie ou l'enveloppe. En réalité, cette distinction n'est pas aussi nette puisque plusieurs protéines du tégment semblent plutôt faire le pont entre ces deux structures [76-78]. Le tégment joue un nombre divers et important de rôles à toutes les étapes du cycle viral, passant du transport de la capsidie au noyau lors de l'entrée virale à la régulation des gènes viraux et cellulaires, sans oublier l'enveloppement secondaire des virions [74, 76].

#### 1.1.5.4 L'enveloppe

L'enveloppe représente la couche externe du virion mature et elle est acquise lors de l'étape de l'enveloppement secondaire (**Figure 1, région jaune**). C'est une enveloppe lipidique dérivée des membranes internes de la cellule hôte. En plus de contenir des lipides et des protéines membranaires cellulaires, l'enveloppe de l'herpès est composée de 15 protéines membranaires virales, dont 12 glycoprotéines [66, 75]. Celles-ci sont gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM et gN (g pour glycoprotéines) [66, 79]. De ces 12 glycoprotéines, gB, gD, gH et gL sont les seules qui sont considérées comme essentielles pour l'entrée du virus dans des cellules *in vitro* [80]. Les glycoprotéines virales de l'enveloppe exercent plusieurs rôles tout au long du cycle viral du VHS-1. Parmi ceux-ci se trouvent la modulation de la fusion entre les membranes cellulaires et virales

menant à l'entrée du virus, le transport intracellulaire de protéines virales et l'enveloppement des particules virales lors de l'étape de sortie [81].

### 1.1.6. Cycle viral

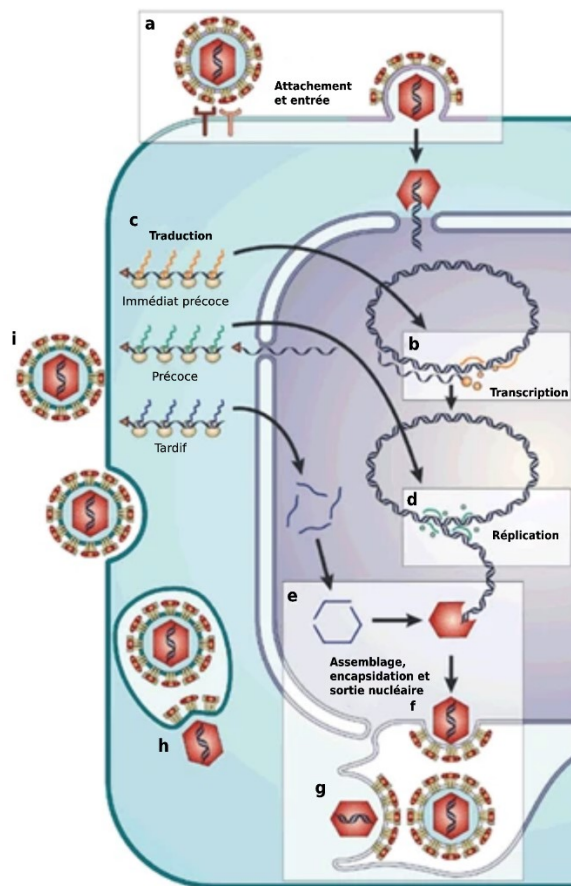
Tout comme les autres virus de la famille des *Herpesviridae*, le VHS-1 possède deux cycles viraux différents. L'utilisation de l'un ou l'autre de ces programmes est dépendante de plusieurs facteurs, dont le type cellulaire infecté [82]. Ainsi, le cycle viral lytique est favorisé dans les cellules épithéliales et facilite la propagation du virus. Au contraire, le cycle viral de latence est employé dans les neurones sensoriels et contribue à la persistance et à la réactivation du virus tout au long de la vie de l'hôte infecté [82]. Lors de ce second cycle, le génome viral est maintenu dans le noyau cellulaire sous forme circulaire et exprime un seul gène [83, 84]. Le gène LAT (pour « *Latency Associated Transcript* ») mène à la production d'un intron stable épissé et de plusieurs microARNs dont le rôle majeur est d'inhiber l'expression des gènes lytiques [82, 84]. Au cours de ce mémoire, le cycle viral de latence n'est pas discuté davantage et seul le cycle lytique sera abordé en détail.

#### 1.1.6.1 Attachement et entrée virale

Le VHS-1 peut lier un nombre important de récepteurs cellulaires, dont les nectines 1 et 2, le médiateur d'entrée du virus herpétique (HVME), l'héparane sulfate 3-O-sulfaté (3-O-HS) et la lectine de type C DC-SIGN (pour « *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-grabbing non-integrin* »), par l'intermédiaire de ses glycoprotéines [62]. Cette diversité de récepteurs permet au virus d'infecter un important nombre de types cellulaires *in vitro* et *in vivo*, dont les fibroblastes, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les neurones, les cellules dendritiques et les lymphocytes T, en plus de cellules non humaines [62, 79, 85].

La première étape de l'infection du VHS-1 consiste à son attachement à la cellule hôte (**Figure 4, a et Figure 5, a**). Cette première interaction est réversible et électrostatique. Elle implique des glycoprotéines de l'enveloppe virale qui sont chargées positivement et des protéines cellulaires de charges négatives [62]. gB et gC initient l'attachement du virion à la surface de la cellule en se liant principalement à des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs) [81]. La délétion de gC entraîne un retard dans l'entrée et une diminution du titre viral, mais sa présence

n'est pas absolument nécessaire [86]. Selon le type cellulaire, d'autres protéines peuvent lier gC et gB. Ainsi, ce sont plutôt les lectines de type C qui permettent l'attachement des virions à la surface des cellules dendritiques [62]. Il a été démontré que l'infection de plusieurs lignées cellulaires par le VHS-1 induit la formation de filopodes, des excroissances du cytoplasme, et que ces structures jouent un rôle dans le déplacement des virions. En effet, l'interaction entre gB et les HSPGs au niveau des filopodes permet aux virions de se déplacer jusqu'au corps cellulaire par un mouvement nommé « *Viral surfing* » [87]. Ceci est particulièrement intéressant, car l'un des récepteurs d'entrée du VHS-1, la nectine-1, est concentré au niveau du corps cellulaire [62]. Par la suite, gD va s'associer avec l'un de ses multiples récepteurs, soit la nectine-1, le médiateur d'entrée du virus herpétique ou l'héparane sulfate 3-O-sulfaté. Le récepteur utilisé par gD dépendra du type cellulaire impliqué [62, 80, 88, 89]. Ainsi, cette première étape d'attachement permet l'accumulation des virions à la membrane cellulaire et leur colocalisation avec les récepteurs cellulaires nécessaires afin de débiter l'entrée.

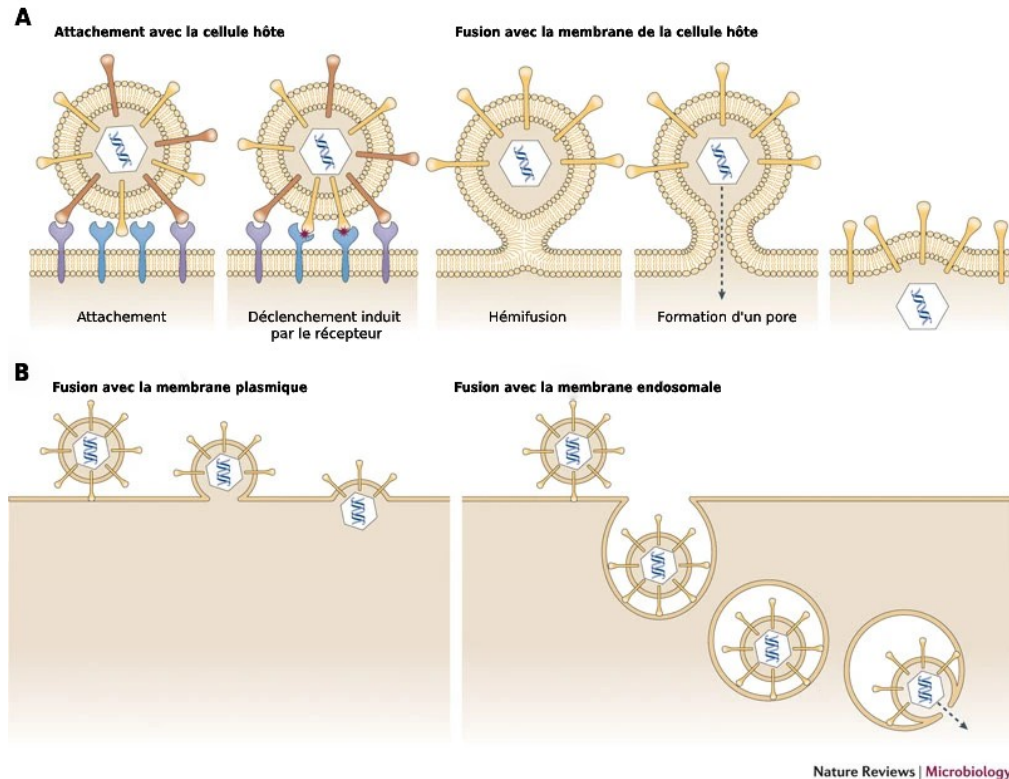


**Figure 4. Représentation schématique des principales étapes du cycle lytique du VHS-1.**

(a) L'attachement du virion à la surface de la cellule induit son entrée par des interactions entre des glycoprotéines virales et des récepteurs cellulaires. La capsid est ensuite dirigée au noyau et le génome viral y est injecté. Les gènes viraux sont (b) transcrits, puis (c) traduits en protéines, menant à (d) la réplication du génome viral. (e) Les protéines virales sont assemblées pour former une capsid et une copie du génome viral y est encapsidée. La nucléocapsid quitte le noyau en subissant (f) une étape d'enveloppement primaire à la MNI puis (g) de dé-enveloppement à la MNO. La particule virale (h) acquiert son enveloppe finale lors de l'étape de l'enveloppement secondaire pour ensuite (i) être libérée de la cellule sous la forme d'un virion mature et infectieux. *Figure reproduite, modifiée et traduite avec la permission de Springer Nature [90].*

La liaison de gD à l'un de ses récepteurs déclenche un changement conformationnel de gD et active le complexe de fusion composé de gH/gL et gB afin de débiter l'étape de l'entrée. L'hétérodimère gH/gL agit à titre de régulateur et d'activateur de gB [91]. Cette dernière est la protéine qui permet la fusion des enveloppes cellulaire et virale et la libération subséquente de la capsid dans le cytoplasme de la cellule [92]. gD, gH, gL et gB sont suffisantes et essentielles pour l'entrée du virus. Or, les 11 autres glycoprotéines de l'enveloppe, dites non essentielles, influencent la route d'entrée du virus selon les récepteurs disponibles [80, 93]. Deux mécanismes ont été observés pour l'entrée du VHS-1 et le choix de l'un ou l'autre est dépendant du type cellulaire infecté (**Figure 5, b**). Le premier mécanisme, observé notamment pour les cellules VERO ou HEP-2, consiste en la fusion entre l'enveloppe et la membrane plasmique par un processus indépendant du pH [89, 94]. Dans d'autres lignées cellulaires, dont les Hela et les CHO, le processus débute par l'endocytose du virion et est suivi par la fusion entre l'enveloppe virale et celle de la vésicule endosomale [89, 95].





**Figure 5. Mécanisme d'entrée du VHS-1 dans une cellule.**

**A.** Le virion s'attache à la surface de la membrane plasmique d'une cellule, ce qui induit l'entrée virale.  
**B.** Deux mécanismes d'entrée sont utilisés par le VHS-1 selon le type cellulaire infecté. À gauche, le mécanisme d'entrée par la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule. À droite, le mécanisme d'entrée par endocytose, suivi de la fusion entre l'enveloppe du virion et la membrane de l'endosome. *Figure reproduite et traduite avec la permission de Springer Nature [96].*

#### 1.1.6.2 Transport au noyau et relâche de l'ADN viral

L'enveloppe est retirée lors de l'entrée du virion dans la cellule et la plupart des protéines du tégument sont libérées dans le cytoplasme. Parmi celles-ci figurent VP11/12, VP13/14, VP16, VP22 et le « *virion host shut-off protein* » (*vhs*) [84, 97]. Leur détachement survient à la suite de leur phosphorylation par des kinases virales et cellulaires [89]. Certaines de ces protéines sont transportées au noyau indépendamment de la capsidie ou agissent à même le cytoplasme afin de réguler les premières étapes de l'infection [74]. Plusieurs rôles leurs sont attribués, dont la stimulation de la transcription des gènes viraux, le détournement de la réponse immunitaire de l'hôte et l'inhibition de la traduction cellulaire par la dégradation des ARN messagers (ARNm) [74]. Quelques protéines de la capsidie et du tégument restent associées à la particule virale et

participent à son transport jusqu'au noyau. Il est estimé qu'une nucléocapside parcourrait 1cm en plus de 200 ans si elle diffusait simplement dans le cytoplasme [98]. Ceci est principalement dû à la taille de la nucléocapside et de l'encombrement du cytoplasme par une multitude d'organelles, de protéines et de composantes du cytosquelette. Or, la vitesse de déplacement du VHS-1 est beaucoup plus rapide en pratique, ce qui suggère l'implication d'un processus actif dans son transport jusqu'au noyau [98]. En effet, les particules virales s'associent à une composante du cytosquelette de la cellule, les microtubules, afin de faciliter leur transport. Cette interaction permet le déplacement de la capsid de l'extrémité positive à l'extrémité négative du microtubule par l'association des protéines virales VP26, pU<sub>L</sub>36 et pU<sub>L</sub>37 avec le complexe moteur dynéine/dynactine [88, 99, 100]. Il a été démontré que des protéines cellulaires telles que la chaperonne cellulaire Hsp90 jouent aussi un rôle dans cette étape de transport [101]. Le ciblage de la capsid au noyau est essentiellement permis par pU<sub>L</sub>36 qui possède une séquence de localisation nucléaire (SLN) [102]. Cette dernière assure la liaison de la capsid au complexe du pore nucléaire (CPN) par l'intermédiaire de l'importine-β1 et de la protéine Ran [103]. Cette association implique aussi directement des composantes du CPN telles que les nucléoporines hCG1, 214 et 358 et d'autres protéines virales [88, 104]. Suite à cette étape, un clivage protéolytique de pU<sub>L</sub>36 à son extrémité N-terminale cause un changement conformationnel de la capsid qui est nécessaire à la libération du génome viral dans le noyau [105]. Subséquemment, le génome linéaire est rapidement circularisé [84].

#### 1.1.6.3 Expression des gènes viraux

L'expression des gènes viraux est séquentielle et ceux-ci sont regroupés en trois catégories; les gènes immédiats précoces ( $\alpha$ ), les gènes précoces ( $\beta$ ) et les gènes tardifs ( $\gamma$ ). Cette dernière catégorie est davantage divisée en deux groupes; les gènes tardifs-précoces ( $\gamma_1$ ) et les gènes tardifs-tardifs ( $\gamma_2$ ) (**Figure 4, b et c**) [84].

##### *Les gènes immédiats précoces*

La transcription des gènes  $\alpha$  est à son maximum entre 2 et 4 heures après le début de l'infection [88, 106]. Ce groupe est composé de protéines virales régulatrices qui permettent la transcription des gènes  $\beta$  et l'inhibition de la réponse antivirale cellulaire [88, 106, 107]. Leur

expression est indépendante de la synthèse de nouvelles protéines virales. Cinq protéines sont incluses dans ce groupe : ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47 [106]. Chacune d'entre elles possède la séquence 5'GyATGnTAATGArATTCTTGGnGGG3' au sein de son promoteur, ce qui offre plusieurs sites de liaison au complexe d'activation de la transcription [108]. Celui-ci est composé des protéines cellulaires HCF-1 et OCT-1 et de VP16, une protéine virale libérée dans le cytoplasme à la suite de l'entrée d'un virion infectieux dans la cellule [108]. Ce complexe permet à son tour le recrutement d'autres protéines cellulaires, dont des déméthylases et le complexe de pré-initiation de la polymérase II [84]. Cette cascade d'évènements mène à la dérégulation des gènes viraux et à leur transcription. Il a été démontré que l'expression d'ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47 était dépendante d'ICP0. Cette dernière recrute l'histone acétyl transférase CLOCK et permet la transcription des autres gènes  $\alpha$  en modifiant l'état de condensation de la chromatine [109].

#### *Les gènes précoces*

La synthèse protéique de ces gènes est à son maximum entre 6 et 12 heures post-infection (hpi) [84]. Les protéines découlant de ce groupe jouent des rôles importants dans la transcription des gènes tardifs, l'inhibition de la transcription des gènes immédiats précoces et dans la réplication de l'ADN viral [88, 107]. Tout comme les gènes immédiats précoces, les gènes précoces ne sont pas dépendants de la réplication de l'ADN viral. Or, au contraire des gènes  $\alpha$ , l'activation du promoteur des gènes  $\beta$  est indépendante du complexe VP16/OCT-1/HCF-1 [108]. Elle nécessite plutôt ICP4 qui interagit avec des facteurs cellulaires et recrute le complexe de préinitialisation de la polymérase II sur le promoteur viral [107]. Lors d'une faible multiplicité d'infection (MOI), ICP0 facilite la transcription des gènes  $\beta$  en contrecarrant les mécanismes de répression de la chromatine [84]. L'expression des gènes  $\beta$  mène à la formation de compartiments de réplication en association avec l'ADN viral. Ces structures permettent de recruter et de concentrer les protéines cellulaires et virales nécessaires à la réplication du génome viral [110].

#### *Les gènes tardifs*

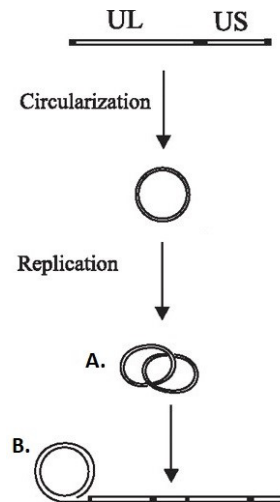
La transcription des gènes tardifs atteint son maximum entre 10 et 16 heures suivant le début de l'infection [88]. Ces gènes codent majoritairement pour des protéines structurales du virion [84]. Au contraire des gènes  $\alpha$  et  $\beta$ , les gènes  $\gamma$  sont dépendants de la réplication de l'ADN

viral [107]. Celle-ci améliore la transcription des gènes  $\gamma_1$  alors qu'elle est essentielle pour l'expression des gènes  $\gamma_2$  [111]. Tout comme la réplication de l'ADN, la transcription des gènes tardifs se produit dans des structures spécialisées nommées les compartiments de réplication [110]. Le promoteur des gènes tardifs, au même titre que celui des gènes précoces, est indépendant du complexe VP16/OCT-1/HCF-1 pour l'initiation de la transcription [108]. Celle-ci est plutôt assurée par ICP0, ICP4, ICP8, ICP22 et ICP27 qui recrutent, entre autres, l'ARN polymérase II et la topoisomérase II au promoteur [84, 112, 113].

#### 1.1.6.4 Réplication de l'ADN viral

Comme mentionné précédemment, le génome viral est rapidement circularisé à la suite de sa libération dans le noyau de la cellule. Ce passage d'une forme linéaire à une forme circulaire est important pour la réplication subséquente du génome (**Figure 4, d et Figure 6**) [83, 84]. Le modèle de réplication le plus couramment accepté est divisé en deux étapes; soit la réplication dépendante des origines de réplication suivie de la réplication par cercle roulant. Pour débiter, la réplication du génome est initiée à l'une des trois origines de réplifications. Une d'entre elles, OriL, est située dans la séquence unique longue alors que deux copies d'OriS sont présentes dans les séquences répétitives retrouvées de part et d'autre de la séquence unique courte [114]. Ces 3 origines sont similaires et redondantes, signifiant que la présence d'une seule d'entre elles est suffisante afin d'initier la réplication du génome viral [114, 115]. La reconnaissance d'une de ces origines de réplication est effectuée par pU<sub>L</sub>9 qui, grâce à son activité hélicase, mène à la formation d'une structure en épingle au niveau du promoteur [116]. La présence d'ADN simple-brin favorise la liaison de la protéine ICP8 qui stimule l'activité de pU<sub>L</sub>9 et recrute à son tour le complexe hélicase-primase et l'ADN polymérase virale [117]. Ces deux complexes sont composés respectivement du trimère pU<sub>L</sub>5/pU<sub>L</sub>8/pU<sub>L</sub>52 et du dimère pU<sub>L</sub>30/ pU<sub>L</sub>42 [118]. L'interaction de ces 7 protéines forme le réplisome, une structure jouant un rôle central dans la réplication de l'ADN à partir des origines de réplifications [84]. La fourche de réplication ainsi produite permet une réplication bidirectionnelle de type  $\theta$ , qui laissera sa place par la suite à un mécanisme de type cercle roulant (**Figure 6, A et B**) [119]. Ce dernier est indépendant des origines de réplication et produit des concatémères, une structure composée de plusieurs copies du génome viral placées les unes après les autres. Il est d'ailleurs proposé que la formation de concatémères

pourrait plutôt survenir à la suite d'un évènement de recombinaison. Ce modèle a été développé lors de l'observation que l'ADN viral adopte une structure complexe et embranchée lors de sa réplication [120, 121]. Ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs puisque des évidences ont été observées pour chacun d'entre eux [84, 120, 122].



**Figure 6. Mécanisme de la réplication du génome viral.**

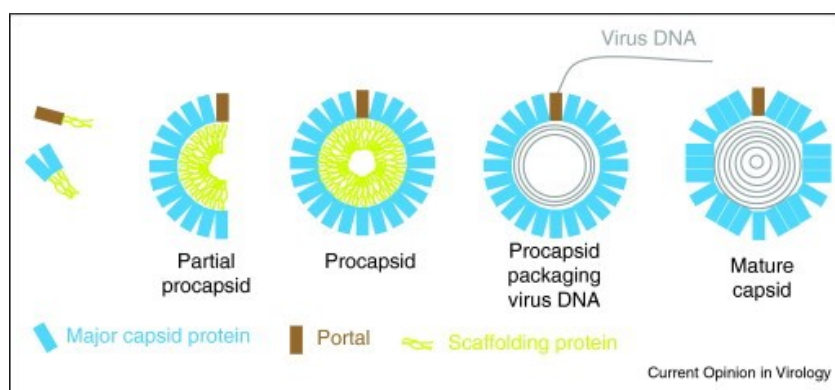
À la suite de la circularisation du génome viral, celui-ci va être **(A)** répliqué par le mécanisme bidirectionnel de type thêta **(B)** puis par le mécanisme de type cercle roulant. UL : Séquence unique longue, US : Séquence unique courte. *Reproduite et modifiée avec la permission de [118] sous la licence [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).*

#### 1.1.6.5 Assemblage de la capsid et encapsidation de l'ADN viral

##### *Assemblage de la capsid*

Le noyau représente le site d'assemblage des capsides virales (**Figure 4, e**). Les protéines virales VP5, VP19C, préVP22a, VP23, VP26 et pU<sub>L</sub>26 sont suffisantes pour cette étape [84, 123-126]. Après leur synthèse, celles-ci sont dirigées au noyau par l'intermédiaire d'un SLN. VP5, VP23 et VP26 sont dépourvues de cette séquence de ciblage et doivent interagir avec une ou des protéines virales pour leur transport au noyau [127]. C'est ainsi que VP23 est amenée au noyau par la formation d'un trimère VP23/VP23/VP19C. Dans le cas de VP26, son recrutement au noyau est dépendant de la formation préalable d'un dimère VP5/préVP22a [123, 127]. Ces dimères et trimères protéiques s'associent dans le noyau et l'ajout d'hexons et de pentons constitués de VP5

à cette structure forme une procapside sphérique (**Figure 7**) [128]. Il est d'ailleurs proposé que le portail participe à l'initiation ou aux premières étapes de la formation de la capsid en s'associant à préVP22a [71, 125, 129]. Ceci permettrait d'assurer l'incorporation d'un seul portail par capsid [129, 130]. Or, des capsides peuvent s'assembler en absence du portail dans un système *in vitro* [129]. À cette étape, la structure de la procapside est beaucoup moins définie et stable que dans le cas d'une capsid mature à cause de la faiblesse des liens entre les différentes sous-unités (**Figure 7**) [131].



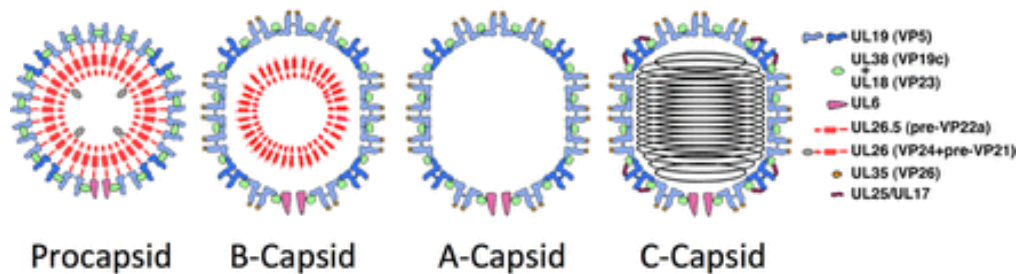
**Figure 7. Étapes menant à la formation d'une capsid.**

Une capsid partielle composée du portail (brun), des protéines majeures de la capsid (bleu) et de protéines d'échafaudage (vert) s'assemble en une procapsid. La maturation de la capsid mène à l'expulsion des protéines d'échafaudage et à l'entrée du génome viral. *Figure reproduite avec la permission d'Elsevier [71]*

#### *Maturation de la capsid*

La procapsid précédemment obtenue doit subir une étape de reconfiguration pour devenir une capsid mature (**Figure 8**) [131]. À cette étape, le polypeptide pU<sub>L</sub>26 s'auto-clive et libère la protéine d'échafaudage VP21 et la protéase VP24. Cette dernière va à son tour cliver la protéine d'échafaudage préVP22a en VP22a [128, 132]. Ces changements permettent à la capsid d'adopter une forme angulaire et icosaédrique beaucoup plus robuste [61, 133]. La digestion des protéines d'échafaudage mène à leur expulsion de la capsid, mise à part VP24, et déclenche l'empaquetage d'une copie complète du génome viral [66]. Ces deux derniers événements sont coordonnés et mènent à la formation des capsides de type C, qui sont les précurseurs des virions matures et infectieux (**Figure 8, C-Capsid**) [61, 134]. Deux autres types de capsides angulaires ne

contenant pas d'ADN sont retrouvés dans le noyau et, selon des études effectuées chez le CMV, représenteraient des intermédiaires des capsides C [133]. D'autres pensent plutôt que ces capsides sont défectueuses et découlent de défauts rencontrés lors de l'encapsidation de l'ADN ou de leur maturation [61]. Les capsides de type A possèdent très peu de protéines et leur contenu en ADN est nul ou presque inexistant, alors que les capsides de type B possèdent en leur centre les protéines d'échafaudage VP22a, VP21 et VP24 (**Figure 8, A-Capsid et B-Capsid**) [61, 135].



**Figure 8. Représentation schématique des 4 types de capsides produites par le VHS-1 et leurs principales composantes.**

Les éléments de la capsid (bleu), les protéines d'échafaudage (rouge), le portail (rose) et l'ADN (noir) sont présentés. *Figure reproduite avec la permission d'Elsevier [136] et d'American Society of Microbiology [137].*

#### *Encapsidation du génome viral*

Sept protéines virales sont nécessaires pour l'encapsidation du génome dans la capsid nouvellement formée; soit pU<sub>L</sub>6, pU<sub>L</sub>15, pU<sub>L</sub>17, pU<sub>L</sub>25, pU<sub>L</sub>28, pU<sub>L</sub>32 et pU<sub>L</sub>33 [61]. Le complexe de la terminase, composé de pU<sub>L</sub>15, pU<sub>L</sub>28 et pU<sub>L</sub>33, s'associe dans le cytoplasme et transloque au noyau par l'intermédiaire d'un SLN présent dans la séquence de pU<sub>L</sub>15 [61, 138, 139]. La reconnaissance du concatémère d'ADN viral par pU<sub>L</sub>28 dans les compartiments de réplication active l'activité endonucléase de pU<sub>L</sub>15 et une extrémité libre du génome est produite par clivage [61]. Pendant ce temps, les capsides préformées sont transportées aux compartiments de réplication par pU<sub>L</sub>32 [140]. L'activité translocase ATP-dépendante de pU<sub>L</sub>15 est stimulée à la suite de son association avec la protéine du portail, pU<sub>L</sub>6, et permet l'entrée de l'ADN génomique dans la capsid [61, 139, 141]. Une seule copie complète du génome viral est insérée dans la capsid par la reconnaissance d'un motif par pU<sub>L</sub>28 et le clivage subséquent du concatémère par

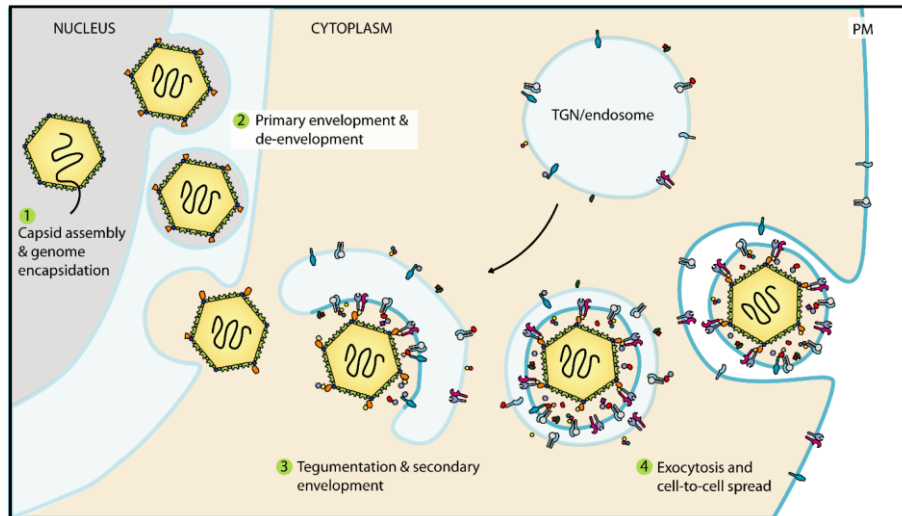
pU<sub>L</sub>15 [61, 84]. Le rôle de pU<sub>L</sub>33 dans ce processus n'est pas encore complètement défini, mais sa présence est essentielle au fonctionnement du complexe [61]. Des évidences pointent vers un rôle de pU<sub>L</sub>33 dans une des étapes de clivage et de la séparation d'une copie génomique du reste du concatémère [142, 143].

Un deuxième complexe nommé CVSC (pour « *Capsid Vertex Specific Component* ») et composé de pU<sub>L</sub>17, pU<sub>L</sub>25 et pU<sub>L</sub>36 participe à l'encapsidation du génome [61]. Ce complexe est d'ailleurs retrouvé en plus grande abondance sur les capsides de type C que celles de types A et B [144, 145]. La présence de pU<sub>L</sub>17 est nécessaire au clivage de l'ADN et à l'ancrage du CVSC à la capside [145, 146]. Le modèle actuel propose qu'en plus de stabiliser la capside, 5 copies de pU<sub>L</sub>25 s'associent à l'ADN et forment une structure en coiffe. Ceci aurait pour effet de créer un « bouchon » et d'obstruer le portail afin de maintenir le génome à l'intérieur de la capside [61, 65, 145, 147].

#### 1.1.6.7 Sortie virale

Les nucléocapsides précédemment produites doivent quitter le noyau afin d'acquérir leur tégument et leur enveloppe. Or, la grande taille des particules virales ne leur permet pas de diffuser librement dans la membrane nucléaire (MN) jusqu'au cytoplasme [88]. Trois modèles sont principalement utilisés pour expliquer le transport des capsides du noyau à la membrane plasmique; le modèle de l'enveloppement unique, le modèle du double enveloppement, aussi appelé le modèle d'enveloppement, dé-enveloppement et réenveloppement, et le modèle de sortie par le CPN [22]. Parmi ceux-ci, le modèle du double enveloppement est celui actuellement accepté par la majorité de la communauté scientifique et sera celui abordé dans le cadre de ce mémoire (**Figure 9**) [62, 84, 88, 148-150].





**Figure 9. Principales étapes de la sortie virale selon le modèle du double enveloppement.**

**(1)** Formation de la capside et encapsidation du génome viral. **(2)** Enveloppement primaire et dé-enveloppement. **(3)** Acquisition du téguement et enveloppement secondaire. **(4)** Sortie virale. PM : Membrane plasmique. *Figure reproduite avec la permission de [75] et sous la licence [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).*

### *Enveloppement primaire*

La nucléocapside nouvellement formée doit atteindre le cytoplasme pour terminer sa maturation. Ce trajet comporte plusieurs étapes et, selon le modèle du double enveloppement, implique d'abord la fusion de la capside avec la membrane nucléaire interne (MNI) par le complexe de sortie nucléaire (NEC pour « *Nuclear Egress Complex* ») (**Figure 4, f et Figure 9, 2**). Ce dernier est composé de deux protéines virales, pU<sub>L</sub>31 et pU<sub>L</sub>34, dont leur expression est essentielle et suffisante à la formation de vésicules périnucléaires [151]. Un des rôles du NEC est de recruter la sérine/thréonine kinase virale pU<sub>S</sub>3 afin de déstabiliser une importante barrière cellulaire qui sépare la capside de la MNI; la lamina nucléaire [152]. Cette structure consiste en un réseau de lamines de type A, B et C et de protéines membranaires qui couvrent la face nucléaire de la MNI. La dissociation de cette structure est essentielle lors de la division cellulaire pour permettre au noyau de se désassembler et elle est initiée par la phosphorylation des différentes lamines [153]. Le VHS-1 exploite ce processus par l'intermédiaire du NEC, qui recrute des kinases virales et cellulaires [154, 155]. À cette étape, les capsides ayant incorporé un génome viral sont préférentiellement enveloppées à la MNI [156]. La sélection des capsides de type C est attribuable à la plus grande concentration de pU<sub>L</sub>17 et pU<sub>L</sub>25, des composantes du CVS<sub>V</sub>, à leur

surface et à leur interaction avec le NEC [84, 145, 157]. Certaines glycoprotéines virales, dont gM, gH, gD et gB, sont détectées à la MNI et incorporées dans les virions lors de l'enveloppement primaire [158]. Ces protéines sont recrutées par le NEC, mais leur rôle dans l'enveloppement primaire n'est toujours pas élucidé [84, 159].

#### *Dé-enveloppement*

Les virions périnucléaires possèdent une enveloppe qui est subséquemment perdue lors de l'étape du dé-enveloppement (**Figure 4, g et Figure 9, 2**). Celle-ci consiste en la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane nucléaire externe (MNE), suivie de la libération d'une capsidie nue dans le cytoplasme. Ce processus est appuyé par l'observation que des protéines virales retrouvées dans les virions périnucléaires sont absentes des virions extracellulaires [92]. Pour le VHS-1, la fusion entre les deux membranes est dépendante de la phosphorylation de pU<sub>L</sub>31, gB et gH par pU<sub>S</sub>3 [92, 160, 161].

#### *Acquisition du tégument*

L'acquisition du tégument est un processus dynamique qui débute dans le noyau et se termine lors de l'enveloppement secondaire de la capsidie [162]. Pour débiter, un ensemble restreint de protéines du tégument interne, qui inclut ICP0, ICP4, pU<sub>S</sub>3, VP22, VP16, vhs et VP1/2, s'associe à la capsidie dans le noyau [75, 162]. Leur présence permettrait de faciliter l'enveloppement primaire des virions, mais plusieurs études se contredisent à ce sujet [75, 162]. Des copies additionnelles de ces protéines sont ajoutées au tégument à la suite de l'étape de dé-enveloppement [163]. Or, la majorité des protéines du tégument sont localisées exclusivement dans le cytoplasme ou aux membranes cellulaires et s'associeront au virion lors de l'enveloppement secondaire (**Figure 9, 3**) [75, 88, 163].

#### *Enveloppement secondaire*

L'enveloppement secondaire est l'étape où la nucléocapsidie ornée du tégument acquiert son enveloppe finale (**Figure 4, h et Figure 9, 3**). L'endroit exact où se produit ce processus n'a pas été clairement défini, mais plusieurs évidences pointent vers le réseau trans-golgien (TGN pour « *Trans-golgi network* ») comme étant le site de l'enveloppement secondaire principal [164-167]. Or, le VHS-1 réorganise plusieurs organelles de la voie de sécrétion cellulaire pendant

l'infection, dont l'appareil de Golgi, le TGN et les endosomes, ce qui rend ardue l'identification exacte du site d'enveloppement secondaire [163]. L'interaction entre les protéines du tégument et les glycoprotéines virales ancrées dans les membranes cellulaires facilitent l'enveloppement de la capsid [75, 168]. Cette étape a pour effet de produire des vésicules intraluminales permettant aux virions d'emprunter la voie de sécrétion cellulaire. Finalement, la fusion entre les vésicules intraluminales et la membrane plasmique libère des virions matures et infectieux hors de la cellule hôte (**Figure 4, i et Figure 9, 4**) [75, 84, 88, 163].

## 1.2 Glycoprotéine M du VHS-1

Comme discuté dans la section précédente, le cycle viral du VHS-1 a été et est toujours au cœur de plusieurs projets de recherche. Notre laboratoire est particulièrement intéressé aux étapes liées à la sortie du virus, notamment aux rôles associés à la glycoprotéine M (gM). Des études que nous avons précédemment effectuées ont soulevé des interrogations par rapport à la localisation cellulaire de gM pendant l'infection. Le présent projet de maîtrise se questionne sur l'un des aspects du cycle de gM au cours de l'infection. Les principales caractéristiques de cette protéine seront discutées dans la section suivante.

### 1.2.1 gM chez les *Herpesviridae*

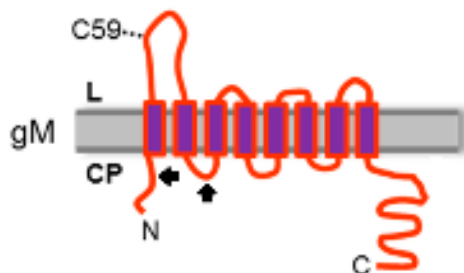
Les glycoprotéines sont incorporées au virion lors de l'étape de l'enveloppement secondaire. Certaines de ces glycoprotéines sont conservées chez les *Herpesviridae*, alors que d'autres sont limitées aux membres d'une même sous-famille. La glycoprotéine M a été identifiée pour la première fois lors d'études sur le cytomégalovirus (CMV). Depuis, des homologues ont été caractérisés pour la plupart des *Herpesviridae* étudiés [169, 170]. Or, la nécessité de gM lors de la réplication virale est variable entre les trois sous-familles. Alors que sa présence est requise pour le cycle réplcatif des *bêta* - et des *gamma-herpesvirinae*, gM est dispensable chez la plupart des *alphaherpesvirinae* [171-176]. L'élimination de gM *in vitro* chez le VHS-1, un *alphaherpesvirinae*, cause tout de même une diminution de la taille des plaques et du taux d'entrée des virions, en plus d'un retard dans la libération des particules infectieuses [177-179]. Une diminution de 10 à 100 fois du titre viral est aussi observée selon le virus herpétique et le type cellulaire employé [171, 174, 175]. Chez le VHS-1, cette diminution est d'environ 10 fois dans

les BHK et les Vero [171, 180]. Un rôle *in vivo* a aussi été proposé pour gM à la suite d'observations qu'un virus avec une forme tronquée de la protéine croissait plus lentement que le virus sauvage chez des souris [181].

### 1.2.2 Gène et structure protéique

La glycoprotéine M est une protéine transmembranaire encodée par le gène *UL10* [182]. La région codante de ce gène s'étend sur environ 1420 pb et possède 3 codons de départ, dont deux sont des codons d'initiation alternatifs [64, 179, 183]. Ces derniers débent aux résidus 19 et 133 et produisent des formes tronquées de gM (**Figure 10, flèches noires**) [178]. Le premier codon de départ mène à la formation d'une protéine complète très hydrophobe de 473 acides aminés (aa) [64]. Des études bio-informatiques situent les extrémités N - et C-terminales de gM du côté cytosolique, ce qui a été confirmé par cytométrie de flux pour l'extrémité C-terminale, et prédisent la présence de 8 domaines transmembranaires [184, 185] (**Figure 10**).

L'extrémité C-terminale de gM possède deux types de motifs s'apparentant à des signaux de trafic membranaire. Quatre motifs riches en tyrosine, de forme YXXΦ (Y = tyrosine, X = n'importe quel aa, Φ = un aa hydrophobique et volumineux), et un motif enrichi en résidus acides ont été proposés comme jouant un rôle dans le ciblage de gM vers différents compartiments cellulaires. Ceux-ci permettraient respectivement la sortie de gM du RE et de son ciblage au TGN à partir des endosomes [185]. Une étude subséquente menée par *Striebinger et al.* suggère plutôt que l'ensemble des 8 domaines transmembranaires participe au fonctionnement et à la localisation adéquate de gM [178]. La structure de gM contient aussi deux sites de N-glycosylation situés aux résidus 71 et 247 [182]. Le premier site est conservé chez la plupart des homologues de gM et se situe entre les 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> domaines transmembranaires de l'extrémité N-terminale [181, 182]. Un résidu cystéine à la position 59 est aussi retrouvée dans le premier domaine extracellulaire et permet à gM d'interagir avec gN, une autre glycoprotéine virale (**Figure 10, C59**) [186].



**Figure 10. Représentation schématique de la structure de gM.**

gM (rouge) possède 8 domaines transmembranaires (mauve) et ses extrémités N- et C- terminales sont situées du côté cytoplasmique. La cystéine à la position 59 qui interagit avec gN est présentée. Les flèches pleines représentent la position approximative des deux codons de départ alternatif aux aa 19 et 133. L : Luminal, CP : Cytoplasmique, C59 : Cystéine à la position 59. *Figure reproduite et modifiée avec la permission de [186] sous la licence [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).*

### 1.2.3 Maturation de gM

À la suite de la traduction de gM, celle-ci est retrouvée sous la forme d'une protéine immature d'environ 47kDa [181, 182]. La maturation de la protéine débute dans le RE par l'ajout d'un oligosaccharide aux sites de N-glycosylation situés sur des résidus asparagines [187]. Cette première modification produit une protéine de 50kDa qui sera par la suite modifiée pour atteindre un poids moléculaire entre 53 et 63kDa [181, 182]. Ce deuxième changement survient lorsque la protéine N-glycosylée accède à l'appareil de Golgi. Les oligosaccharides précédemment ajoutés sont alors modifiés par plusieurs enzymes cellulaires pour produire des chaînes matures résistantes à l'endoglycosidase H [182, 187]. Ces modifications permettent ainsi d'obtenir une glycoprotéine M mature à la suite de son passage dans le RE et l'appareil de Golgi.

### 1.2.4 Fonctions de gM

Au cours d'un cycle de réplication viral, gM est retrouvée au niveau de différents compartiments cellulaires. Sa présence a été détectée notamment à la MNI, dans l'enveloppe des virions périnucléaires, à la MNO, au RE, au TGN, à la membrane plasmique et dans les virions matures [159, 178, 182, 185, 188]. Ce changement de localisation permet à gM d'exercer plusieurs fonctions, et ce, malgré son caractère non essentiel chez le VHS-1.

#### 1.2.4.1 Modulateur de la fusion entre les membranes cellulaires et virales

Plusieurs événements de fusion membranaire sont initiés lors de l'infection par le VHS-1. Ils sont contrôlés, en partie, par l'activité de gM en association avec différentes protéines virales et cellulaires. Selon le contexte expérimental, l'observation que gM peut moduler autant positivement que négativement la fusion membranaire a mené à la conclusion qu'une forte régulation entoure ce mécanisme [183, 185, 189-191].

Comme mentionné précédemment, l'entrée du virus dans une cellule hôte débute par une étape de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique cellulaire. Ce mécanisme est dépendant de la machinerie de fusion constituée des glycoprotéines virales B, H/L et D et aussi du complexe gK/pU<sub>L</sub>20. Ces deux dernières protéines interagissent directement avec gB et gH et modulent l'activité de la machinerie de fusion [192]. Il a été proposé que gM contrôle indirectement l'activité fusogénique de gB en interagissant avec le complexe gK/pU<sub>L</sub>20. Cette hypothèse est appuyée par un ralentissement de l'entrée virale en absence de gM et par sa liaison directe avec la protéine pU<sub>L</sub>20 [189]. En plus d'un possible rôle dans l'initiation de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique, gM jouerait aussi un rôle dans la fusion entre les cellules comme discuté dans la section ci-dessous.

#### 1.2.4.2 Relocalisation de protéines virales aux sites d'enveloppement secondaire

Au cours de l'infection, plusieurs glycoprotéines virales sont retrouvées à la membrane plasmique et sont par la suite internalisées vers les sites d'enveloppement secondaire. Ceci est le cas des protéines de la machinerie de fusion, gH/gL et gD, qui mènent à la fusion entre cellules lorsqu'exprimées à la membrane plasmique. Il a été démontré que gM et plusieurs de ses homologues inhibent la formation de syncytium lors d'expériences de transfection et d'infection avec différents virus herpétiques [183, 185, 190, 193, 194]. Chez le VHS-1, gM cause la relocalisation de gH/gL vers le TGN, diminuant ainsi la concentration des protéines de la machinerie de fusion à la surface de la membrane plasmique [183, 185]. Le même effet est observé pour gD, mais nécessite aussi la délétion du complexe gK/pU<sub>L</sub>20 en association avec gM, suggérant une certaine redondance ou une interaction entre ces protéines [195]. Cette étape participe d'ailleurs à l'incorporation de ces glycoprotéines dans les virions matures en les ciblant aux sites d'enveloppement secondaire [177, 195]. L'internalisation de protéines de surface par

gM n'est pas exclusive aux glycoprotéines du VHS-1 [190, 194]. L'expression de gM, en association avec gN, dans des cellules exprimant les protéines H de l'influenza et F de HRSV mène à leur internalisation à partir de la membrane plasmique, tout comme la protéine cellulaire HVME. Malgré l'amplitude d'action de gM, son mécanisme n'affecte pas la localisation de toutes les protéines retrouvées à la membrane plasmique [185]. Il est ainsi proposé que gM agit sur la localisation adéquate de certaines glycoprotéines virales aux sites d'enveloppement secondaire et à leur incorporation dans les virions matures [177, 195, 196].

#### 1.2.4.3 Fonctions aux membranes nucléaires

Au cours du cycle viral, les glycoprotéines M nouvellement produites sont localisées à la membrane plasmique, puis au TGN avant d'être ciblées aux membranes nucléaires suite au remodelage de l'appareil de Golgi causé par l'infection [197]. À cette étape, la localisation préférentielle de gM à la MNI par rapport à la MNO nécessite l'expression de pU<sub>L</sub>31 et pU<sub>L</sub>34 et mènera à son intégration dans les particules virales lors de l'enveloppement primaire [158, 159]. Plusieurs rôles de gM à ces étapes tardives de l'infection ont été proposés, dont lors de l'enveloppement primaire des virions à la MNI et/ou de leur dé-enveloppement à la MNO [158, 177, 188]. Or, malgré sa classification de gène tardif, notre laboratoire a démontré que gM est retrouvée aux membranes nucléaires dès 4hpi, notamment dans des invaginations de la MNI [188]. D'ailleurs, son transcrite est étonnamment détecté dès 2hpi [198, 199]. Pour l'instant, aucun rôle à la MN n'a été attribué à gM à cette étape précoce de l'infection. *Jie et al.* ont proposé que gM puisse maintenir l'intégrité de la MN lors de l'expression plus tardive des glycoprotéines de fusion gB, gH et gD et ainsi empêcher la fusion de la MNI et de la MNO. Une autre hypothèse est que gM pourrait participer au maintien des invaginations retrouvées à la MNI [188]. Une observation intéressante est que la localisation de gM à 4hpi est indépendante de ses partenaires d'interaction connus, gN, pU<sub>L</sub>31, pU<sub>L</sub>34, VP22, gD, gH, Esyt-1 et Esyt-3, aucun n'étant détecté à la MN aussi tôt dans l'infection [183, 200, 201]. Or, lorsque transfectée seule dans des cellules, la gM nouvellement produite est strictement localisée au TGN et n'accède pas au noyau à 4hpi. Ces observations suggèrent que le ciblage de gM à la MN est viral-dépendant et nécessite la contribution d'un partenaire viral jusqu'ici inconnu ou d'une protéine cellulaire modulée par le virus [188]. Des expériences supplémentaires ont d'ailleurs démontré que gM à 4hpi contient des

chaînes d'oligosaccharides immatures et riches en mannose [188]. De plus, l'abolition du transport entre le RE et l'appareil de Golgi n'affecte pas son ciblage à la MN. Ceci implique qu'à cette étape de l'infection, gM n'a pas encore transitée par l'appareil de Golgi et qu'elle est activement retenue à la MN rapidement après sa synthèse [188].

Ces observations soulèvent des questions par rapport au mécanisme qui permet à gM d'atteindre la MNI à une étape précoce de l'infection. La majorité des protéines solubles se rendent au noyau par l'intermédiaire de récepteurs de transport nucléaire (RTN), dont les principales se nomment les importines. Ces transporteurs ont d'ailleurs été identifiés dans le transport de certaines protéines transmembranaires (PTM), même si le mécanisme utilisé est moins bien connu que pour les protéines solubles. Le but du présent mémoire est d'évaluer leur possible rôle sur le ciblage de gM à la MNI. La prochaine section décrit d'ailleurs les connaissances actuelles sur le transport nucléocytoplasmique des protéines solubles, puis des protéines membranaires.

### **1.3 Le transport nucléocytoplasmique des protéines**

L'une des différences fondamentales entre les cellules procaryotes et eucaryotes se situe dans l'emplacement de leur génome. Alors que celui des procaryotes se trouve dans le cytoplasme, les eucaryotes ont développé un compartiment spécialisé afin de protéger leur ADN; le noyau [202]. Ce compartiment hautement spécialisé exerce un ensemble de fonctions essentielles au bon fonctionnement de la cellule. Parmi ses rôles, le noyau protège le génome de la cellule, sépare les événements de transcription et de traduction en plus d'exercer une sélection stricte sur les molécules pouvant avoir accès à l'ADN [203].

#### **1.3.1 Transport nucléocytoplasmique des protéines solubles**

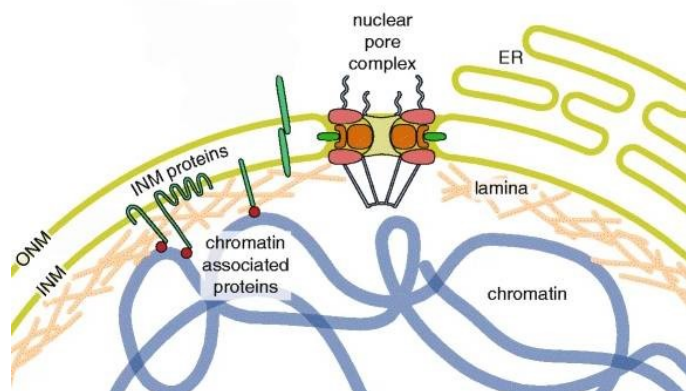
Le transport nucléocytoplasmique des protéines solubles est assuré principalement par trois composantes cellulaires importantes; les pores nucléaires, les récepteurs de transport nucléaire et la petite Ran GTPase [204]. Malgré la présence de différences entre les espèces, ce mécanisme est en grande partie conservé de la levure à l'humain et cela démontre son importance dans les cellules eucaryotes [205, 206]. Du fait de son rôle essentiel, le transport



nucléocytoplasmique des protéines solubles a été le sujet d'innombrables recherches dans les dernières décennies et est aujourd'hui un mécanisme très bien caractérisé [202, 204, 207-209].

### 1.3.1.1 Les membranes nucléaires

La MN est composée de deux bicouches lipidiques qui délimitent le cytoplasme du nucléoplasme [203]. Ces deux membranes, la MNE et la MNI, sont séparées par un espace d'environ 50 nm nommé l'espace périnucléaire (**Figure 11**) [210, 211]. La courbure et la fusion de ces membranes à plusieurs endroits créent des canaux dans la MN reliant le cytoplasme et le nucléoplasme [212]. Ces ouvertures servent de point d'ancrage pour les complexes du pore nucléaire dont les rôles seront abordés dans la prochaine section [213]. La MNO et la MNI diffèrent dans leur profil protéique et cette hétérogénéité est primordiale pour le maintien de l'intégrité du noyau [211, 214-217]. Alors que les protéines transmembranaires de la MNE s'associent avec des éléments du cytosquelette, celles de la MNI interagissent avec la lamina nucléaire et la chromatine [211, 214]. D'ailleurs, l'identification des protéines résidentes de la MNI est ardue, car sa composition est dynamique en plus d'être variable entre les types cellulaires étudiés [217, 218]. Certaines protéines transmembranaires contenues dans ces deux membranes se rejoignent au niveau de l'espace périnucléaire et forment les complexes de liaison du nucléosquelette et du cytosquelette (LINC) [219]. Cette association est essentielle, entre autres, pour la transmission de signaux mécaniques et l'adaptation de la cellule à son environnement [214, 220].



**Figure 11. La membrane nucléaire et ses principales composantes.**

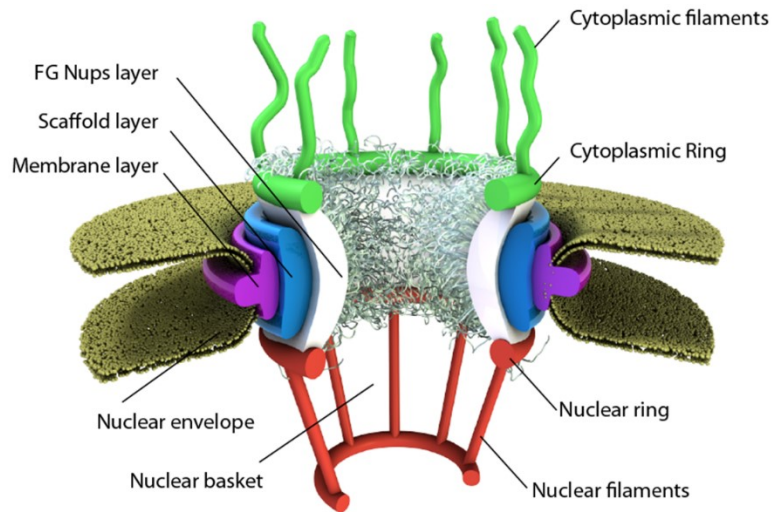
Représentation schématique de la MN. Le RE (ER) est en continuité avec la MNE (ONM). La MNE et la MNI (INM) se rejoignent au niveau des CPN. Des protéines transmembranaires de la MNI (vert foncé)

interagissent avec des composantes du noyau, dont la lamina nucléaire (beige) et des protéines associées (rouge) à la chromatine (mauve). *Figure reproduite et modifiée avec la permission de [233] sous la licence de CC BY 2.0.*

### 1.3.1.2 Le complexe du pore nucléaire

Les pores nucléaires sont des complexes macromoléculaires composés de plusieurs répétitions d'une trentaine de protéines nommées les nucléoporines (NUPS) appartenant à trois grandes catégories; les NUPS d'échafaudage, les NUPS transmembranaires et les NUPS-FG [213, 221, 222]. Ces dernières sont des NUPS possédant des régions riches en répétitions phénylalanine et glycine (FG). Le rôle principal du pore nucléaire est de contrôler le trafic des molécules de part et d'autre de la membrane nucléaire par l'intermédiaire de son canal central [126, 213, 216]. Celui-ci traverse les membranes nucléaires externe et interne et est tapissé de NUPS-FG dont les régions riches en FG interagissent entre elles pour former un filet exhibant les propriétés d'un hydrogel (**Figure 12**) [223]. Seules les molécules possédant un poids moléculaire inférieur à 30-40kD ou associées à un récepteur de transport nucléocytoplasmique parviennent à franchir cette barrière [207, 224].

La structure principale du complexe, d'une symétrie octogonale, est conservée chez la grande majorité des eucaryotes, mais varie grandement en masse et en taille [206, 221]. Chez l'humain, les CPN ont une masse d'environ 110-120MDa [225, 226]. Elles sont composées de trois anneaux; l'anneau cytoplasmique, l'anneau nucléaire et l'anneau central. Ce dernier anneau possède une couche membranaire composée de protéines membranaires du pore (POM) qui assurent l'ancrage de la structure dans les membranes nucléaires (**Figure 12, mauve**) [225, 227]. Le canal central formé par les trois anneaux possède un diamètre de 40 nm et médie le transport nucléocytoplasmique des molécules solubles [225]. Huit autres canaux d'un diamètre de 10 nm sont retrouvés en périphérie du canal central [228]. Plusieurs équipes de recherche leur attribuent un rôle dans le transport nucléocytoplasmique des PTMs [228-230].



**Figure 12. Représentation schématique d'un pore nucléaire inséré dans la membrane nucléaire.**

Le CPN est maintenu dans la membrane nucléaire par les POMs (mauve). Le canal central est entouré des trois anneaux; l'anneau cytoplasmique avec ses filaments (vert), l'anneau central (blanc, bleu et mauve) et l'anneau nucléaire avec son panier (rouge). Les régions riches en FG (filaments gris) des NUPS-FG (blanc) forment un filet contrôlant le transport nucléocytoplasmique. *Figure reproduite avec la permission de [231] sous la licence [CC BY 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)*

En plus des trois anneaux principaux, des éléments périphériques formés de NUPS participent à la structure du pore nucléaire. Le panier nucléaire et les filaments cytoplasmiques sont reliés respectivement à l'anneau nucléaire et à l'anneau cytoplasmique et plusieurs rôles leur ont été associés dans les dernières années [213, 225, 226, 232]. Ces éléments permettraient notamment de connecter le pore nucléaire à des réseaux protéiques situés dans le cytoplasme et le noyau en plus d'agir sur le transport nucléocytoplasmique. Plus particulièrement, il est proposé que le panier nucléaire peut s'associer avec des protéines afin de réguler plusieurs fonctions telles que la division cellulaire, la transcription et l'organisation de la chromatine [233].

Outre le rôle central du CPN dans le transport, un nombre grandissant d'observations soutiennent l'implication des nucléoporines dans d'autres fonctions cellulaires. Ainsi, dans la levure et les métazoaires tels que *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) et *Drosophila melanogaster*, certaines NUPS ont été associées à la régulation de l'expression génique, à la mitose et à la réparation de l'ADN [207, 234-236].

### 1.3.1.2 Les karyophérines

La majorité des molécules nécessite un transport actif impliquant les récepteurs de transport nucléaire afin de transiter par le pore nucléaire [207, 224]. Ceci est assuré en majorité par une superfamille de protéines solubles; la superfamille des karyophérines. Ces protéines sont spécialisées dans l'import et/ou l'export de molécules entre le cytoplasme et le nucléoplasme et portent respectivement le nom d'importines et d'exportines [207, 237]. Les importines sont davantage divisées en deux groupes; les importines- $\beta$  et les importines- $\alpha$ . Celles-ci peuvent aussi respectivement prendre le nom de karyophérines- $\beta$  et de karyophérines- $\alpha$  dans la littérature (Kpn $\alpha$ ) [238]. La classification de ces protéines dans la littérature porte à confusion, notamment dans le cas de la famille des importines- $\beta$ , un synonyme employé pour désigner la famille des karyophérines- $\beta$ , qui englobe des importines et des exportines [237, 239]. Dans le cas de la famille des karyophérines- $\alpha$ , celle-ci n'inclut que des importines qui n'appartiennent pas à la famille des karyophérines- $\beta$  [238]. Puisque le présent projet de maîtrise ne nécessite pas l'étude des exportines et par souci de clarté, le terme Importines- $\beta$  (Imp $\beta$ s) sera employé pour désigner les karyophérines- $\beta$  capables d'importer des cargos dans le noyau. La grande diversité des karyophérines retrouvée chez l'humain et les organismes multicellulaires permet un contrôle accru sur les diverses voies métaboliques nécessaires, entre autres, au développement et à la différenciation cellulaire [240-242].

Les karyophérines jouent un rôle central dans le transport nucléocytoplasmique en reconnaissant leurs cargos et par leur capacité à franchir le canal central du CPN [243]. La localisation d'une protéine spécifique est déterminée par la présence d'un signal de localisation nucléaire ou d'un signal d'export nucléaire (SEN) au sein de sa séquence. Ces signaux sont respectivement reconnus par les importines et les exportines qui lient le cargo afin de le transporter jusqu'au noyau ou au cytoplasme [204, 207]. Chaque importine reconnaît un ensemble de molécules spécifiques, mais il a été observé que certains cargos peuvent se lier à plusieurs importines [240, 241, 244, 245]. Cette redondance dans le transport nucléocytoplasmique pourrait ainsi permettre à la cellule de compenser jusqu'à un certain degré l'inhibition d'une des voies de transport [241]. Comme mentionné précédemment, le caractère sélectif du pore nucléaire est attribuable à la présence d'un filet ayant les propriétés d'un

hydrogel dans le canal central. Les karyophérines, en association avec leur cargo, franchissent cette barrière par compétition avec les interactions des régions FG des NUPS tapissant l'intérieur de ce canal [223, 243, 246].

### *Les importines- $\beta$*

Chez l'humain, la famille des karyophérines- $\beta$  regroupe 20 protéines, dont 10 importines, 7 exportines, 2 récepteurs bidirectionnels et 1 récepteur non caractérisé [237]. De ces 2 récepteurs bidirectionnels, IPO13 importe plus efficacement qu'il exporte ses cargos et sera abordé dans ce mémoire au même titre que les 10 importines (**Tableau 2**). Comme mentionné précédemment et par souci de clarté, le terme Imp $\beta$ s sera employé au cours du présent mémoire pour désigner les 10 importines et le récepteur bidirectionnel IPO13.

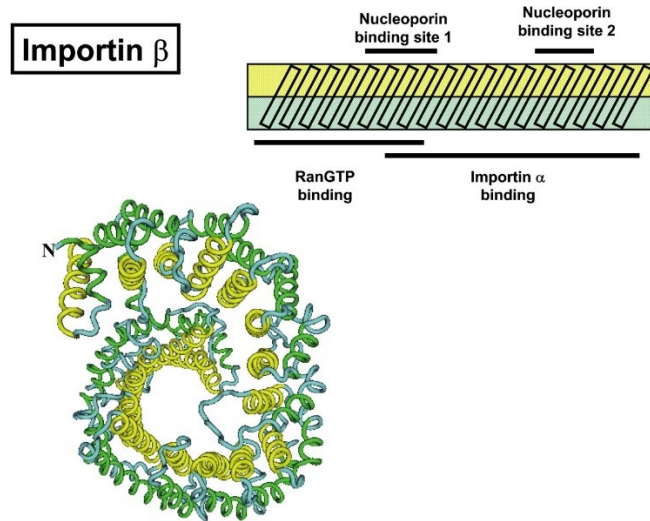
Toutes les importines- $\beta$  agissent par un mécanisme d'import direct, signifiant qu'elles lient directement leur cargo. L'importine- $\beta$ 1, aussi nommée la karyophérine- $\beta$ 1 (Kpn $\beta$ 1), est la seule exception connue à ce jour et possède la particularité de pouvoir médier l'import protéique par deux mécanismes; l'import direct et l'import indirect. Ce dernier mécanisme permet à Kpn $\beta$ 1 de lier indirectement ses cargos par l'entremise d'adaptateurs tels que les importines- $\alpha$  et la snuportine-1 [208]. Il a même été précédemment rapporté que certaines imp $\beta$ s peuvent former un hétérodimère dans le but de transporter des cargos spécifiques. C'est ainsi que Kpn $\beta$ 1 et l'importine 7 (IPO7) s'associent pour importer l'histone H1 [247]. Certaines imp $\beta$ s sont apparentées et peuvent partager les mêmes cargos, mais avec des affinités différentes. Ceci est le cas pour TNPO1 et TNPO2, TNPO3 et IPO13, IPO7 et IPO8, IPO4 et IPO5 puis IPO9 et IPO11 [240]. Un résumé sommaire de certains cargos transportés par les importines humaines est présenté dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**). La plupart des processus biologiques mentionnés ont été extrapolés à partir de résultats obtenus par spectrométrie de masse quantitative [240]. Ces observations nécessitent d'être explorées davantage et validées.

**Tableau 2. – Nomenclature des karyophérines- $\beta$  médiant l'import de cargos**

RTN	Noms alternatifs	Processus biologiques liés aux cargos - Exemple de cargos
Kpn $\beta$ 1	Imp- $\beta$ /Imp- $\beta$ 1/Kap $\beta$ 1	Régulation du cycle cellulaire [237] et de la chromatine [240], synthèse d'ADN [240] - Snail1 [208], PTHrP, PP2A [248]
TNPO1	Imp- $\beta$ 2/Kpn $\beta$ 2/Trn-1	Maturation de l'ARNm, transcription [208, 248] et division nucléaire [240] - ARP [240], FOXO4 [237], hnRNP [249], ATF1
TNPO2	Kpn $\beta$ 2b/Trn-2/	Maturation de l'ARNm, réparation de l'ADN [240] - ATF1, snRNP [240], hnRNP [249]
TNPO3	Trn-SR2/Trn-3/Imp-12	Épissage de l'ARN [240, 248] - Protéines contenant un domaine Sérine/Arginine (SR) [250]
IPO4	RanBP4/Imp-4	Processus métabolique lié à l'ADN, organisation chromosomique [240] - Histones H3 et H4 [251], récepteur de la vitamine D [248]
IPO5	Kpn $\beta$ 3/RanBP5/Imp-5	Biogénèse des ribosomes, organisation de la chromatine [240]. - Beaucoup de redondance avec d'autres importines, histones, protéines ribosomales, Rag-2 [248]
IPO7	RanBP7/Imp-7	Épissage de l'ARNm, régulation du cycle cellulaire [240] - Beaucoup de redondance avec d'autres importines, protéines ribosomales, histone H1 (en association avec Kpn $\beta$ 1) [202, 248], Smad3 [248]
IPO8	RanBP8/Imp-8	Épissage de l'ARNm, initiation de la transcription [240] - Smad4, Ago2 [248]
IPO9	Imp-9	Organisation du nucléosome et condensation de l'ADN, épissage de l'ARNm [240], régulation de l'expression génique [237] - Protéines ribosomales, histones, PP2A [248], actine [237]
IPO11	RanBP11/Imp-11	Développement, réplication de l'ADN, - Enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2) de classe III ubiquitylées [248]
IPO13	RanBP13/Imp-13/Kap13	Méiose [237], modification de la chromatine [240] - hUBC9, facteurs de transcription contenant des motifs <i>histone-fold</i> [208], NFYB, NFYC [240]

La séquence nucléotidique entre les différentes importines est très peu conservée (10-20%), mais leur structure 3D est hautement similaire [248, 252]. Cette dernière consiste en un solénoïde formé de 18 à 20 répétitions HEAT (pour Huntingtin, le facteur d'Élongation 3, la

protéine phosphatase 2A et la kinase TOR1), elles-mêmes composées de 2 hélices  $\alpha$  nommées A et B [253]. Les hélices B de chaque répétition interagissent entre elles pour former une poche hydrophobique capable d'interagir avec le cargo alors que les hélices A sont présentes sur la face externe (**Figure 13**). Cet arrangement assure la flexibilité nécessaire aux importines pour lier et relâcher une multitude de cargos [254, 255].



**Figure 13. Structure de Kpn $\beta$ 1 et de ses répétitions HEAT.**

Représentation cristallographique (à gauche) et schématique (à droite) de Kpn $\beta$ 1. Les hélices  $\alpha$  A (vert) et B (jaune) forment respectivement les faces externe et interne de l'importine. Chaque paire d'hélices A et B forment un domaine HEAT. Trois domaines majeurs constituent l'importine- $\beta$ 1, soit les sites de liaison à la RanGTP, à l'importine- $\alpha$  et aux nucléoporines. Figure reproduite avec la permission de [256].

La plupart des informations connues sur les importines découlent d'études sur Kpn $\beta$ 1 chez différentes espèces dont l'humain et la levure. Cette importine est d'ailleurs la première à avoir été découverte [224, 257]. Il a été démontré que Kpn $\beta$ 1 interagit avec les nucléoporines par l'entremise de plusieurs sites d'interaction retrouvés sur sa surface externe. La poche hydrophobe constituée d'hélices B et retrouvée du côté concave de la protéine lie Ran-GTP, les importines- $\alpha$  ou son cargo, dont les sites de liaison se chevauchent [258, 259]. Chaque importine possède un site de liaison à la Ran-GTP dans sa portion N-terminale, mais cette séquence est relativement peu préservée. Or, *Quan et al.* suggèrent que la conservation de quelques acides aminés dans cette portion est importante pour la liaison des importines à la Ran-GTP [260]. Quelques signaux d'imports ont été caractérisés pour certaines importines, dont le SLN classique

(SLNc) pour Kpn $\beta$ 1, les SLN-PY sous forme basique ou hydrophobique pour TNPO1 et le SLN-SR pour TNPO3 (où P représente l'aa proline, Y l'aa tyrosine, S l'aa sérine et R l'aa arginine). Or, les SLN pour la majorité des importines sont toujours inconnus ou peu caractérisés et nécessitent d'être étudiés davantage [208]. Cette difficulté découle en partie de l'importance de la configuration 3D du SLN dans l'étape de reconnaissance par certaines importines ou même de leur capacité à lier plusieurs séquences différentes [248].

La diversification des importines chez les eucaryotes multicellulaires, notamment les humains, offre un contrôle accru sur diverses voies métaboliques. La localisation et l'abondance des importines permettent de réguler la quantité de protéines pouvant être transportées jusqu'au noyau. Il n'est donc pas surprenant d'apprendre que les karyophérines sont contrôlées tant sur les plans transcriptionnel, traductionnel et protéique [240]. La distribution spatio-temporelle de ces transporteurs est vitale, notamment lors des étapes de développement et de différenciation cellulaire [237, 242, 260]. D'ailleurs, une augmentation dans l'expression de certaines importines est liée à plusieurs cancers [204, 261, 262].

#### *Les importines- $\alpha$*

Chez l'humain, la famille des karyophérines- $\alpha$  représente 7 importines regroupées en trois sous-familles; les sous-familles des importines  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3 (**Tableau 3**). Cette sous-division est basée sur l'homologie des séquences nucléotidiques, avec la sous-famille  $\alpha$ 2 possédant la plus haute similarité entre ses membres (92% de similarité entre Kpn $\alpha$ 3 et Kpn $\alpha$ 4) [241]. La dernière importine de cette famille, Kpn $\alpha$ 7, a été découverte en 2010 [263]. La nomenclature des importines- $\alpha$  diffère dans la littérature, c'est pourquoi le tableau ci-dessous présente les deux noms habituellement associés à chaque importine en plus d'offrir des exemples de cargos pour chacune d'entre elles [241].

**Tableau 3.** – Nomenclature des karyophérines- $\alpha$  retrouvées chez l'humain

Sous-famille	Karyophérines	Nom alternatif	Exemples de cargos
$\alpha$ 1	Kpn $\alpha$ 2	Imp $\alpha$ 1	RAG-1 [241]
	Kpn $\alpha$ 7	Imp $\alpha$ 8	Très peu caractérisée, Rb [263]
$\alpha$ 2	Kpn $\alpha$ 4	Imp $\alpha$ 3	NF- $\kappa$ B, RCC1 [241]



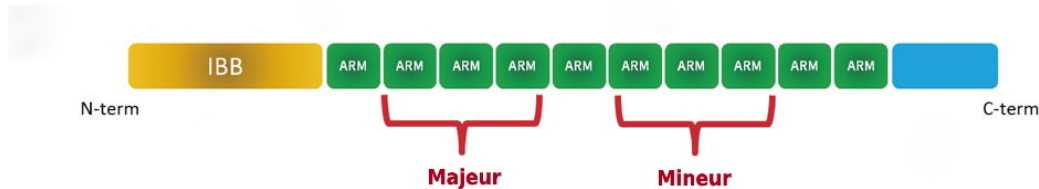
	Kp $\alpha$ 3	Imp $\alpha$ 4	
$\alpha$ 3	Kp $\alpha$ 1	Imp $\alpha$ 5	STAT1 et STAT2 [241]
	Kp $\alpha$ 5	Imp $\alpha$ 6	
	Kp $\alpha$ 6	Imp $\alpha$ 7	

Comme mentionné précédemment, ces protéines agissent à titre d'adaptateurs pour Kp $\beta$ 1, mais elles peuvent aussi individuellement transporter des cargos [264]. Le trimère Kp $\beta$ 1/importine- $\alpha$ /cargo constitue la voie d'import nucléaire dite « classique ». Ce nom dérive du fait qu'elle a été la première voie d'import caractérisée [208]. L'association de Kp $\beta$ 1 et d'une importine- $\alpha$  permet la reconnaissance de protéines possédant un SLN classique. Ce signal se présente sous la forme d'un ou de deux courts regroupements d'acide aminés basiques, nommés respectivement un signal mono- ou bi-partite, sous la forme K(K/R) X (K/R) et (K/R) (K/R) X<sub>10-12</sub> (K/R)<sub>3/5</sub> [204, 244, 265-267]. Dans ces séquences, K représente l'aa lysine, R l'aa arginine, N n'importe quel aa et (K/R)<sub>3/5</sub> la présence de 3 lysines ou arginines sur 5 aa consécutifs [267]. Il est estimé que la voie classique médie la majorité de l'import protéique dans la cellule. Il a été récemment proposé, grâce à des approches bio-informatiques, qu'environ 57% des protéines importées au noyau pourraient emprunter cette voie [265].

Contre toute attente, il s'avère que le transport direct effectué par Kp $\beta$ 1 est beaucoup plus rapide et moins énergivore que le transport indirect empruntant les Kp $\alpha$ , soulevant des questions sur la nécessité de ce dernier [268]. Par l'utilisation d'un cargo fluorescent et d'ARN interférents contre les importines- $\beta$  et - $\alpha$ , Riddick et Macara ont démontré que les importines- $\alpha$  offrent un niveau de contrôle supplémentaire lorsque comparé avec celui du transport direct par Kp $\beta$ 1. Ainsi, malgré une dépense énergétique plus importante et une efficacité moindre, les auteurs ont posé comme hypothèse que le transport indirect offrirait un avantage évolutif à la cellule en modulant plus finement l'import en réponse à des changements environnementaux [268].

Tout comme les karyophérines- $\beta$ , la structure 3D est conservée chez toutes les protéines de la famille des karyophérines- $\alpha$ . La partie N-terminale consiste en un domaine IBB (pour « *Importin-beta binding domain* ») suivi de 10 répétitions armadillo (ARM) et d'une courte

séquence d'aa acidiqes en C-terminale (**Figure 14**) [264, 269, 270]. Les répétitions ARM sont composées d'une quarantaine d'aa et interagissent entre elles pour former une poche centrale hydrophobique qui est importante pour la liaison du SLNc. La structure des répétitions ARM a été initialement déterminée par cristallographie chez la levure et s'apparente à celle des répétitions HEAT retrouvées chez les importines- $\beta$  [271]. Une troisième hélice alpha dans 8 des 10 répétitions ARM confère une rigidité accrue aux importines- $\alpha$ , qui adoptent une conformation solénoïdale [241]. Deux sites de liaison retrouvés à la surface concave de l'importine permettent la liaison des SLNc mono- et bi-partites [271]. Le site de liaison majeur se situe entre les ARM 2 à 4 et accommode les deux types de SLNc alors que le site de liaison mineur entre les ARM 6 à 8 lie la deuxième séquence d'un SLNc bipartite [269, 271].

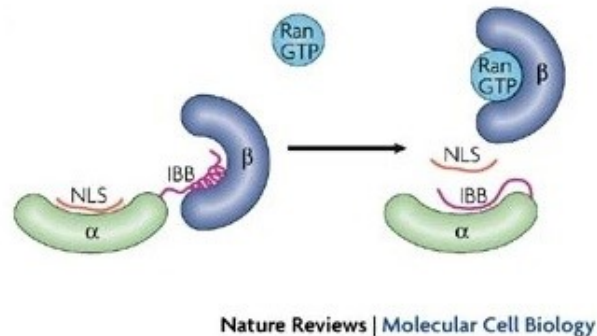


**Figure 14. Structure et domaines de l'importine- $\alpha$ .**

Le domaine de liaison à l'importine- $\beta$  (jaune), les 10 répétitions ARM (vert) et le domaine de liaison à CAS (bleu) sont représentés. Les domaines de liaison majeur et mineur sont identifiés en rouge. *Figure reproduite et modifiée avec la permission de [264]. © 2018 The Japan Academy.*

Malgré la préférence des SLNc monopartites pour le site de liaison majeur, certains d'entre eux ont été identifiés comme étant spécifiques au site de liaison mineur [272]. Ces deux sites sont conservés entre les différentes importines de cette famille et ne participent donc pas, du moins de façon considérable, à leur spécificité [241]. Une analyse de Kpn $\alpha$ 1, Kpn $\alpha$ 4 et Kpn $\alpha$ 6 a cependant démontré des variabilités dans la portion convexe des répétitions ARM et dans la portion C-terminale. Celles-ci contribueraient aux différences de courbure et de flexibilité observées parmi les importines- $\alpha$  [273]. Il a été démontré que le domaine IBB situé en N-terminal de l'importine- $\alpha$  est essentiel *in vivo* dans l'import nucléaire par la voie classique [274]. Ce domaine est un SLN fonctionnel qui joue un rôle d'auto-inhibition en compétitionnant avec les cargos pour les sites de liaison de l'importine- $\alpha$  [275]. Or, lorsqu'un cargo parvient à lier

l'importine, le domaine IBB est libéré et devient disponible pour interagir avec Kpn $\beta$ 1 afin de former l'hétérodimère Kpn $\beta$ 1/Kpn $\alpha$  (**Figure 15**) [241, 275].



**Figure 15. Rôles du domaine IBB dans la voie d'import classique.**

Le domaine IBB (rose) de Kpn $\alpha$  (vert) s'associe avec Kpn $\beta$ 1 (mauve) pour former un complexe. Cette configuration permet à Kpn $\alpha$  de lier un cargo contenant un SLNc (rouge, NLS). En présence de RanGTP au noyau (bleu), le domaine IBB est libéré et s'associe avec les sites de liaisons mineur et majeur de Kpn $\alpha$ . Ceci empêche l'interaction de Kpn $\alpha$  avec un cargo. *Figure reproduite et modifiée avec la permission de Springer Nature [276].*

L'auto-inhibition par ce domaine est possible grâce à la présence d'une séquence bipartite de type « RRR » et « RxxR ». Celle-ci est capable d'interagir avec les sites de liaison retrouvés dans les répétitions ARM discutées précédemment. Le motif « RRR » du domaine IBB s'associe avec le site de liaison majeur au SLN tandis que le motif « RxxR » interagit avec le site de liaison mineur [241]. Ce dernier motif diffère chez les différentes sous-familles d'importines- $\alpha$  et affecte la force d'auto-inhibition du domaine IBB [269]. En plus de médier la formation du complexe Kpn $\beta$ 1/Kpn $\alpha$ /Cargo dans le cytoplasme, le domaine IBB est essentiel pour la dissociation du cargo et de l'importine- $\alpha$  dans le noyau. Sans ce domaine, les deux composantes restent associées [274]. En C-terminale de la protéine, une séquence composée d'aa acides permet aux importines d'être reconnues par CAS (pour « Cellular Apoptosis Susceptibility »). Celle-ci est une exportine spécialisée dans le transport des adaptateurs du noyau vers le cytoplasme en se liant à la 10<sup>e</sup> répétition ARM et joue un rôle important dans le cycle d'import nucléaire médié par la voie classique [270].

Tout comme les karyophérines- $\beta$ , l'expression des karyophérines- $\alpha$  est finement régulée. Plusieurs mécanismes modulent l'abondance de chaque isoforme. Elles peuvent être régulées au

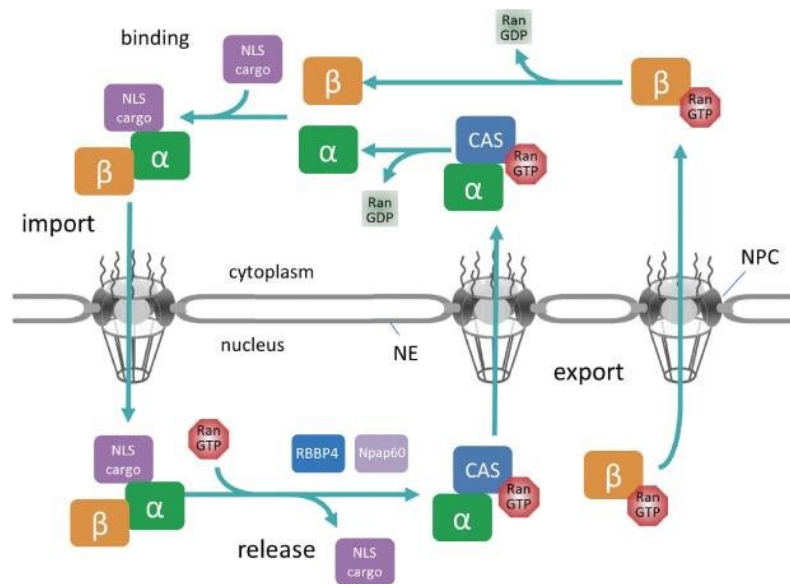
niveau transcriptionnel par des microARN, par des modifications post-traductionnelles, par séquestration ou par dégradation ciblée [241]. Cinq des 7 isoformes sont retrouvées dans tous les tissus, mais leur patron d'expression varie selon le type cellulaire, le stade de développement et même l'origine tissulaire. Kpn $\alpha$ 5 et Kpn $\alpha$ 7 sont quant à elles respectivement retrouvées dans les testicules et les ovaires ainsi que dans les premiers stades du développement embryonnaire [241, 277]. La modulation des importines- $\alpha$  affecte un ensemble de fonctions cellulaires dont la différenciation et la spécialisation cellulaire [264]. Une altération dans l'expression des importines a été observée dans plusieurs maladies [241, 264, 269]. Plus particulièrement, l'augmentation de Kpn $\alpha$ 2 est associée à un mauvais pronostic et/ou à une agressivité accrue dans certains cancers [262].

En plus de leur rôle crucial dans la voie d'import classique, les importines- $\alpha$  sont aujourd'hui associées à plusieurs autres processus cellulaires. Ainsi, les importines- $\alpha$  peuvent réguler négativement l'import nucléaire en compétitionnant avec Kpn $\beta$ 1 pour certains cargos [278]. Par exemple, la protéine Snail s'associe directement avec Kpn $\beta$ 1 pour son import. Or, Kpn $\alpha$ 1, Kpn $\alpha$ 2 et Kpn $\alpha$ 4 peuvent inhiber cette interaction en liant Snail. Ceci mène à la rétention de cette protéine dans le cytoplasme et à sa dégradation subséquente par le protéasome [278]. Il a d'ailleurs été observé que les importines- $\alpha$  se lient directement à la chromatine ou agissent à titre de cofacteur afin de réguler certains gènes. Ce phénomène est observé plus particulièrement en situation de stress ou lors de cancers. D'autres rôles des importines- $\alpha$  ont été documentés dans la formation des granules de stress et du fuseau mitotique, lors de la mitose, dans la perméabilité des CPN et dans l'amplification de la signalisation de récepteurs retrouvés à la surface cellulaire [264, 269]. Ainsi, les importines- $\alpha$  agissent sur un ensemble de processus biologiques indépendamment de leur fonction primaire à titre d'adaptateurs de Kpn $\beta$ 1.

#### 1.3.1.3 Le gradient de RanGTP et le cycle d'import nucléaire

L'import d'une protéine débute par la reconnaissance de son SLN par une importine dans le cytoplasme de la cellule. Le complexe Importine- $\beta$ /cargo ou Kpn $\beta$ 1/Importine- $\alpha$ /cargo est alors recruté au CPN et traverse le canal central par l'interaction de l'importine- $\beta$  et de l'importine- $\alpha$  avec les NUPS [269]. Dans le noyau, une petite guanosine triphosphatase (GTPase) nommée Ran (pour « *RAS-related Nuclear protein* ») appartenant à la superfamille des protéines Ras s'associe

aux karyophérines. Cette protéine assure la directionnalité du transport nucléocytoplasmique par la concentration plus élevée de sa forme GTP dans le noyau que dans le cytoplasme [279]. Ainsi, RanGTP interagit avec le domaine N-terminal de l'importine- $\beta$  dans le noyau et force la dissociation irréversible du complexe Importine- $\beta$ /cargo ou Kpn $\beta$ 1/Importine- $\alpha$ /cargo en initiant un changement conformationnel [280-282]. Dans le cas des importines- $\alpha$ , cette dissociation par RanGTP est accélérée par la présence d'autres protéines, telles que RBBP4, et même par la formation de dimères de Kpn $\alpha$  [269, 283]. Le nouveau complexe importine- $\beta$ /RanGTP précédemment formé est alors recyclé et retourné au cytoplasme [269]. Dans le cas des importines- $\alpha$ , celles-ci s'associent aussi avec une RanGTP, ce qui a pour effet d'augmenter leur affinité pour l'exportine CAS [284, 285]. Le trimère Kpn $\alpha$ /RanGTP/CAS est à son tour recyclé jusqu'au cytoplasme (**Figure 16**).



**Figure 16. Représentation du cycle d'import d'un cargo et du recyclage subséquent des importines.**

Dans le cycle d'import classique, une Kpn $\alpha$  (vert) reconnaît un cargo contenant un SLN (mauve) dans le cytoplasme. Le recrutement de Kpn $\beta$  permet alors la formation d'un complexe qui transloque au noyau en passant par un CPN. Dans le noyau, RanGTP (rouge) lie Kpn $\beta$ 1 et cause la dissociation du complexe et la relâche du cargo. Kpn $\beta$ 1 est exporté jusqu'au cytoplasme en passant à nouveau par un CPN. Kpn $\alpha$  lie aussi une RanGTP et recrute l'exportine CAS (bleu) avant d'être exportée du noyau. Dans le cytoplasme, RanGTP est convertie en RanGDP (gris) et se dissocie des importines. Un nouveau cycle

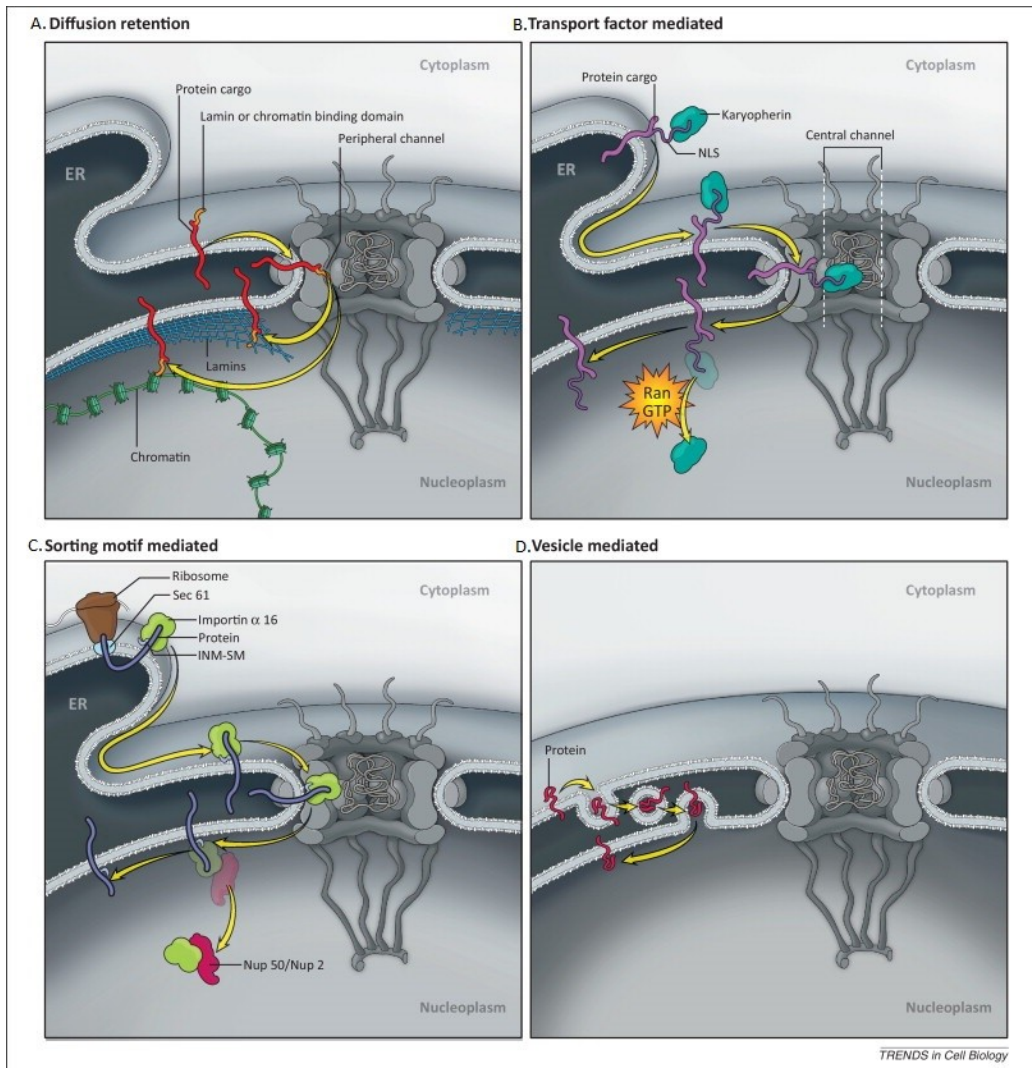
d'import peut alors commencer. Ce cycle est identique pour les importines bêta, mais ne nécessite pas la présence d'une Kp $\alpha$ . *Figure reproduite avec la permission de [264]. © 2018 The Japan Academy*

La dissociation de RanGTP et des importines est primordiale dans le cytoplasme et est médiée par la protéine activatrice de l'activité GTPase de Ran (RanGAP) associée à la protéine liant Ran 1 (RanBP1) [286]. RanBP1 induit un déplacement de la karyophérine associée à RanGTP afin de favoriser l'hydrolyse de cette dernière par RanGAP [287]. Un ensemble d'observations suggère que la protéine de liaison 2 (RanBP2 pour « *Ran-binding Protein 2* »), aussi nommée la Nup358, participe à la dissociation des complexes Importine- $\beta$ /RanGTP et Importine- $\alpha$ /RanGTP/CAS [288, 289]. RanBP2 est la composante majeure des filaments cytoplasmiques reliés au CPN et il a été démontré qu'elle parvenait à lier RanGTP, CAS et RanGAP [276, 290]. Sous sa forme GDP, Ran se dissocie des karyophérines et leur permet de s'associer à un cargo afin de débiter un nouveau cycle d'import. Afin de préserver le gradient de RanGTP, RanGDP s'associe avec un RTN n'appartenant pas à la famille des karyophérines- $\beta$  afin d'être transportée au noyau; la protéine NTF2 [291, 292]. Le facteur ayant une activité d'échange de la guanosine de Ran (RanGEF), aussi nommé le régulateur de la condensation de la chromatine 1 (RCC1), est fortement associé à la chromatine et échange la GDP de Ran pour une GTP [293]. Ainsi, la présence de RanGAP et RanGEF dans deux compartiments distincts mène à la formation d'un gradient de RanGTP nécessaire au transport nucléocytoplasmique [279]. La RanGTP nouvellement assemblée est alors disponible pour débiter un nouveau cycle d'export en s'associant à une karyophérine [293].

### **1.3.2 Transport nucléocytoplasmique des protéines membranaires**

Au contraire du transport nucléocytoplasmique des protéines solubles, celui des protéines transmembranaires est moins bien connu et fait actuellement l'objet d'un grand nombre de recherches. Tout comme les protéines solubles, certaines protéines membranaires nécessitent d'être transportées dans le noyau, plus précisément à la MNI, afin d'exercer leurs fonctions. Elles participent à un grand nombre de processus cellulaires essentiels en interagissant, par exemple, directement avec la chromatine, la lamina nucléaire ou avec d'autres protéines [207]. Or, le pore nucléaire représente un obstacle majeur à la translocation des protéines transmembranaires destinées à la MNI à la suite de leur synthèse au RE. Il est actuellement convenu que la majorité

des protéines membranaires, dont celles possédant plusieurs domaines transmembranaires, sont insérées dans la membrane du RE par le système Sec61 lors de leur traduction [229, 294]. Ainsi, les PTM sont associées à la MN lors de leur passage par le pore nucléaire [228, 295]. L'étude d'un ensemble de PTM suggère la coexistence de plusieurs mécanismes de transport régulant leur ciblage à la MNI [207, 228, 230, 296, 297]. Ceux-ci diffèrent sur des points cruciaux tels que la nécessité d'un apport énergétique, le rôle du CPN et la présence de signaux facilitant l'entrée des protéines dans le noyau. Le modèle de « diffusion-rétention » est le premier mécanisme à avoir été proposé et est soutenu par un grand nombre de publications (**Figure 17, A**) [298-302]. Or, d'autres évidences soutiennent des mécanismes de transport actif impliquant les importines ou des signaux de ciblage spécifiques (**Figure 17, B et C**) [230, 295]. Il est même proposé que certaines PTM médient leur propre translocation de la MNE à la MNI par la présence de répétitions FG dans leur séquence [303]. D'autres mécanismes incluent le transport par vésicules (**Figure 17, D**), l'utilisation de canaux de translocation et l'échange de protéines par le bris des membranes nucléaires. Ceux-ci ne jouent pas un rôle significatif dans le transport des PTM à la MNI dans les cellules de mammifères et ne seront pas abordés davantage [230]. Il est évident que plusieurs mécanismes agissent de concert dans le ciblage des PTM à la MNI et que ces exigences varient d'une protéine à l'autre. Alors que certaines atteignent passivement la MNI, d'autres nécessitent probablement la contribution d'un ou de plusieurs mécanismes de transport actif [207, 228, 297, 304].



**Figure 17. Les principaux modèles de transport des PTM à la MNI.**

**A.** Modèle de diffusion-rétention. Une PTM (rouge) diffuse à la MNI en empruntant un des canaux périphériques du pore nucléaire. La protéine est retenue à la MNI par des interactions entre un domaine de liaison (orange) et des composantes de la lamina nucléaire (bleu) ou de la chromatine (vert). **B.** Modèle de transport médié par un SLN. Une protéine (violet) possédant un SLN (violet foncé) recrute une importine (aqua) afin de passer par le CPN. Dans le noyau, RanGTP (jaune) sépare le complexe en s'associant avec l'importine. **C.** Modèle de transport dépendant d'un signal de ciblage à la membrane nucléaire interne. Une importine tronquée (vert) reconnaît l'INM-SM d'une PTM (mauve) lorsque celle-ci est insérée dans le RE par le translocon (brun). Le complexe passe par le CPN et la PTM est ensuite libérée dans la MNI. **D.** Modèle du transport vésiculaire. *Figure reproduite et modifiée avec la permission d'Elsevier [305]*



### 1.3.2.1 Le modèle de diffusion-rétention

Le modèle de diffusion-rétention suggère que la translocation des protéines membranaires de la MNO à la MNI implique un processus passif de diffusion qui est indépendant du transport des protéines solubles (**Figure 17, A**). Il n'est toutefois pas exclu qu'un apport en énergie soit nécessaire à une étape ou à une autre de ce mécanisme, comme ceci a été observé lors de certaines expériences [207]. Il a été proposé que cette énergie permet le remodelage du CPN et facilite ainsi le passage des protéines membranaires vers la MNI [306]. Or, Ungritch propose plutôt un rôle indirect de l'ATP sur la diffusion protéique en affectant la structure du RE et en limitant la mobilité des protéines dans ce compartiment [298]. Par la suite, les PTM empruntent les canaux latéraux du pore nucléaire afin d'accéder à la MNI et restent ainsi toujours associées aux membranes nucléaires lors de leur déplacement. L'interaction de certaines PTM avec des composantes du noyau, dont la lamina et la chromatine, assure la rétention et la concentration des protéines résidentes à la MNI. Ce premier modèle découle d'expériences effectuées notamment par les équipes de Torrisi, de Powel et de Soullam avant les années 2000 [299, 301, 302]. En combinant leurs observations, il est possible de conclure que des protéines membranaires, autant virales que cellulaires, peuvent diffuser librement de part et d'autre de la MN [299, 302]. De plus, la rétention de certaines PTM à la MNI est dépendante d'interactions avec des éléments nucléaires, exemplifiés par la protéine cellulaire p55 et la lamine A [302]. Pour terminer, le maintien d'un domaine nucléocytoplasmique inférieur à 60KD est primordial pour la translocation de certaines PTM par les pores nucléaires. L'augmentation artificielle de ce domaine mène à l'exclusion du LBR de la MNI et suggère un encombrement des canaux périphériques du CPN [301]. Plus récemment, des expériences de déplétions de NUPS, d'importines et d'autres constituantes du RE et de la MN, combinées à des modèles mathématiques, supportent le modèle de diffusion-rétention pour un grand nombre de protéines résidentes de la MNI [207, 296, 298, 300]. Parmi ces dernières figurent le LBR, SUN2 et LAP2 $\beta$ . Il est actuellement convenu que le modèle de diffusion-rétention représente le mécanisme principal de ciblage des PTM à la MNI.

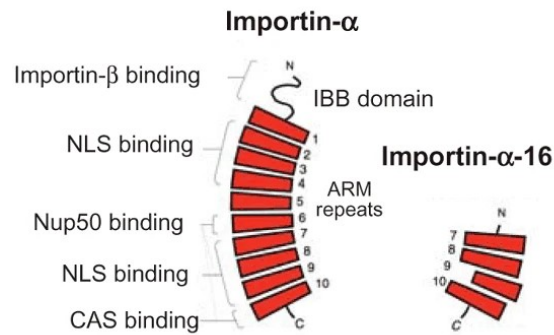
### 1.3.2.2. Le modèle de transport médié par un SLN

L'observation que certaines PTM nécessitent un apport en énergie pour transloquer vers la MNI a ouvert la porte à plusieurs modèles de transport actifs [306]. L'un de ceux-ci propose

que les PTM puissent emprunter le même mécanisme de transport que les protéines solubles (**Figure 17, B**). Ceci a été démontré pour la première fois dans l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) pour deux protéines de la MNI, Heh1 et Heh2, possédant des homologues dans les cellules de mammifères. La localisation adéquate de ces deux protéines à la MNI est dépendante du complexe Kpn $\beta$ /Kpn $\alpha$ , de Ran-GTP, d'une séquence semblable à un SLN et de nucléoporines spécifiques [307]. Subséquemment, l'utilisation d'un SLN par une PTM chez l'humain a été démontrée pour la protéine SUN2. Or, ce signal n'est pas suffisant et nécessite deux autres séquences pour médier la translocation de la protéine à la MNI [308]. Il devient alors évident que le transport actif des PTM nécessite des composantes supplémentaires que pour celui des protéines solubles. D'ailleurs, le rôle d'un domaine de liaison désordonné (ID pour « *Intrinsically disordered linker* ») situé entre les domaines transmembranaire et cytoplasmique est particulièrement évident chez les protéines ayant un poids moléculaire élevé [228]. Cette structure n'adopte pas de configuration secondaire ou tertiaire définie et permet à ces protéines de contourner la limite de 60kD imposé par les canaux latéraux [301]. Il est proposé que ce domaine se faufile dans la structure du pore nucléaire et permet à l'extrémité cytoplasmique, en association avec les importines, d'atteindre le canal central [207, 228, 309]. L'élimination du domaine ID n'inhibe pas complètement le transport des PTM à la MNI, mais diminue son efficacité en forçant l'utilisation des canaux périphériques [228]. Le rôle des importines dans le transport des PTM à la MNI a été démontré à plusieurs reprises dans les dernières années [207, 229, 230, 295, 307, 308]. Or, ce mécanisme ne semble s'appliquer qu'à un ensemble restreint de protéines et ne constituerait donc pas le modèle général de transport à la MNI. D'ailleurs, il a été récemment postulé que moins de 10% des protéines transmembranaires retrouvées à la MNI possèdent un SLN et un domaine ID assez large pour médier la translocation de leur domaine cytoplasmique par le canal central du pore nucléaire [228]. Ainsi, malgré des ressemblances avec le mécanisme de transport nucléocytoplasmique des protéines solubles, celui des PTM nécessite possiblement des facteurs additionnels.

### 1.3.2.3. Le modèle de transport dépendant d'un signal de ciblage à la membrane nucléaire interne (INM-SM pour « *Inner nuclear membrane sorting motif* »)

Ce modèle de transport actif propose que le mouvement de certaines PTM à la MNI soit médié par un signal indépendant du SLN (**Figure 17, C**). Ce mécanisme, énoncé pour la première fois par l'équipe de Braunagel en 2004, dérive d'expériences sur la protéine membranaire ODV-E66 du virus de la polyédrose nucléaire de la famille des *Baculoviridae* [310]. ODV-E66 possède un motif de ciblage à la MNI, nommé INM-SM, qui est suffisant pour sa translocation. Ce dernier est composé d'une séquence hautement hydrophobique de 18 à 22 aa accompagnée de plusieurs aa chargés positivement de 4 à 8 aa en C-terminal de celle-ci. Un motif semblable est d'ailleurs retrouvé chez plusieurs protéines résidentes de la MNI [310]. Lors de la synthèse de la protéine, l'INM-SM est reconnu par une forme membranaire et tronquée de l'importine- $\alpha$ ; l'importine- $\alpha$ -16. Cette dernière a été découverte lors de l'étude du transport des PTM dans des cellules de drosophiles et est produite à partir d'une méthionine alternative retrouvée dans le transcrite de l'importine- $\alpha$  [311]. Elle ne contient que 3.5 des 10 répétitions ARM habituellement retrouvées chez les importines- $\alpha$  et ne possède pas de domaine IBB (**Figure 18**) [312]. Elle est liée au translocon Sec61 $\alpha$ , ce qui facilite son association avec l'INM-SM lors de la traduction de la PTM [311]. À la suite de la reconnaissance de l'INM-SM, l'importine- $\alpha$ -16 reste associée à la PTM lors de l'étape de translocation de la MNO à la MNI. Étant donné sa taille de 16kD et en absence d'interaction avec Kpn $\beta$ 1, il est proposé que cette forme tronquée, associée à un cargo, emprunte les canaux latéraux du CPN en interagissant avec les répétitions FG de certaines nucléoporines (**Figure 17, C**) [207]. La présence d'un homologue de l'importine- $\alpha$ -16 chez l'humain, une forme tronquée de Kpn $\alpha$ 4, suggère que ce mécanisme est conservé entre les espèces. D'ailleurs, l'importine- $\alpha$ -16 interagit avec les séquences INM-SM prédites pour les protéines LBR et Nurim humaines [313].



**Figure 18. Comparaison des structures de l'importine-α et de l'importine-α-16.**

*Figure utilisée avec la permission de Springer Nature [324].*

### 1.3.2.3. Le modèle de transport facilité médié par les répétitions FG

Ce modèle de transport facilité suggère que certaines PTM agissent comme récepteurs et facilitent leur propre translocation vers la MNI. Ce mécanisme expliquerait l'enrichissement du nombre de répétitions FG observé chez les PTM de la MN par rapport aux PTM de l'ensemble du génome chez le rat [296]. D'ailleurs, l'ajout d'une séquence de quatre répétitions FG à des protéines membranaires augmente leur vitesse de translocation vers la MNI [296]. Cet enrichissement est aussi observé pour les protéines solubles retrouvées dans les fractions nucléaires de plusieurs types cellulaires [303]

Comme observé pour les importines, les répétitions FG permettraient aux PTM d'interagir avec les NUPS-FG présentes dans les canaux périphériques du pore nucléaire. Alors que la majorité de ces NUPS tapissent l'intérieur du canal central, la nucléoporine 53p (Nup53p) de la levure se situe à proximité des canaux latéraux et pourrait interagir avec les PTM destinées à la MNI [314]. Afin de soutenir cette hypothèse, la délétion de Nup35p, l'homologue de Nup53 chez la levure, diminue le taux de translocation d'une protéine membranaire contenant des répétitions FG artificiellement ajoutées [296]. *Schirmer et al.* suggère que ce mécanisme de transport représente une alternative ou un système de secours pour le transport médié par des récepteurs [303].

### 1.3.3 Détournement viral du transport nucléocytoplasmique

Que les virus se répliquent ou non dans le noyau d'une cellule, ceux-ci interagissent d'une manière ou d'une autre avec des éléments de ce compartiment que ce soit pour leur propre réplication ou pour inhiber la réponse antivirale de l'hôte [315]. La membrane nucléaire constitue donc une barrière importante pour le cycle de réplication des virus, qui ont développé divers mécanismes afin de la contourner. Pour se faire, les virus utilisent ou modifient le transport nucléocytoplasmique cellulaire à leur avantage. Plusieurs interagissent avec les karyophérines ou les CPNs afin de favoriser spécifiquement ou globalement le transport de leurs propres protéines. D'autres en tirent plutôt avantage dans le but de contrôler les réponses cellulaires telles que la réponse antivirale de l'hôte [329, 331, 332]. D'ailleurs, les virus ont joué un rôle clé dans la découverte et la compréhension de plusieurs composantes du transport nucléocytoplasmique [316].

#### 1.3.3.1 Détournement du transport nucléocytoplasmique par le VHS-1

Le transport nucléocytoplasmique participe à plusieurs étapes du cycle de réplication du VHS-1. Un grand nombre d'interactions entre les importines et des protéines virales ont été documentées dans les dernières années [103, 317-320]. Lors de l'entrée virale, Kpn $\beta$ 1 est essentielle et suffisante pour lier la capsid au noyau de la cellule [103]. La relâche du génome viral est par la suite médiée par l'interaction entre VP1/2 et Nup358, dont la liaison favorise l'amarrage de la capsid au CPN [316, 319]. Plus tard dans le cycle de réplication, des protéines virales récemment traduites dans le cytoplasme retournent dans le noyau en recrutant des importines. Par exemple, pU<sub>L</sub>30, VP19c, pU<sub>S</sub>11 et pU<sub>L</sub>3 possèdent tous au minimum un SLN dans leur séquence [316].

Le criblage des importines- $\alpha$ / $\beta$  par *Döhner et al.* a démontré que certaines importines semblent agir comme facteurs de restriction du VHS-1 [318]. Au contraire, d'autres paraissent plutôt favoriser sa réplication virale. Plus spécifiquement, Kpn $\alpha$ 2 jouerait un rôle important dans l'import de plusieurs protéines virales, dont VP22, dans l'assemblage des capsides et dans la sortie de ces dernières. Toutefois, le rôle précis joué par ces importines reste à clarifier.

### *gM et le transport nucléocytoplasmique*

Les données précédemment obtenues suggèrent un rôle des importines dans le cycle du VHS-1 et les connaissances actuelles sur le transport des protéines membranaires à la MNI soulèvent d'intéressantes questions par rapport au mécanisme ciblant gM au noyau [229, 307, 318, 321]. D'ailleurs, il a été récemment démontré par notre laboratoire que gM interagit avec le système de transport nucléocytoplasmique cellulaire pour son export. La présence de l'exportine 6 (XPO6) est nécessaire pour la relocalisation de gM de la MN au TGN tard dans l'infection [184]. Cette observation souligne un apport important du transport nucléocytoplasmique dans la localisation adéquate de gM à une étape précise de l'infection. Ceci supporte l'idée que la gM nouvellement produite pourrait aussi être activement ciblée à la MN au début de l'infection par un processus semblable. D'ailleurs, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire par une ancienne étudiante au doctorat, Imane El Kasmi, montrent que Kpn $\alpha$ 4, Kpn $\alpha$ 5 et Kpn $\alpha$ 6 pourraient jouer ce rôle (données non publiées). De plus, gM pourrait contenir un INM-SM au sein de sa séquence, mais les critères utilisés pour définir ce signal sont larges et nécessitent d'être validés expérimentalement [310, 321].

## Chapitre 2 – Objectif et hypothèse de recherche

L'identification du mécanisme utilisé par gM pour atteindre la membrane nucléaire interne représente l'une des premières étapes dans la compréhension de son rôle à ce compartiment aussi tôt dans l'infection. D'ailleurs, étant donné ses domaines transmembranaires, gM est un bon candidat afin d'approfondir nos connaissances sur le ciblage des protéines membranaires, autant virales que cellulaires, à la MNI. L'objectif de ce projet de recherche consiste donc à déterminer le rôle des importines cellulaires dans le ciblage de gM à la MNI tôt dans l'infection. Sur la base du mécanisme observé pour la protéine virale ODV-E66 par *Braunagel et al.* et de résultats préliminaires obtenus au laboratoire, nous posons l'hypothèse que le ciblage de gM au noyau est un processus actif [310]. Ce processus impliquerait le mécanisme de transport nucléocytoplasmique de la cellule et permettrait à gM d'être ciblée à la MNI par l'intermédiaire des importines, du pore nucléaire et d'un signal de ciblage à la MNI. Bien que gM soit dépourvue d'un SLN confirmé, elle semble posséder des séquences semblables à l'INM-SM de la protéine ODV-E66.

Pour étudier le rôle du transport nucléocytoplasmique dans ce mécanisme et faire suite aux résultats préliminaires obtenus précédemment au laboratoire, les 11 importines- $\beta$  humaines ont été ciblées par ARN interférents (ARNi). Certaines importines- $\alpha$  ont d'ailleurs été étudiées afin de confirmer et de valider les résultats précédemment obtenus. Par la suite, l'effet des importines sur la localisation cellulaire de gM après une infection de 4 heures a été évalué par microscopie confocale à fluorescence. En association avec les résultats obtenus pour les Kpn $\alpha$ , ceci a permis d'effectuer un criblage de toutes les importines humaines et d'observer si l'une ou plusieurs d'entre elles jouent un rôle dans le ciblage de gM à la MN à 4hpi.

## Chapitre 3 – Matériels et méthodes

### 3.1 Cellules et virus

Les cellules d'ostéosarcome 143B thymidine kinase négatives (TK<sup>-</sup>) ont été achetées d'ATCC (CRL-8303). Elles ont été maintenues en culture dans du *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Wisent bioproducts, 319-015-CL) supplémenté avec 5% de sérum de croissance bovine (BGS pour « *Bovine Growth Serum* ») (Médicorps) et 2mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich) dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Quinze mg/mL de 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU, Sigma-Aldrich) a été ajouté au milieu des 143B sauf lors de la transfection et de l'infection. Les HEK293 FLP-In ont été gracieusement fournies par le Dr Jason Young et modifiées au laboratoire par Bitu Khadivjam pour produire la lignée HEK293 FLIP-In GS-eGFP (HEK293 GS-eGFP). Ces cellules expriment une protéine fluorescente verte qui est fusionnée à la protéine G et au peptide de liaison à la streptavidine et purifiée avec l'étiquette TAP (pour *Tandem Affinity Purification*). Les pétris et les lamelles utilisés pour cultiver les HEK293 GS-eGFP ont tous été préalablement traités avec de la L-poly-lysine (Sigma-Aldrich, P8920-100mL) pour éviter le détachement des cellules. Les HEK293 GS-GFP ont été maintenues en culture dans du DMEM (Wisent bioproducts, 319-015-CL) supplémenté avec 5% de BGS (Médicorps), 2mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% de pénicilline et de streptomycine (Sigma-Aldrich, P4333-100mL) et 2µL/mL d'hygromycine B (Wisent, 450-141-x) pour maintenir une sélection sur les cellules exprimant la eGFP.

Le VHS-1 17<sup>+</sup> de type sauvage (obtenu de Valérie Preston) a été amplifié sur des cellules BHK (Fibroblastes de rein d'hamster, ATCC), puis le titre viral a été mesuré par un essai de plaques sur des cellules VERO (Cellules épithéliales dérivées de rein d'un singe, ATCC).

Les cellules et le virus ont été testés périodiquement pour la présence de mycoplasmes.

### 3.2 Anticorps

Les anticorps ont été utilisés pour l'immunofluorescence (IF) et la technique d'immunobuvardge (WB pour « *Western Blot* »). Les anticorps primaires utilisés et leur concentration sont les suivants : L'anti-gM PAS980 a été gracieusement fourni par le Dr Lynn



Enquist (IF : 1/300, WB : 1/5000). Les autres anticorps ont été achetés commercialement; l'anti-Kpna4 IMG-3569 (WB : 1/1000, Imgenex), l'anti-GFP 11-814-460-001 (WB: 1/500, Roche), l'anti-tubuline T6557 (WB : 1/5000, Sigma) et l'anti-ATPase sodium potassium alpha 1 (IF : 1/50, Affinity BioReagents). Les anticorps secondaires ont tous été achetés de Molecular probes (IF : 1/1000) et de Jackson ImmunoResearch (WB : 1/10 000).

### 3.3 Analyse de la séquence protéique de gM et de Kpna4

Le fichier texte de format FASTA représentant la séquence protéique de gM (GM\_HHV11, P04288, Uniprot) a été soumis à différents programmes bio-informatiques pour déterminer la présence de SLN, de régions ID et la position des domaines transmembranaires de gM. Les programmes utilisés sont : [NetSurfP-2.0](#), [PrDOS](#), [SPOT-Disorder2](#), [s2D](#), [IUPred](#), [PredictProtein](#), [TMHMM 2.0](#), [Quick2D](#), [NLS Mapper](#), [NLStradamus](#), [seqNLS](#). Trois programmes différents ont été minimalement utilisés pour chaque critère afin de comparer les résultats obtenus.

Les séquences de Kpna4, Kpna4-26 et Kpna4-16 précédemment déterminées par *Braunagel et al.* ont été alignées dans le programme SnapGene® (GSL biotech, disponible à [Snapgene.com](#)), puis comparées avec les régions ciblées par les 3 DsiRNA contre Kpna4 (hs.Ri.KPNA4.13, TriFECTa RNAi kits, IDT). Les exons ciblés ont été déterminés à partir de la séquence codante de Kpna4 (CDS, Séquence de référence NCBI : [NM\\_002268.5](#)) telle que présentée dans la base de données « Nucleotide » du NCBI (pour « *National Center for Biotechnology Information* »).

### 3.4 Production de plasmides pour CRISPR

Le plasmide eSpCas9(1.1) (Addgene, #71814) code pour une Cas9 possédant une plus haute spécificité que la Cas9 conventionnelle [322]. Ce plasmide possède un site de restriction BbsI qui permet l'ajout d'une séquence codant pour l'ARN guide (ARNg) de notre choix. Pour ce faire, le plasmide a été premièrement digéré avec l'enzyme de restriction à haute-fidélité BbsI (NEB, R3539S) pendant 15 minutes dans un thermomixeur (Eppendorf) à 600 RPM et 37 degrés Celsius. Comme contrôle de ligation, le plasmide a aussi été digéré avec l'enzyme de restriction à haute-fidélité EcoRI (NEB, R3101S). L'enzyme a ensuite été inactivée pendant 20 minutes à 65

degrés, puis le plasmide digéré a été purifié sur un gel d'agarose 1%. L'extraction de l'ADN a été effectuée avec le « *QIAquick gel extraction kit* » (Qiagen, 28706) selon le protocole du manufacturier, puis sa concentration a été mesurée par Nanodrop. Parallèlement, deux oligonucléotides (IDT) correspondant aux brins sens et antisens codant pour l'ARNg désiré ont été associés et phosphorylés par PCR, puis dilués dans de l'eau ultrapure (Wisent, 809-115-CL). Ces séquences possèdent des extrémités complémentaires aux extrémités cohésives produites par la digestion du plasmide avec l'enzyme BbsI. La ligation entre l'ADN double-brin (ADNdb) précédemment formé et le plasmide digéré a été effectuée pendant 15 minutes à 4 degrés, puis de 8 à 12 heures à 16 degrés Celsius avec la ligase T4 (NEB, M0202S). L'enzyme a ensuite été inactivée pendant 10 minutes à 65 degrés, puis le plasmide contenant la séquence de l'ARNg a été cloné dans des bactéries *E. coli* H5α. Ces bactéries ont été préalablement traitées au laboratoire pour devenir chimiquement compétentes. Une sélection avec 0,1mg/mL d'ampicilline a permis de sélectionner les clones ayant incorporé le plasmide d'intérêt. 6 clones provenant de chaque condition ont été sélectionnés et leurs plasmides ont été extraits avec le « *Monarch Plasmid Miniprep kit* » (NEB, T1010L) selon le protocole du manufacturier. Les plasmides obtenus ont été envoyés à l'IRIC (Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie) pour valider leur séquence. Un clone de chaque condition a ensuite été sélectionné pour l'amplification et la purification du plasmide avec le « *NucleoBond Xtra Plasmid Midi Prep kit* » (Macherey-Nagel, 740410.100) selon le protocole du manufacturier. La concentration finale de chaque plasmide a été déterminée avec un Nanodrop.

Les oligonucléotides (IDT) ont été conçus avec le programme [E-CRISP design](#) selon le paramètre dit « Moyen » (**Tableau 4**) [323]. Les organismes ciblés sont, pour la eGFP, *Aequorea victoria* et, pour KPNA4, l'humain. Les séquences #1 et #2 contre la eGFP ont été conçues par Christiane Boen, une ancienne stagiaire au laboratoire. La séquence #3 de la eGFP ne possède pas la séquence PAM (Pour « *Protospacer Adjacent Motif* »). La séquence #4 de la eGFP est tirée et validée de [324].

**Tableau 4.** – Séquences utilisées pour produire les ADNdb codant pour l'ARNg

Cible	#	Séquence (5' vers 3')	
eGFP	1	S: CACCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGAGG	AS: AAACCCTCCCTGAGCAAAGACCCCAAC
	2	S: CACCGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGG	AS: AAACCCTGGCCCACCCTCGTGACCAC
	3	S: CACCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGG	AS: AAACCCTGAGCAAAGACCCCAAC
	4	S: CACCGAAGTTCGAGGGCGACACCC	AS: AACGGGTGTCGCCCTCGAACTTC
KPNA4	1	S: CACCGCTGTGGGCAACATTGTTACTGG	AS: CGACACCCGTTGTAACAATGACCCAAA
	2	S: CACCGTTGTGCAAGTAGTACTCGATGG	AS: CAACACGTTTCATCATGAGCTACCCAAA

**Légende** : S = Brin sens; AS = Brin antisens.

### 3.5 Transfection des plasmides eSpCAS9

Un passage 1/3 dans des pétris contenant des lamelles ou dans des plaques de 6 puits vides a été effectué avec les HEK293 GS-eGST. Le lendemain, le milieu des plaques 6 puits a été remplacé par du DMEM frais de 30 à 60 minutes avant la transfection. Pour les lamelles, celles-ci ont été transférées dans des plaques 24 puits contenant du DMEM frais. Les cellules ont ensuite été transfectées avec l'agent de transfection LipoD293 (SignaGen, SL100668) et les plasmides correspondants selon un ratio respectif de 3 pour 1 comme indiqué par le manufacturier. Les cellules ont été incubées pendant 24h, puis préparées pour la microscopie ou récoltées pour l'immunobuvardage.

#### 2.11 Immunobuvardage

Les cellules ont été récoltées dans du RIPA buffer (pour « *Radioimmunoprecipitation assay buffer* », 20% SDS, 1% NP-40, 1% acide désoxycholique, 150 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.4 et supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)) et incubées pendant 30 minutes à 4 degrés Celsius sur une plaque rotative. L'ADN contaminant a été éliminé en traitant toutes les conditions pendant 1h à 10 degrés Celsius avec 1,25µL de DNaseI 20 000U/mL (Roche) et 1µL de MgCl<sub>2</sub> par 50µL d'échantillon. Le surnageant a ensuite été récupéré après une centrifugation de 15 minutes à 14 000RPM et 4 degrés. Lorsque nécessaire, une quantification avec le « *Pierce BCA protein assay kit* » (Thermoscientific, 23227) a été effectuée selon les instructions du

manufacturier et la concentration en protéine a été déterminée avec le Clariostar (BMG LABTECH).

Puisque gM est une protéine qui précipite lorsqu'exposée à une température trop élevée, 25µg de chaque échantillon a été dénaturé (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bleu de bromophénol, 10% glycérol et 2% β-mercaptoéthanol) pendant 1h à 37 degrés, puis pendant 2 minutes à 56 degrés. Les échantillons ont été séparés sur un gel SDS-PAGE de 8% pendant 1h30 à 120V, puis transférés sur une membrane de PVDF (pour PolyVinylidene DiFluoride, Bio-rad, 1620177) pendant 1h à 4 degrés et 0,3A. Par la suite, la membrane a été bloquée pendant 1h dans du PBS-Tween (13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0.1% Tween 20) contenant 5% de poudre de lait écrémé, puis incubée pendant 1h avec les anticorps primaires correspondants. Trois lavages de 5 minutes sur une plaque agitatrice ont été effectués dans du PBS-Tween, puis la membrane a été incubée pendant 45 minutes avec les anticorps secondaires correspondants. Après 3 autres lavages, les bandes ont été révélées avec le « ECL kit » (Biorad, 170-5060) selon les instructions du fabricant et les images ont été prises avec le G : Box (Syngene).

### 3.6 Transfection des DsiRNA

Les ARN interférents (ARNi) utilisés nommés DsiRNA (pour « *Dicer-substrate Short Interfering RNA* ») sont préconçus et optimisés pour être plus facilement transformés que les ARNi traditionnels par l'enzyme Dicer [325]. Un ensemble de 3 DsiRNA est fourni pour chaque cible (TriFECTa RNAi kits, IDT). Les DsiRNA et les concentrations utilisés sont les suivants; KPNA1 (100nM; hs.Ri.KPNA1.13), KPNA2 (100nM; hs.Ri.KPNA2.13), KPNA3 (100nM; hs.Ri.KPNA3.13), KPNA4 (100nM; hs.Ri.KPNA4.13), KPNA5 (100nM; hs.Ri.KPNA5.13), KPNA6 (100nM; hs.Ri.KPNA6.13), KPNB1 (50nM; hs.Ri.KPNB1.13), TNPO1 (100nM; hs.Ri.TNPO1.13), TNPO2 (100nM; hs.Ri.TNPO2.13), TNPO3 (100nM; hs.Ri.TNPO3.13), IPO4 (50nM; hs.Ri.IPO4.13), IPO5 (100nM; hs.Ri.IPO5.13), IPO7 (100nM; hs.Ri.IPO7.13), IPO8 (100nM; hs.Ri.IPO8.13), IPO9 (100nM; hs.Ri.IPO9.13), IPO11 (100nM; hs.Ri.IPO11.13) et IPO13 (100nM; hs.Ri.IPO13.13). Comme contrôle négatif, des cellules ont été transfectées avec un DsiRNA ne ciblant aucune séquence chez l'humain (50 et 100nM; DS NC1, IDT). Les 143B ont été passées dans des plaques contenant

6 ou 96 puits pour obtenir une confluence d'environ 20% le lendemain. Le jour de la transfection, le milieu a été remplacé par du DMEM frais de 30 à 60 minutes avant la transfection. Un mélange contenant 3 ARN interférents à une concentration finale de 50 ou 100nM contre la même cible a ensuite été ajouté aux cellules en combinaison avec le Lipojet tel que suggéré dans le protocole du manufacturier (Signagen, SL100468). Après 24h de transfection, du DMEM frais a été ajouté au milieu pour fournir les nutriments nécessaires à la croissance des cellules et l'incubation a été poursuivie pendant 24h supplémentaire pour un total de 48h. La durée de la transfection a été déterminée par rapport à la stabilité et au temps de demi-vie des importines tels que calculés par l'outil [Protparam](#) (ExpASy). Par la suite, les cellules ont été infectées ou utilisées pour le test de viabilité cellulaire.

### **3.7 Viabilité cellulaire**

Les 143B ont été passées dans une plaque 96 puits à fond noir afin d'obtenir une confluence d'environ 20% le lendemain. Une transfection de 48h avec les DsiRNA contre toutes les cibles et le contrôle négatif a été effectuée sur les cellules. Chaque cible a été testée en triplicata sur la même plaque et l'expérience a été répétée 3 fois. Au moment du test de viabilité, 10% d'Alarmablu High sensitivity (AB HS) (Invitrogen, A50100) a été ajouté à tous les puits contenant des cellules. Pour éliminer le bruit de fond, une correction de la fluorescence a été effectuée avec un contrôle négatif contenant 100 µL de DMEM sans BrdU et 10 µL d'AB HS (AB HS 0% oxydé). Cent-dix µL d'AB HS autoclavé dans du DMEM sans BrdU (Dilution 1 dans 100) ont été ajoutés à trois autres puits. Cette condition est complètement oxydée par le traitement à l'autoclave et représente le signal maximal pouvant être obtenu avec l'AB HS (AB HS 100% oxydé). Après une incubation de 3h, la fluorescence de chaque puits a été lue avec le SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices) ou le Clariostar (BMG LabTech) en utilisant une excitation de 560nm et une émission de 590 nm telles que spécifiées par le manufacturier (Invitrogen).

### **3.8 Infection**

Les 143B ont été passées à une concentration de 60 000 cellules par puits dans une plaque de 6 puits contenant des lamelles de microscopie, puis transfectées 24h plus tard avec les DsiRNA ciblant différentes importines. Après 48h de transfection, les cellules ont été infectées avec le

VHS-1 17<sup>+</sup> de souche sauvage à une multiplicité d'infection de 2 pendant 4 heures. Pour ce faire, le milieu cellulaire a été remplacé par du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Wisent bioproducts, 350-000-CL) supplémenté avec 0,1% de *bovine serum albumin* (BSA, Sigma-Aldrich) contenant du virus. Comme contrôle, des cellules ont aussi été incubées avec du RPMI ne contenant pas de virus. Le virus a été adsorbé pendant 1h à 78 RPM sur une plaque agitatrice, puis du DMEM sans BrdU a été ajouté à tous les puits. Après 4h d'incubation à 37 degrés Celsius, les cellules ont été fixées pour l'immunofluorescence ou récoltées pour la RT-qPCR.

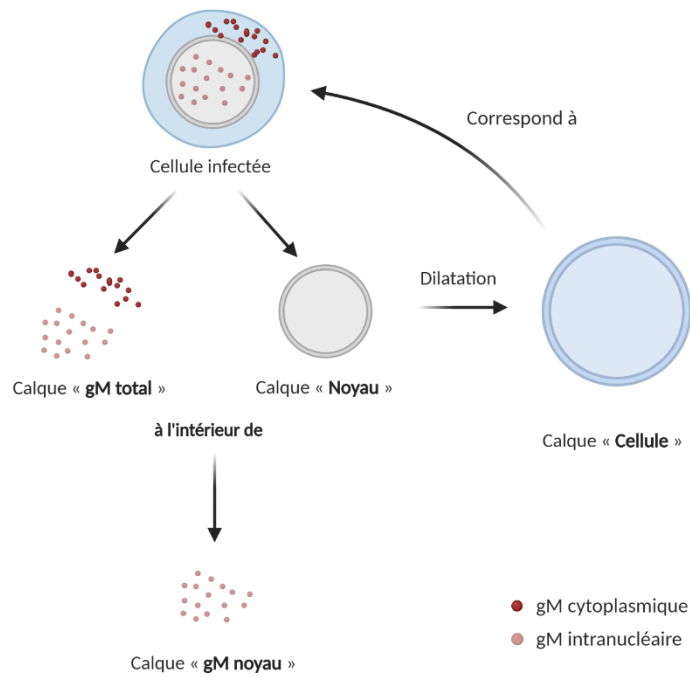
### **3.9 Immunofluorescence et localisation cellulaire de gM**

À la suite de l'infection, chaque puits a été lavé 2 fois avec du PBS 1x froid, puis incubé pendant 20 minutes à 4 degrés Celsius avec du PFA 4%. Les puits ont été lavés à nouveau, puis les cellules ont été perméabilisées avec du PBS contenant 0,1% de Triton X-100 (Sigma) pendant 4 minutes. Après un autre lavage, les lamelles ont été transférées dans des chambres humides et bloquées pendant 30 minutes avec 10% de sérum de bœuf fœtal (FBS, Wisent bioproducts). À la suite de cette étape, les lamelles ont été incubées pendant 1h avec du FBS 10% contenant les anticorps primaires contre l'ATPase sodium potassium alpha et gM avant d'être lavées 3 fois dans du PBS 1x. Une seconde incubation de 45 minutes avec les anticorps secondaires dans du PBS 1x a été effectuée, puis les lamelles lavées à nouveau avant d'être montées sur des lames avec 10  $\mu$ L de Dako (Dako) contenant 10  $\mu$ g/mL d'Hoechst 33342 (Invitrogen). Les lames ont été séchées à l'abri de la lumière pendant 1 à 2h dans un incubateur à 37 degrés Celsius ou toute la nuit à la température de la pièce avant d'acquérir les images au microscope.

Pour chaque condition, la localisation cellulaire 2D de gM a été déterminée manuellement à la suite de l'acquisition des images avec le microscope confocal inversé TCS SP8 (Leica). Une quantification 3D a été effectuée pour les conditions NC1, Kpn $\beta$ 1, TNPO2, IPO13, Kpn $\alpha$ 1, Kpn $\alpha$ 4 et Kpn $\alpha$ 6 avec le même microscope par l'acquisition de Z-stacks. Le ratio de gM à l'intérieur du noyau par rapport à l'ensemble de la cellule a été analysé avec le module d'analyse 3D du programme Leica Application Suite X (LAS X, Leica). Toutes les images ont été acquises avec un objectif 63x à immersion.

### 3.10 Analyse 3D

À la suite de l'acquisition des images, celles-ci ont été analysées avec le programme Leica Application Suite X et son extension d'analyse 3D (LAS X, Leica). Avec le programme, des calques ont été appliqués pour délimiter 4 éléments; le noyau (« noyau »), le signal total de gM dans la cellule (« gM total »), le signal de gM dans le noyau (« gM noyau ») et la cellule entière (« cellule ») (**Figure 19**). Les deux derniers calques ont été produits à partir des deux premiers. Le calque « gM noyau » a été créé en acceptant seulement le signal de « gM total » aussi inclut dans le « noyau ». Le calque représentant la cellule entière (« cellule ») a été dérivé du « noyau ». L'utilisation du mode « dilatation » du programme d'analyse sur le calque « noyau » a pour effet de produire un noyau élargi. Ce nouveau noyau englobe la majorité du cytoplasme de la cellule correspondante, tel qu'observé par comparaison avec des images en champs clair (**Figure 28**). L'utilisation du calque « cellule » a permis d'associer les calques « gM total » et « gM noyau » à une même cellule afin de comparer leur intensité relative. Une analyse a donc été effectuée en comparant la somme de l'intensité du signal de « gM noyau » sur celle de « gM total » pour chaque cellule. Le ratio obtenu représente le pourcentage de gM présent dans le noyau de chaque cellule analysée.



### Figure 19. Représentation schématique des 4 calques utilisés pour l'analyse 3D.

Les calques « gM total » (points rouge foncé et rouge clair) et « Noyau » (gris, cercle avec une membrane double) sont directement appliqués à une cellule infectée (bleu, cellule contenant une membrane simple) avec le programme d'analyse LasX. Le calque « Noyau » est ensuite dilaté afin de produire le calque « Cellule » (bleu, cercle avec une membrane double). Ce calque est l'équivalent de la cellule infectée et est utilisé pour la délimiter. Le signal présent inclusivement dans les calques « gM total » et « Noyau » est utilisé pour produire un 4e calque contenant le gM retrouvé seulement dans le noyau « gM noyau » (points rouges clairs). Figure créée avec BioRender.

## 3.11 Extraction d'ARN et RT-qPCR

Pour déterminer l'efficacité des DsiRNA, des 143B ont été transfectées pendant 48h, puis leur ARN a été récolté et extrait avec le « *SV Total RNA Isolation System kit* » (Promega, z3100) selon le protocole du manufacturier. La concentration finale d'ARN a été déterminée avec le NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). La même quantité d'ARN pour toutes les conditions a été employée pour la production d'ADN complémentaire (ADNc) en normalisant avec l'échantillon contenant la plus faible concentration. Le « *high-capacity cDNA reverse transcription with RNase inhibitor kit* » a été utilisé pour l'étape de transcription inverse selon le protocole du manufacturier (Applied Biosystems, 4374966). Pour chaque condition, une deuxième réaction sans transcriptase inverse a permis de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique. La quantité relative de chaque cible a ensuite été déterminée par qPCR avec le « *SYBR Green PCR master mix* » (Quantabio, 95054-02K). Un volume total de 25 µL par puits a été analysé avec le LightCycler 96 et son programme d'analyse (Roche). L'efficacité de la déplétion par DsiRNA a été déterminée en normalisant tous les résultats sur la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et en calibrant avec le contrôle NC1. Pour chaque paire d'amorces, l'efficacité de la réaction de qPCR a été ajustée avec une courbe standard.

Les amorces ont été conçues avec le programme [Primer3web](#) (version 4.1.0) à partir des séquences codantes disponibles sur NCBI pour les importines et le contrôle GAPDH (**Tableau 5**).



**Tableau 5. – Séquences utilisées pour cibler l’ADNc lors de la qPCR**

<b>Cible</b>	<b>Amorces (5' vers 3')</b>	
KPNA1	<b>S:</b> GGAGGGAGGAAGAAGGATG	<b>AS:</b> TGTTGCTGAAAGCTGTTGCT
KPNA2	<b>S:</b> ACCAAGGCTGTGGTAGATGG	<b>AS:</b> GAACTGCAAGGAGAGCCAAC
KPNA3	<b>S:</b> TCAGGAGATTTTGCCAGCTT	<b>AS:</b> CGGTGCCAGTCACTATGTTG
KPNA4	<b>S:</b> TGGGCATTGGGAAATATCAT	<b>AS:</b> AACACAAAGGGCTGGAAGAA
KPNA5	<b>S:</b> GTGATTGAAACTGGGGCTGT	<b>AS:</b> CGGCAT TTCTTGTTGTTGTG
KPNA6	<b>S:</b> CGTGGGTAACATCGTCACTG	<b>AS:</b> CGTGGGTAACATCGTCACTG
KPNB1	<b>S:</b> TTGGGGAATGAGAACGTCCA	<b>AS:</b> AGTCTGACTTGCCACCTGG
TNPO1	<b>S:</b> CAGCACTGCAGTCTGGATTC	<b>AS:</b> AGCCAGGCCACTCAGTAAAT
TNPO2	<b>S:</b> TCATCCATGTCAAGCCCTGT	<b>AS:</b> CAGTGTCTTGGGTGTGTTGG
TNPO3	<b>S:</b> CTGCTTCGACTGTGTATGC	<b>AS:</b> AAGACCTTGGCCTGGAGTAC
IPO4	<b>S:</b> CCTACATGCAGGCAGTGAAC	<b>AS:</b> AACATGGCGTCGTATTCAGC
IPO5	<b>S:</b> CACTGGTTGTCTTGGCTTCC	<b>AS:</b> CTCGTGCATTTCTCCTCCG
IPO7	<b>S:</b> TCGTGGAAGCAGCCTTAGAA	<b>AS:</b> AGAGCACAGAGTCGAGAAC
IPO8	<b>S:</b> AATCCCAGTACGACAGGCA	<b>AS:</b> GGCCAGTGACCAGGAAAATC
IPO9	<b>S:</b> CACAGATGCCACTTGTTGCT	<b>AS:</b> TGCTGTACCACGGGAAAGAT
IPO11	<b>S:</b> GCCCTGAAACTCTGAAGCC	<b>AS:</b> TACTTCAGTGCATGGCCTCA
IPO13	<b>S:</b> GGGCTTCTCTCCAACCTCTT	<b>AS:</b> TCCAGCAGCGTCTTAACAGA
GAPDH	<b>S:</b> TGTTGCTGAAAGCTGTTGCT	<b>AS:</b> TTGATTTTGGAGGGATCTCG

**Légende** : S = Amorce sens; AS = Amorce antisens.

### 3.12 Statistiques

Les résultats de la viabilité cellulaire et des analyses 2D et 3D ont été normalisés sur le contrôle NC1 tel que mentionné dans les légendes des figures correspondances. Pour l’efficacité de la déplétion par DsiRNA, les résultats ont été normalisés sur GAPDH, puis calibrés avec le contrôle NC1. Lorsque nécessaire, des tests T bilatéraux non appariés ont été effectués avec le logiciel GraphPad Prism 8.

## Chapitre 4 – Résultats

### 4.1 Analyse de la séquence protéique de gM

Considérant les divers modèles de ciblage des PTM aux membranes nucléaires, la séquence de gM a été analysée pour déterminer si elle présente des signatures correspondant à des INM-SM, des SLNs ou à des ID (**Figure 20**). Des 8 domaines transmembranaires (DTM), 4 d'entre eux possèdent les caractéristiques d'un INM-SM et répondent aux deux critères tels qu'énoncés par *Braunagel et al.* [310, 326-328]. Ainsi, les DTM 2, 4, 6 et 8 sont des séquences hautement hydrophobes d'environ 22 aa et possèdent des aa chargés positivement à leur C-terminal faisant face au cytoplasme. Ces aa se trouvent d'ailleurs à moins de 8 aa de la séquence DTM respective (**Figure 20**). Des trois programmes informatiques utilisés, 2 d'entre eux ont détecté la présence d'un possible SLN dans la portion C-terminale de la protéine [329-331]. La longueur du SLN varie entre les deux programmes, mais les deux séquences détectées se chevauchent et renforcent le résultat obtenu. Le programme [NLS Mapper](#) classe ce SLN comme étant faible. Par la suite, deux domaines ID dans la protéine correspondant aux portions N- et C-terminales de la protéine ont été détectés [40, 328, 332-334]. Ainsi, gM possède dans sa séquence protéique un possible SLN, 4 possibles INM-SM et deux ID. À la lumière de ces résultats bio-informatiques, il est donc possible qu'une importine guide gM aux membranes nucléaires comme c'est le cas pour plusieurs autres protéines transmembranaires [228, 295, 297, 307].



**Figure 20. La séquence protéique de gM possède 1 SLN et 4 INM-SM présumés.**

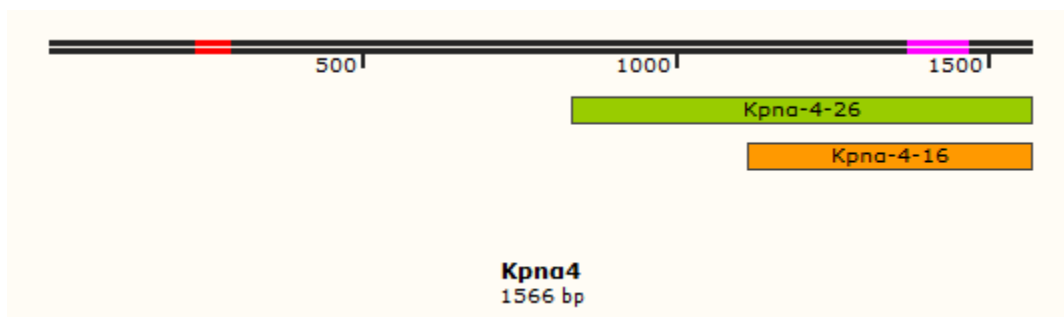
Les 8 domaines transmembranaires (DTM, mauve) de gM sont des séquences de plus ou moins 22 aa hydrophobiques. 4 des 8 DTM sont suivis d’aa chargés positivement (rouge) à leur extrémité C-terminale faisant face au cytoplasme et répondent aux critères définissant un INM-SM. Un SLN de grandeur variable a été détecté par deux programmes informatiques (Vert foncé et vert fluorescent) alors que tous les programmes utilisés ont détecté la présence de domaines ID (turquoise). La figure a été produite avec le programme SnapGene® (GSL biotech, disponible à [Snapgene.com](http://Snapgene.com))

## 4.2 Déplétion des importines ciblées par DsiRNA

Les 143B sont des cellules humaines provenant d’un ostéosarcome. Elles ont été sélectionnées pour ce projet puisqu’elles sont particulièrement résistantes aux effets cytopathiques engendrés par le VHS-1 lors de sa répllication [188]. Cette particularité fait des 143B un choix intéressant pour l’étude de la localisation des protéines par microscopie. De plus, elles ont été précédemment utilisées au laboratoire pour étudier la localisation de gM à 4hpi et le projet actuel fait suite à ces expériences [188]. Les HEK93 GS-GFP ont plutôt été utilisées comme contrôle visuel pour déterminer l’efficacité de l’approche par CRISPR. Ces cellules expriment de façon constitutive la eGFP. En présence d’une diminution de l’expression de la eGFP, une diminution de la fluorescence des HEK293 GS-eGFP devrait aussi être observée.

Afin d'évaluer l'impact des importines sur le transport de gM au noyau, nous avons opté pour la réduction du niveau d'expression de chaque importine. Initialement, une délétion des importines par CRISPR a été envisagée. Pour ce faire, des guides d'ARN spécifiques contre Kpn $\alpha$ 4 et la eGFP, un contrôle, ont été clonés dans un plasmide codant pour la protéine Cas9. Des cellules 143B ou HEK293 GS-eGFP ont ensuite été transfectées avec les plasmides, puis l'efficacité de la délétion a été respectivement évaluée par immunobuvardage et par microscopie. Malheureusement, aucun de ces réactifs n'est parvenu à diminuer l'expression de Kpn $\alpha$ 4 ou de la eGFP. Ces premiers guides d'ARN contenaient la séquence PAM. Cette séquence est située à proximité de la séquence sur le génome reconnue par la Cas9 et n'est habituellement pas incluse dans le guide d'ARN [335]. Une deuxième tentative a donc été effectuée en enlevant ces séquences des guides d'ARN précédemment utilisés. En parallèle, un ARN guide contre la eGFP validé dans la littérature a aussi été testé. Tout comme les premiers guides d'ARN, aucune déplétion de la eGFP n'a été détectée (données non présentées) [324].

L'incapacité d'obtenir une diminution de l'expression de la eGFP et de Kpn $\alpha$ 4 nous a conduits à utiliser les ARN interférents, une technique maîtrisée et utilisée de routine au laboratoire. Or, puisque *Braunagel et al.* proposent que la forme tronquée de Kpn $\alpha$ 4, Kpn $\alpha$ -4-16, pourrait jouer un rôle dans le ciblage des PTM à la MNI, la spécificité des DsiRNA employés a été vérifiée manuellement [313]. Pour se faire, les sites ciblés par les DsiRNA contre Kpn $\alpha$ 4 ont été alignés avec la séquence de cette importine et de ses isoformes Kpn $\alpha$ -4-26 et Kpn $\alpha$ -4-16. L'une des paires d'ARN cible le 3' UTR de l'ARNm alors que l'autre paire affecte l'un des derniers exons de ce même ARNm, assurant ainsi la perturbation des trois isoformes (**Figure 21**). Il est à noter que le DsiRNA ciblant le 3'UTR n'est pas illustré dans la figure ci-dessous puisque c'est la séquence protéique de l'importine qui est présentée. Ainsi, l'alignement obtenu confirme que deux des trois paires de DsiRNA (**Figure 21**, DsiRNA rose et DsiRNA 3'UTR, non illustré) contre Kpn $\alpha$ 4 ont aussi la capacité d'affecter les isoformes Kpn $\alpha$ -4-26 et Kpn $\alpha$ -4-16. Puisqu'un mélange de 3 DsiRNAs est normalement utilisé pour dépléter chaque importine, les DsiRNAs contre Kpn $\alpha$  devraient être testés individuellement pour s'assurer qu'ils sont tous fonctionnels.



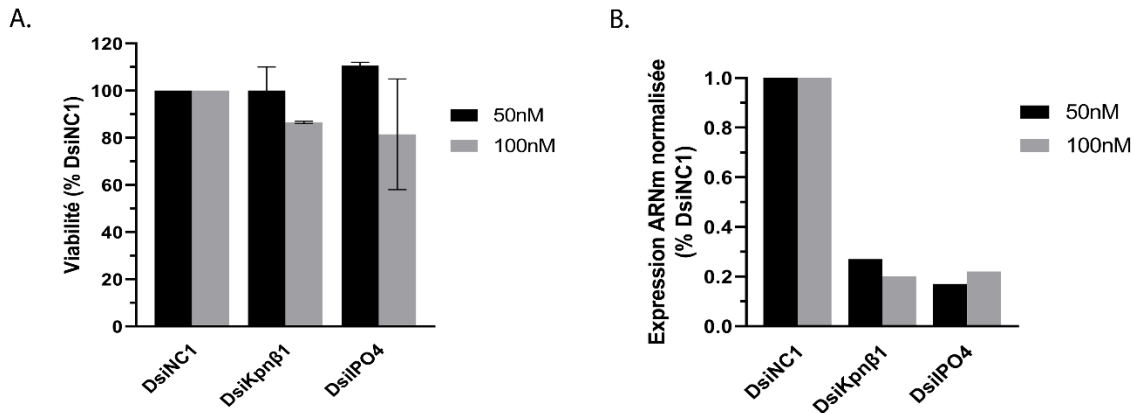
**Figure 21. Les DsiRNA utilisés contre Kpnα4 ciblent aussi ses deux isoformes.**

Les séquences de Kpnα4 (noire), Kpnα-4-26 (verte) et Kpnα-4-16 (orange) ont été alignées avec les régions ciblées par deux des trois DsiRNA utilisés contre Kpnα4 (rouge et rose). Le troisième DsiRNA cible la séquence 3'UTR (pour « untranslated region ») de l'ARNm et n'a donc pas été ajouté au schéma. La figure a été produite avec le programme SnapGene® (GSL biotech, disponible à [Snapgene.com](http://Snapgene.com)).

Par la suite, l'impact de la déplétion des importines sur l'apparence générale des cellules a été évalué par microscopie optique en contraste de phase après 48h de transfection. L'analyse visuelle des cellules a révélé une diminution accentuée de la confluence de deux conditions (Kpnβ1 et IPO4) par rapport au contrôle NC1 (données non présentées). Ces résultats suggèrent que la déplétion de ces deux importines est toxique pour les cellules et que la concentration de DsiRNA employée doit être diminuée. D'ailleurs, cet effet était attendu pour Kpnβ1, car cette importine médie la majorité de l'import nucléocytoplasmique et participe à plusieurs autres processus cellulaires indépendants du transport [256, 318].

Avant d'ajuster la concentration des DsiRNA contre Kpnβ1 et IPO4, leurs effets sur le métabolisme cellulaire et sur la déplétion des importines ont été évalués avec un essai de viabilité et une RT-qPCR. Contre toute attente, à la concentration initiale de DsiRNA (100nM), la faible confluence cellulaire décrite précédemment n'était pas accompagnée d'une diminution marquée de la viabilité par AlamarBlue High-Sensitivity (AB HS) (**Figure 22, A. Voir 100nM**). La capacité des cellules à réduire ce produit est un indicateur de leur activité métabolique et est facilement détectable par fluorescence avec un lecteur de plaque [336]. Ce test est d'autant plus important sachant que l'efficacité de l'infection est dépendante de l'état métabolique des cellules [337]. Or, une concentration de 50nM au lieu de 100nM n'affecte pas l'efficacité de la déplétion des deux importines (**Figure 22, B**) en plus d'améliorer la confluence visuelle des cellules (données non

présentées). La concentration de 50nM a donc été sélectionnée pour les DsiRNA ciblant Kpnβ1 et IPO4.

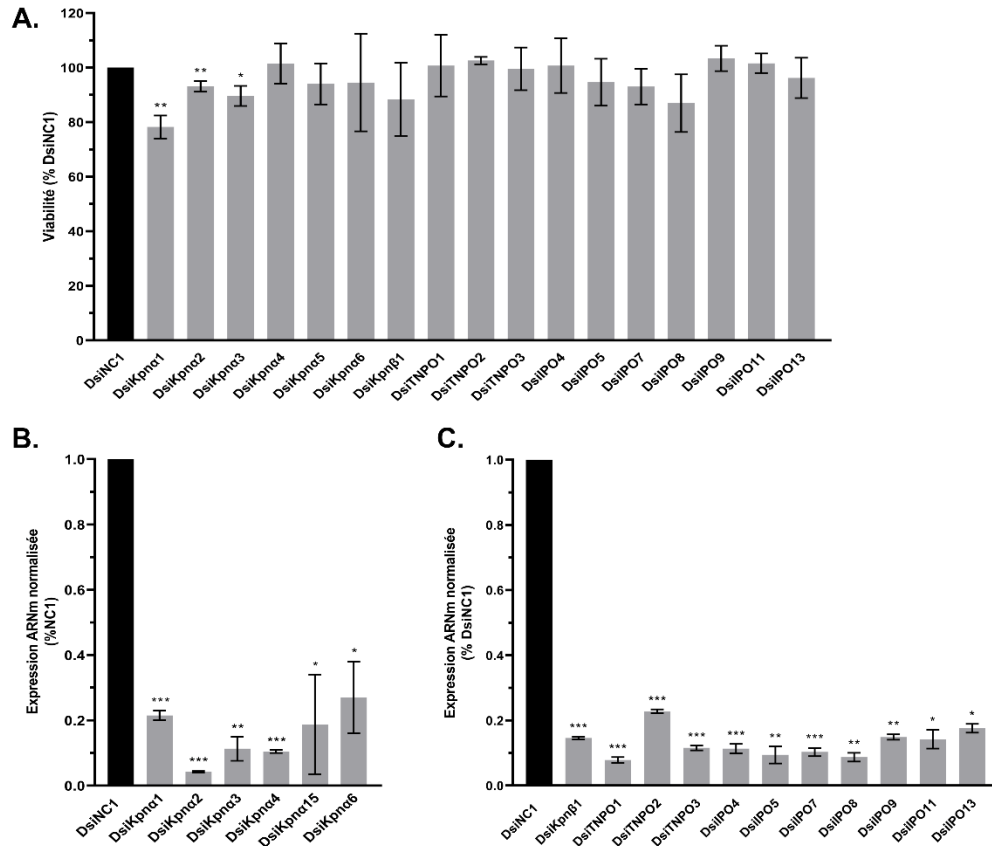


**Figure 22. La déplétion de Kpnβ1 et IPO4 n'est pas affectée par une diminution de la concentration des DsiRNA, mais celles-ci conservent leur efficacité.**

**A.** Les 143B ont été transfectées avec des DsiRNA contre Kpnβ1 ou IPO4 à une concentration de 50 nM ou 100nM pendant 48h. L'AB HS a ensuite été ajouté et la viabilité cellulaire a été déterminée avec un lecteur de plaque après 3h d'incubation. Les résultats ont été normalisés au moyen de la condition transfectée avec le contrôle DsiNC1. **B.** Les 143B ont été transfectées avec des DsiRNAs contre Kpnβ1 et IPO4 pendant 48h à une concentration de 50nM ou 100nM. Les cellules ont ensuite été récoltées pour effectuer une RT-qPCR et la déplétion de chaque DsiRNA a été normalisée sur la condition DsiNC1 et calibrée avec le gène GAPDH. Bandes noires = Contrôles, bandes grises = Conditions expérimentales. Pour A, aucune statistique n'a été effectuée puisque l'expérience n'a pas été répétée. Pour B, les valeurs p ont été déterminées par un test T bilatéral non apparié. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 et \*\*\* p < 0.001. N = 2 pour B. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM).

Pour faire suite à l'observation que certaines importines affectent la confluence des cellules, des essais de viabilité ont été effectués pour toutes les importines-α et -β avec le produit AB HS. La viabilité de chaque condition a donc été comparée avec le contrôle NC1. Cette comparaison met en évidence une diminution du métabolisme cellulaire n'excédant pas 20% pour la majorité des DsiRNAs (**Figure 23, A**). Sur la base de données précédentes, nous jugeons que cette perte limitée de viabilité est acceptable et attendue [338]. Dans ce contexte, cette légère diminution est accompagnée par une déplétion supérieure à 80% pour toutes les importines sauf Kpnα1, Kpnα6 et TNPO2 (**Figure 23, B et C**). Ces résultats confirment que l'utilisation des DsiRNA

n'affecte pas globalement le métabolisme cellulaire tout en permettant une déplétion efficace des importines. L'approche expérimentale par DsiRNA peut donc être utilisée dans le cadre de ce projet de recherche pour dépléter les importines.



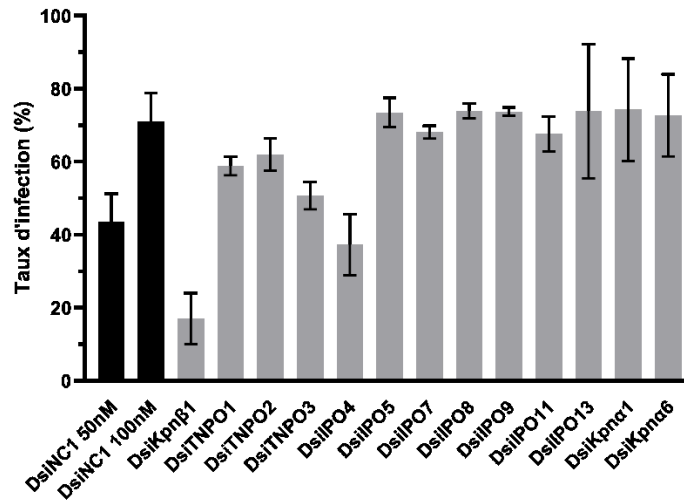
**Figure 23. La déplétion par ARN interférent affecte légèrement la viabilité cellulaire, mais offre une déplétion efficace des importines.**

**A.** Les 143B ont été transfectées avec des DsiRNA contre les importines à 50 nM ou 100nM pendant 48h. L'AB HS a ensuite été ajouté et la viabilité cellulaire a été déterminée avec un lecteur de plaque après 3h d'incubation. Les résultats ont été normalisés sur la condition transfectée avec le contrôle DsiNC1. **B et C.** Des 143B ont été transfectées avec des DsiRNA contre les importines pendant 48h à 50nM ou 100nM, puis récoltées pour effectuer une RT-qPCR. La déplétion de chaque DsiRNA a été normalisée sur la condition DsiNC1 et calibrée avec le gène GAPDH. Bandes noires = Contrôles, bandes grises = Conditions expérimentales. Les valeurs p ont été déterminées par un test T bilatéral non apparié. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 et \*\*\* p < 0.001, N = 2 pour A, N = 3 pour B et C. Les données du graphique B ont été générées par Imane El Kasmi, ancienne étudiante au doctorat au laboratoire, et présentées avec sa permission. Catherine Vandal a obtenu les données des graphiques A et C et a produit les graphiques. Les barres d'erreur représentent le SEM.

### 4.3 Effet des importines sur la localisation de gM par analyse confocale en 2D

Afin de déterminer l'effet des importines sur la localisation de gM à 4hpi, des 143B ont été transfectées avec des DsiRNA pendant 48h, puis infectées avec le VHS-1 17+ de souche sauvage à un MOI de 2 pendant 4 heures. Notre laboratoire avait préalablement testé l'effet des importines- $\alpha$  par DsiRNA sur la localisation de gM par microscopie confocale. Les résultats préliminaires obtenus montraient une délocalisation de gM à la suite de la déplétion de Kpn $\alpha$ 4, Kpn $\alpha$ 5 et Kpn $\alpha$ 6 (données non publiées). Kpn $\alpha$ 1 et Kpn $\alpha$ 6 ont ainsi été sélectionnées respectivement comme contrôles négatif et positif de la localisation cellulaire de gM et testées à nouveau par la même approche expérimentale, en plus de toutes les importines- $\beta$ . Des images 2D de chaque condition ont été acquises par microscopie confocale et une variation du taux d'infection a été observée au cours de leur analyse. Les images obtenues ont donc été manuellement comptées pour déterminer si la déplétion des importines affecte l'efficacité de l'infection. Les résultats obtenus montrent que celle-ci est variable entre certaines conditions et entre les répétitions, même si la différence n'est pas statistiquement significative (**Figure 24**). L'absence de différence statistique, notamment entre le contrôle DsiNC1 50nM et DsiKpn $\beta$ 1, pourrait provenir de la variation obtenue entre les deux répétitions et/ou du faible nombre de répétitions. Une variation est d'ailleurs visible entre les deux contrôles (DsiNC1 50nM et 100nM). Plusieurs facteurs peuvent affecter ce paramètre, dont la confluence et l'état métabolique des cellules [337]. Pour cette raison, il a été conclu que la variation du taux d'infection n'est pas nécessairement un effet direct des importines sur le virus. Ce paramètre n'a donc pas été considéré dans les analyses subséquentes.

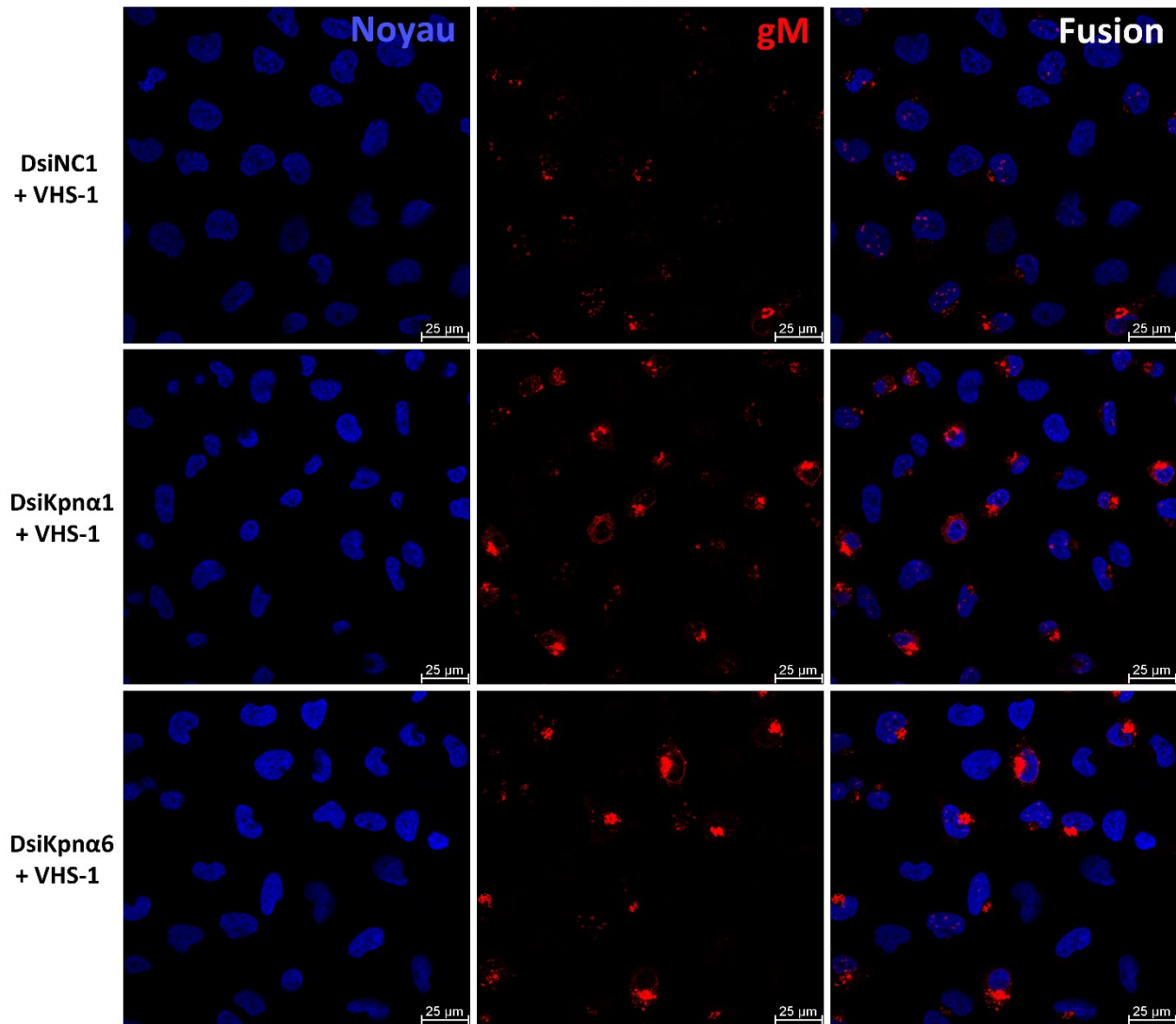




**Figure 24. Le taux d'infection est variable entre les différentes conditions étudiées.**

Des 143B ont été transfectées pendant 48h avec des DsiRNA contre les différentes importines à une concentration de 50nM ou 100nM. Les cellules ont ensuite été infectées pendant 4h avec le VHS-1 17+ de type sauvage, puis traitées pour la microscopie à fluorescence. Bandes noires = Contrôles, bandes grises = Conditions expérimentales. Les valeurs p ont été déterminées avec un test T bilatéral non apparié et aucune différence significative n'a été détectée. N = 2. Les barres d'erreur représentent le SEM.

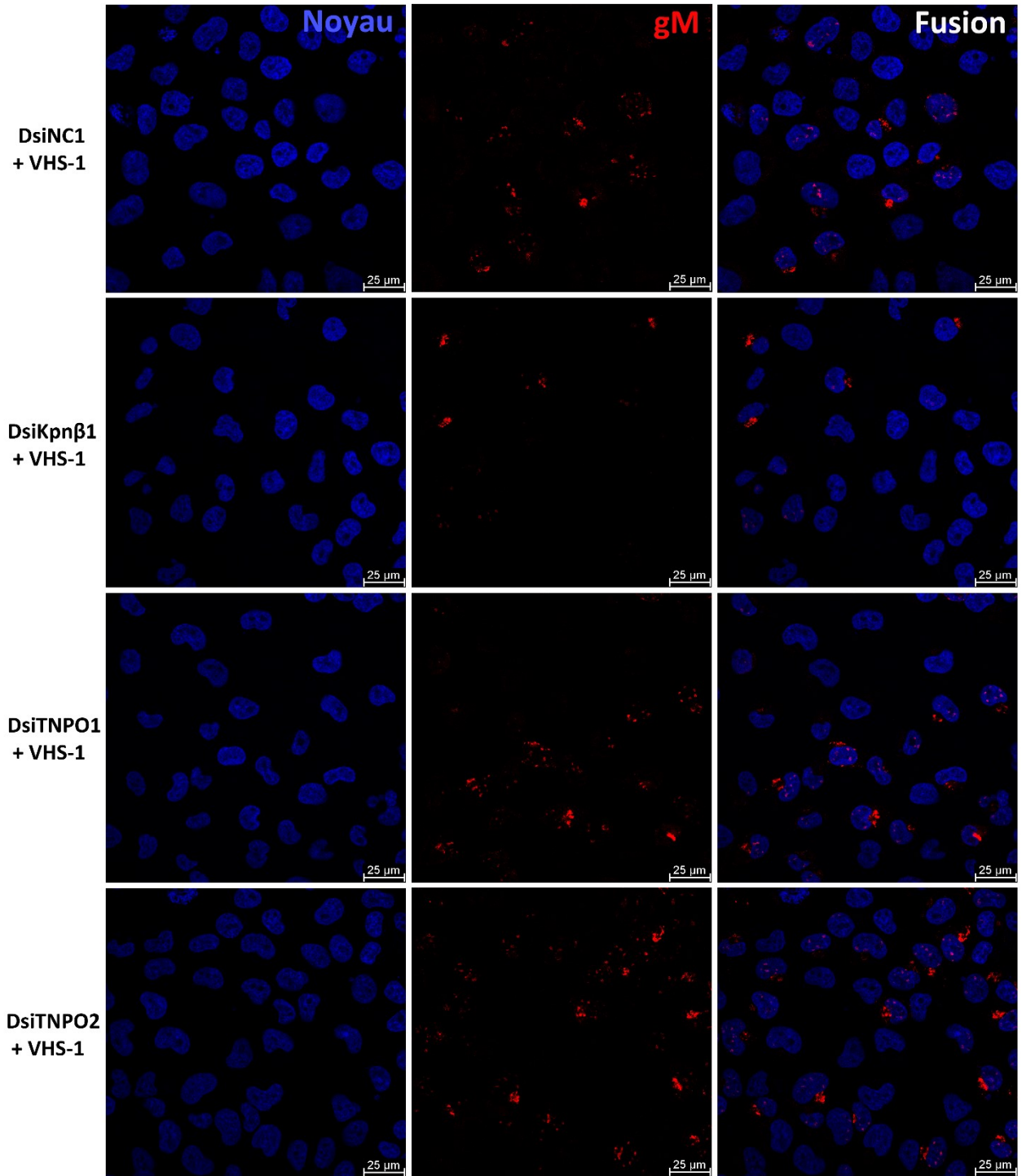
À la suite de ces observations, les images obtenues pour les deux contrôles (Kpnα1 et Kpnα6) ont été analysées et comparées aux résultats précédemment obtenus au laboratoire. En temps normal, gM est retrouvée dans des invaginations nucléaires, autour du noyau et/ou dans un compartiment adjacent à 4hpi ([188] et observations personnelles). Contre toute attente, aucune différence notable entre les contrôles négatif et positif n'a été observée dans le cadre de ce projet de maîtrise (**Figure 25**). Les résultats préliminaires précédemment obtenus ne sont donc pas confirmés, puisqu'ils montraient une délocalisation majeure de gM en absence de Kpnα4, Kpnα5 et Kpnα6.

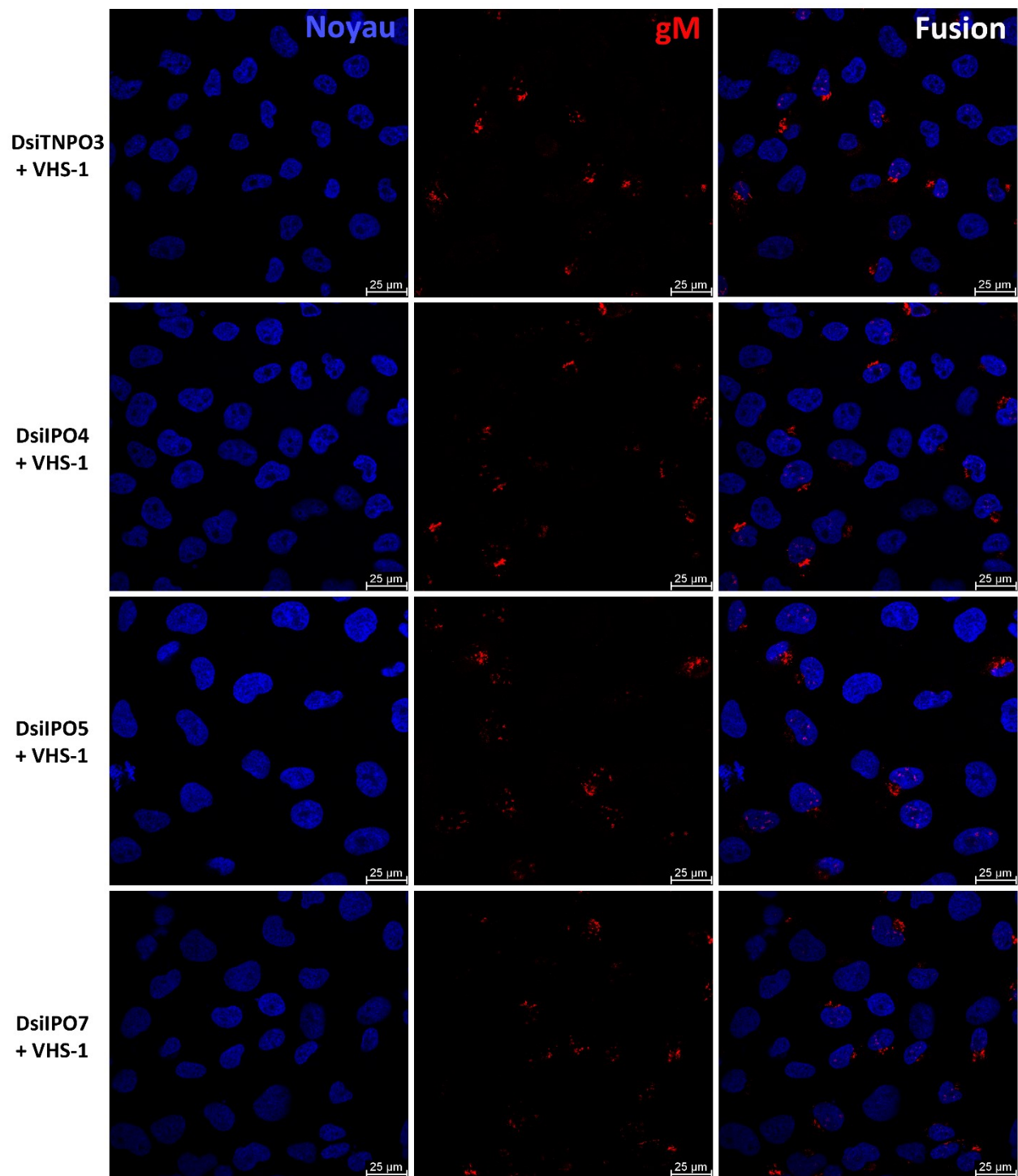


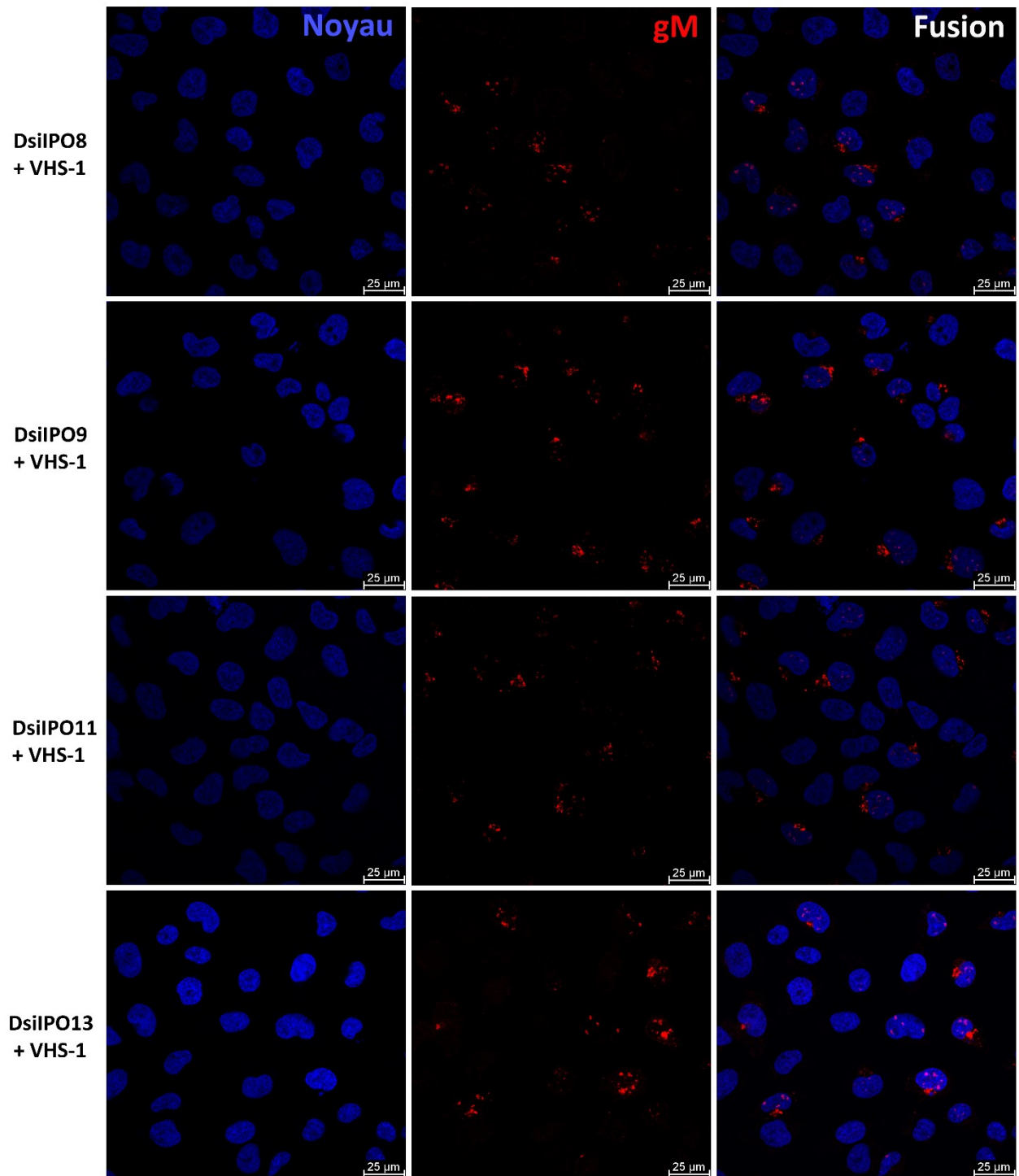
**Figure 25. Les contrôles testés n'affectent pas visuellement la localisation de gM au noyau à 4hpi.**

Des 143B ont été transfectées pendant 48h avec 100nM de DsiRNA contre Kpn $\alpha$ 1, Kpn $\alpha$ 6 et NC1, puis infectées pendant 4 heures avec le VHS-1 17+. Les cellules ont ensuite été traitées pour la microscopie à fluorescence. N = 3.

Dans le but de cribler toutes les karyophérines, l'effet des importines- $\beta$  sur la localisation cellulaire de gM a aussi été évalué par la même approche expérimentale. Tout comme pour les importines- $\alpha$ , une analyse visuelle des images obtenues par microscopie ne montre pas de différence significative entre le contrôle (NC1) et les conditions traitées avec les DsiRNAs (**Figure 26**). Tout comme les importines- $\alpha$ , les importines- $\beta$  n'ont donc pas un impact majeur sur la localisation de gM à cette étape de l'infection.



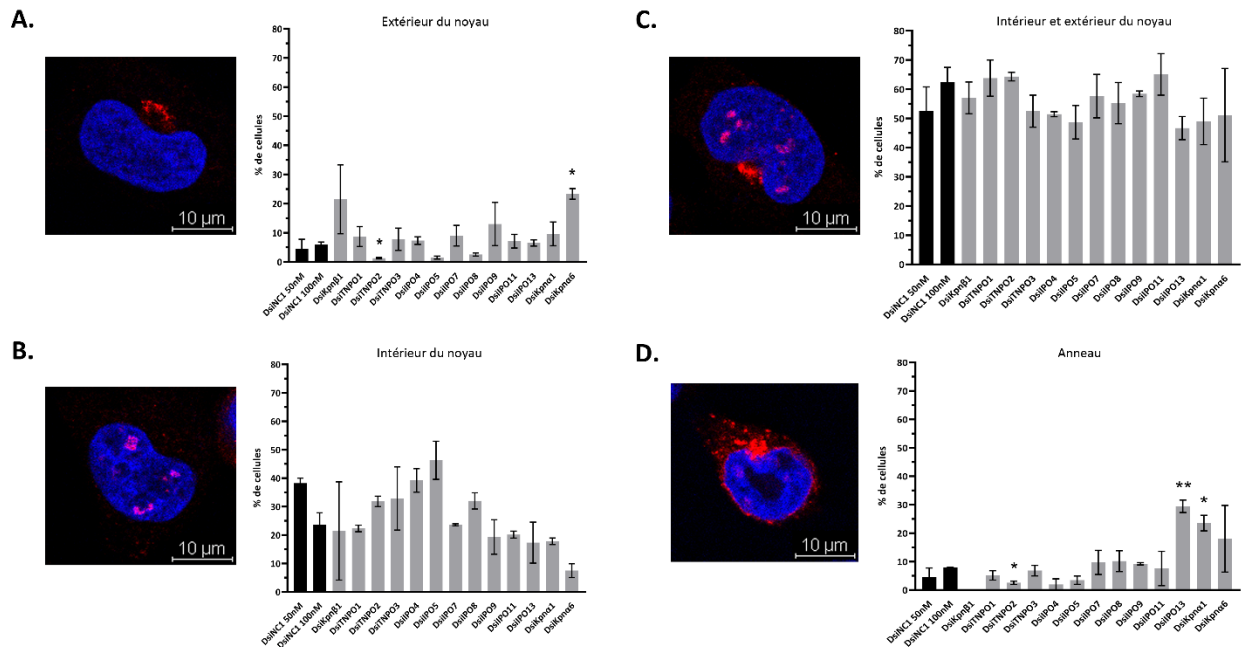




**Figure 26. Les importines- $\beta$  n'affectent pas visuellement la localisation de gM au noyau à 4hpi.**

Des 143B ont été transfectées pendant 48h avec 50 ou 100nM de DsiRNA contre les importines- $\beta$ , puis infectées pendant 4 heures avec le VHS-1 17<sup>+</sup>. Les cellules ont ensuite été traitées pour la microscopie à fluorescence. N = 3.

L'analyse visuelle des images précédemment obtenues a révélé la présence de 4 différents patrons d'expression de gM. Alors que la majorité des cellules infectées expriment gM à la fois dans des invaginations nucléaires et à l'extérieur du noyau, certaines ne possèdent cette glycoprotéine que dans l'une des deux localisations (**Figure 27, A, B et C**). Dans de rares cas, des anneaux constitués de gM autour du noyau peuvent être observés (**Figure 27, D**). Les cellules ont donc été comptées et manuellement classées dans ces différentes catégories. Les résultats obtenus ont été ramenés sur le nombre total de cellules infectées pour chaque condition afin d'ignorer la variation du taux d'infection. Ceci a permis d'obtenir la fréquence en pourcentage de ces 4 catégories pour chaque condition et de les comparer avec le contrôle NC1 (**Figure 27**). Ainsi, la déplétion de TNPO2 mène à une diminution des patrons de gM retrouvée autour du noyau et seulement à l'extérieur du noyau. Ce dernier patron est toutefois augmenté en absence de Kpn $\alpha$ 6 et plus d'anneaux nucléaires sont observés lorsque TNPO13 est déplétée (**Figure 27, A et D**). Aucune différence statistiquement significative n'est observée pour les deux patrons d'expression majoritaires. Or, des tendances sont visibles pour certaines cibles. Par exemple, il y a une augmentation de gM à l'intérieur du noyau pour IPO5 et une diminution de ce phénotype pour Kpn $\alpha$ 6 (**Figure 27, B et C**). Afin de vérifier si ces tendances sont réelles, un plus grand nombre de répétitions est nécessaire puisque l'expérience n'a été effectuée que 2 fois. Les résultats actuels suggèrent que les importines testées n'ont pas un impact majeur dans la localisation de gM pour les conditions expérimentales étudiées.



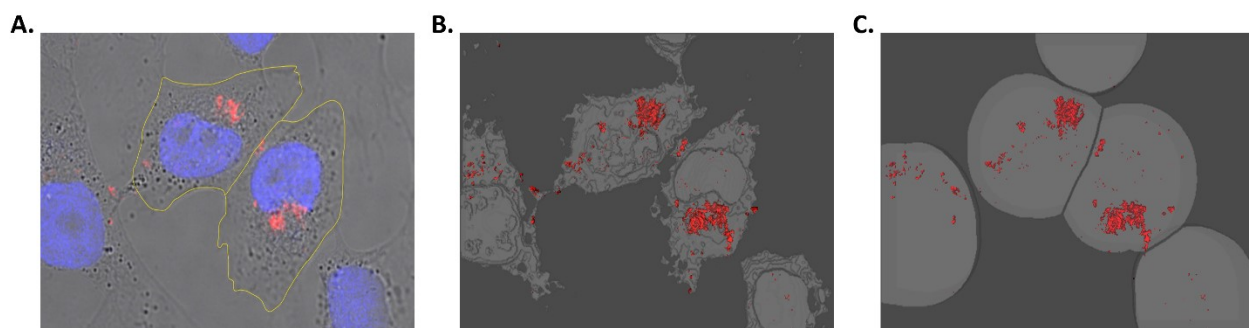
**Figure 27. TNPO2, IPO13 et Kpnα6 semblent affecter légèrement la localisation de gM.**

Des 143B ont été transfectées pendant 48h avec des DsiRNA contre 13 importines à une concentration de 50 ou 100nM. Les cellules ont ensuite été infectées avec le VHS-1 17<sup>+</sup> pendant 4h à un MOI de 2, puis traitées pour l'immunofluorescence. Les cellules infectées pour chaque condition ont été classées dans les 4 catégories suivantes : **A.** gM est retrouvée majoritairement hors du noyau, **B.** gM est retrouvée majoritairement dans le noyau, **C.** gM est retrouvée à l'intérieur et à l'extérieur du noyau, **D.** gM forme un anneau autour du noyau. Les images d'IF montrent une distribution de gM représentative de chaque condition. Bandes noires = Contrôles, bandes grises = Conditions expérimentales. Les valeurs p ont été déterminées par un test T bilatéral non apparié. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 et \*\*\* p < 0.001, N = 2. Les barres d'erreur représentent le SEM.

#### 4.4 Mise en place d'une méthode de quantification relative par microscopie confocale en 3D

L'analyse manuelle des données en 2D représente une tâche d'envergure notamment en raison du grand nombre de conditions et de cellules à compter pour chaque répétition. De plus, la classification du patron d'expression de gM dans les 4 différentes catégories est une méthode tout au mieux subjective. Afin de confirmer les résultats précédemment obtenus, une analyse 3D a été effectuée sur une nouvelle série d'images. La même approche expérimentale par microscopie confocale a donc été utilisée, mais les images ont été soumises à l'extension 3D du

programme LasX. Ceci a permis d'obtenir un ratio du signal de gM à l'intérieur du noyau par rapport à l'ensemble de la cellule, et ce, pour chaque condition. Cette approche a l'avantage de prendre en considération toute la cellule, plutôt qu'une coupe tel que vu durant l'analyse 2D. Or, la comparaison relative du signal de gM à l'intérieur du noyau par rapport à son signal total dans une cellule nécessite le marquage de la membrane plasmique (MP). Ceci permet de délimiter chaque cellule et d'associer le signal du cytoplasme au noyau correspondant. L'utilisation d'un marqueur de la MP a représenté une difficulté supplémentaire pour le programme informatique, car les 143B sont des cellules qui se divisent rapidement (observations personnelles). Elles ne supportent d'ailleurs pas une transfection lorsque leur concentration est inférieure à 20% et ne tolèrent pas non plus d'être passées après ce traitement (observations personnelles). Les membranes plasmiques se retrouvent donc proches l'une de l'autre au moment de l'acquisition des images. Même s'il est possible de marquer la MP avec des anticorps, la capacité du programme à séparer automatiquement les cellules est limitée dans les régions plus confluentes. Pour pallier ce problème, l'emplacement de la MP a été généré informatiquement pour chaque cellule en dilatant artificiellement le noyau correspondant (**Figure 19, matériels et méthodes**). Une comparaison d'images obtenues en champs clair et par fluorescence a montré que le signal de gM dans le cytoplasme est situé près du noyau (**Figure 28**). La MP artificielle, même si elle ne possède pas la même forme que la vraie MP, permet d'associer le signal du cytoplasme au noyau correspondant sans perdre d'informations (**Figure 28, B et C**). Pour sa simplicité d'utilisation, la technique de la MP artificielle a donc été utilisée lors des analyses subséquentes.

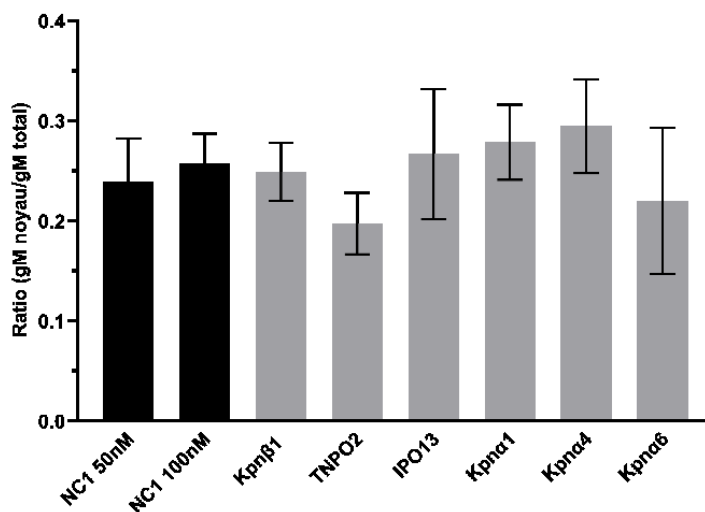


**Figure 28. Les techniques d'analyse de la MP et de la MP artificielle sont similaires et permettent d'associer le signal de gM à la cellule correspondante.**



Des 143B ont été infectées avec le VHS-1 17<sup>+</sup> pendant 4h à un MOI de 2, puis traitées pour l'immunofluorescence. Des anticorps primaires et secondaires ont été utilisés pour marquer gM et la MP. **(A)** La superposition des images prises en champ clair et par fluorescence montre que gM (rouge) est située proche du noyau (bleu). Les MP ont été délimitées manuellement (lignes jaunes). Les images obtenues ont ensuite été comparées **(B)** en délimitant chaque cellule avec sa MP **(C)** ou avec la MP artificielle.

Après avoir déterminé les paramètres d'acquisition et d'analyse des images, le ratio de gM à l'intérieur du noyau par rapport à l'ensemble de la cellule a été comparé pour les conditions NC1, Kpn $\beta$ 1, TNPO2, IPO13, Kpn $\alpha$ 1, Kpn $\alpha$ 4 et Kpn $\alpha$ 6 **(Figure 29)**. Ces cibles ont été sélectionnées à partir des analyses 2D précédemment effectuées et des résultats préliminaires obtenus par Imane El Kasmi. TNPO2, IPO13, Kpn $\alpha$ 1 et Kpn $\alpha$ 6 étaient les seules conditions à avoir une différence statistiquement significative par rapport au contrôle NC1, les résultats obtenus pour Kpn $\beta$ 1 sont très variables et Kpn $\alpha$ 4 avait été identifiée comme une cible potentielle par Imane El Kasmi **(Figure 27)**. Or, l'analyse 3D ne révèle pas de différence statistiquement significative entre les différentes conditions et le contrôle NC1 **(Figure 29)**. Une légère tendance est toutefois observée pour TNPO2 et Kpn $\alpha$ 6, mais dans l'ensemble, aucune différence majeure n'est observée pour toutes ces conditions.



**Figure 29.** Les importines testées n'affectent pas significativement la distribution de gM dans la cellule lors d'une analyse 3D.

Des 143B ont été transfectées pendant 48h avec des DsiRNA contre 6 importines à une concentration de 50nM ou 100nM. Les cellules ont ensuite été infectées avec le VHS-1 17<sup>+</sup> pendant 4h à un MOI de 2, puis traitées pour l'immunofluorescence. Les images ont été analysées avec l'extension d'analyse 3D du programme LasX et un ratio du signal de gM à l'intérieur du noyau sur le signal de gM dans la cellule entière a été obtenu. Bandes noires = Contrôles, bandes grises = Conditions expérimentales. Les valeurs p ont été déterminées avec un test T bilatéral non paillé. Aucune différence significative n'a été détectée, N = 3. Les barres d'erreur représentent le SEM.



## Chapitre 5 – Discussion

Le projet de recherche en lien avec ce mémoire joue un double rôle. En plus de se pencher sur la biologie de l'herpès, il permet aussi d'étudier le ou les mécanismes impliqués dans le ciblage des protéines transmembranaires, autant cellulaires que virales, à la membrane interne du noyau. Ces processus font d'ailleurs actuellement l'objet de plusieurs études étant donné leur importance dans la biologie des cellules.

### 5.1 Les importines dans le cycle viral du VHS-1

La déplétion des importines- $\alpha$  et - $\beta$  a été obtenue par l'utilisation de DsiRNA, ce qui a causé une diminution du métabolisme cellulaire pour certaines conditions (**Figure 23**). Or, comme discuté précédemment, cette diminution est jugée acceptable, car les importines participent à plusieurs processus cellulaires importants [256, 318]. Outre le métabolisme cellulaire, l'analyse visuelle des images obtenues par microscopie confocale a révélé une variation significative du taux d'infection entre les différentes conditions étudiées (**Figure 24**). Cette expérience a été répétée avec un marquage contre la protéine virale ICP0 et a démontré que cette fluctuation n'est pas associée à une variation de l'expression de gM, mais plutôt à une différence dans l'efficacité de l'infection entre les conditions (données non présentées). D'ailleurs, ce phénomène a été précédemment rapporté par *Döhner et al.* pour le VHS-1 lors de la déplétion des importines avec la technique d'ARNi [318]. Leurs expériences ont permis de conclure que certaines importines peuvent faciliter la réplication du VHS-1 alors que d'autres agissent comme facteurs de restriction. Or, à part pour  $Kpn\beta 1$ , aucun des résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire ne concorde avec ceux de *Döhner* (**Figure 24** et [318]). La divergence entre les résultats présentés dans le cadre de ce mémoire et ceux obtenus par *Döhner* peut être attribuée en partie à l'approche expérimentale utilisée. En effet, les ratios rapportés par *Döhner et al.* correspondent au nombre de copies du VHS-1, tel que déterminé par un rapporteur GFP, sur la densité cellulaire calculée à partir d'un marquage nucléaire [318]. Les ratios présentés dans ce présent mémoire ne prennent pas en considération l'intensité de l'infection entre les cellules, mais plutôt de sa présence ou de son absence. Deux variables importantes peuvent affecter le taux d'infection; la

confluence des cellules et leur état métabolique au moment de l'infection. Or, les importines affectent avec une efficacité variable le métabolisme des cellules, ce qui a une répercussion sur leur vitesse de division [318, 339]. Ainsi, à partir d'un nombre initial identique de cellules au début de l'expérience, la confluence finale est plus ou moins affectée selon l'importine déplétée. Au moment de l'infection, certaines conditions possèdent donc une confluence avoisinant le 100%, alors que d'autres se trouvent plutôt autour du 60% (observations personnelles). Ce phénomène est d'ailleurs observé par *Döhner et al.* lors de la déplétion des importines- $\alpha$  et - $\beta$  [318]. Comme discuté dans la section des résultats, une diminution du nombre de cellules pour les conditions trop confluentes n'était pas envisageable. L'efficacité de l'infection a donc été sacrifiée pour maintenir la viabilité cellulaire. À partir de ces constatations, le taux d'infection ne peut pas être directement lié à un rôle des importines dans les conditions expérimentales choisies et n'a donc pas été considéré dans les analyses subséquentes.

## 5.2 Les importines dans la localisation de gM à 4hpi

L'analyse de la séquence protéique de gM a permis de détecter la présence d'un possible SLN dans sa région C-terminale (**Figure 20**). Or, une étude antérieure au laboratoire avec le logiciel PredictNLS n'était pas parvenue à identifier de SLN dans la séquence de gM [188]. Ces résultats ne sont pas contradictoires, car seulement deux des trois programmes utilisés dans le présent mémoire sont parvenus à détecter ce SLN [329-331]. De plus, ce dernier est considéré comme étant faible par le programme [NLS Mapper](#). Une approche expérimentale est sans aucun doute nécessaire afin de déterminer la nature de cette séquence. Ce résultat valide la nécessité d'étudier cette option en suggérant que gM pourrait lier des importines. Or, il est peu probable que gM utilise le mécanisme du SLN combiné à un domaine désordonné pour atteindre la MNI. Selon *Mudumbi et al.* la présence du domaine ID est importante pour permettre à une PTM de couper à travers la structure du CPN et d'atteindre le canal central [228]. Malgré la présence d'un domaine ID assez long pour atteindre le canal central à son extrémité C-terminale, le SLN de gM n'est pas bien positionné (**Figure 20**) [328, 332-334, 340]. En effet, pour utiliser ce mécanisme, le SLN devrait plutôt se situer en C-terminale du domaine ID, ce qui n'est pas le cas pour gM (**Figure 20**) [228].

Des résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire indiquent que XPO6 joue un rôle significatif dans la sortie de gM du noyau au TGN à des étapes tardives de l'infection [184]. Ainsi la déplétion de XPO6 par DsiRNA a mené à une rétention importante de gM dans le noyau par rapport au contrôle NC1, signifiant que gM interagit avec le transport nucléocytoplasmique de la cellule à cette étape. Toutefois, les images de microscopie obtenues au cours du présent mémoire ne mettent pas en évidence un rôle majeur des importines dans le ciblage de gM à la MN (**Figure 25 et 26**). Ainsi, trois approches expérimentales ont été utilisées dans le cadre de ce présent projet de recherche dans le but d'étudier l'impact des importines dans la localisation de gM à 4hpi. La première approche, une simple analyse visuelle des images obtenues par microscopie confocale, ne soutient pas un rôle des importines dans la localisation de gM (**Figures 25 et 26**). Or, quatre patrons d'expression différents pour gM ont été observés et ont soulevé des questions par rapport à leur fréquence relative entre les conditions étudiées. Une analyse plus approfondie en 2D a donc été effectuée à partir de ces mêmes images et a révélé une légère variation de deux des quatre patrons d'expression lors de la déplétion de TNPO2, IPO13 et Kpn $\alpha$ 6 (**Figure 27, A, B et D**). Or, ces deux patrons représentent moins de 20% des cas observés alors qu'aucune différence significative n'a été observée pour les deux phénotypes composant le 80% restant (**Figure 27, A et D contre B et C**). Un défaut majeur de cette approche provient de la nature 2D de l'analyse, qui ne prend en considération qu'un seul plan focal de la cellule. Or, gM est présente sur plusieurs plans focaux étant donné la nature 3D du noyau ([188] et observations personnelles). Les 4 patrons d'expression observés pour gM pourraient donc représenter des artéfacts causés par l'analyse d'un seul des nombreux plans focaux possibles. La dernière approche employée, une analyse automatique en 3D, a permis de contourner le problème soulevé par l'analyse 2D. Ceci a d'ailleurs éliminé la subjectivité associée à la classification manuelle des cellules parmi les quatre patrons d'expression de gM. Un ratio représentant la quantité relative de gM à l'intérieur du noyau par rapport au gM total contenu dans la cellule a été obtenu pour chaque cellule. La moyenne de ces ratios pour chaque condition a ensuite été comparée avec celle du contrôle NC1 dans le but de détecter un possible changement dans la distribution de gM entre le noyau et le cytoplasme. Les résultats obtenus ne montrent pas de différences majeures entre les différentes conditions et appuient les résultats obtenus par

l'analyse visuelle. En revanche, une légère tendance vers la baisse, quoique non statistiquement significative, est visible pour TNPO2 (**Figure 29**). Dans l'ensemble, ces données tendent à suggérer que les importines ne jouent pas de rôle prépondérant dans le ciblage de gM vers le noyau, contrairement à sa relâche plus tard dans l'infection.

## 5.2.1 La redondance du transport nucléocytoplasmique

### 5.2.1.1 La redondance des importines

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la localisation de gM n'est pas significativement affectée par une importine en particulier. Or, ces observations ne signifient pas forcément que les importines ne jouent aucun rôle dans le ciblage de gM à la MN. En effet, dans le cas de certains cargos, leur transport au noyau est assuré par plusieurs importines [240, 241]. Une hypothèse est que cette redondance permettrait à des cargos importants d'atteindre le noyau même lors d'un dysfonctionnement dans leur voie d'import habituelle [241]. Si gM est capable de lier plusieurs récepteurs de transport nucléaires, le phénotype causé par la déplétion d'une seule importine pourrait alors être compensé par d'autres importines. Or, les déplétions multiples représentent un travail considérable à cause du nombre important d'importines- $\alpha$  et - $\beta$  chez l'humain, en plus de représenter un risque important pour le métabolisme cellulaire tel qu'observé au cours de ce mémoire (**Figure 22 et 23**).

### 5.2.1.2 La redondance des mécanismes d'import

Outre la redondance entre les importines, un rôle des importines dans le ciblage de gM au noyau pourrait être masqué par l'utilisation simultanée de plusieurs mécanismes. En effet, il est de plus en plus accepté que les différents modèles de ciblage des PTM à la MNI ne sont pas mutuellement exclusifs et que plusieurs d'entre eux peuvent agir sur une même cible [228]. Ceci est notamment le cas pour la PTM UNC-84 chez le nématode *C. elegans* qui possède 2 SLNs, 1 INM-SM et un signal de localisation nucléaire conservé parmi les protéines de la famille SUN [297]. Chez l'humain, la protéine LBR emprunte le canal central du CPN par l'intermédiaire d'un SLN lié à un domaine désordonné, mais peut aussi diffuser par les canaux latéraux en son absence [228]. Dans ces deux exemples, la délétion de tous les signaux de ciblage à la MNI est nécessaire pour observer un phénotype majeur dans leur localisation. Ainsi, l'absence d'une relocalisation de gM

lors de la déplétion d'une importine ne signifie pas forcément son absence de rôle, mais plutôt que plusieurs mécanismes pourraient y participer. Malheureusement, l'approche expérimentale adoptée lors de ce projet de maîtrise ne permet pas d'effectuer cette distinction.

### **5.3 Les mécanismes alternatifs du ciblage de gM à la MN**

*Mubudi et al.* ont récemment développé des techniques avancées de microscopie, dont celle de la microscopie SPEED (pour « *single-point edge excitation sub-diffraction* ») associée aux techniques de smFRAP (pour « *single-molecule fluorescence recovery after photobleaching* ») et de smFRET (pour « *single molecule Förster resonance energy transfer* »), afin de déterminer le chemin emprunté par des PTMs à travers le CPN [228]. Cette technique pourrait être utilisée afin de visualiser le chemin emprunté par l'extrémité C-terminale de gM lors de sa translocation par le CPN. Puisque le poids des importines surpasse la limite globulaire de 60kDa acceptée par les canaux latéraux du CPN, l'information obtenue par SPEED permettrait de réorienter l'hypothèse du projet de recherche [228]. Dans le cas où gM n'emprunte que les canaux latéraux, les modèles de diffusion-rétention, du transport facilité par les répétitions FG ou de l'INM-SM deviennent plus probables que le modèle du SLN. Dans le scénario contraire où l'extrémité C-terminale de gM atteint le canal central, le modèle du SLN et du domaine désordonné devra être étudié sous une nouvelle approche expérimentale que celle choisie dans le présent mémoire.

#### **5.3.1 Le mécanisme de diffusion-rétention**

Alors que l'absence de phénotype majeur lors de la déplétion des importines pourrait signifier une redondance entre les importines ou entre les mécanismes actifs de ciblage des PTMs à la MN, l'utilisation d'un simple mécanisme de diffusion-rétention n'est pas à écarter. Or, notre laboratoire a précédemment rapporté que la localisation de gM à la MN est dépendante de l'infection [188]. Dans le cas d'une transfection en absence d'autres protéines virales, gM nouvellement formée est plutôt retrouvée au TGN. Cette observation suggère que le ciblage de gM à la MN n'est pas seulement le fruit d'un mécanisme de diffusion-rétention, sans toutefois l'écarter, et que des protéines virales y participent.



### 5.3.2 Le « Piggybacking »

Le processus par lequel la ou les protéines virales ciblent gM au noyau est inconnu et pourrait être le fruit d'un effet direct ou indirect. Ces protéines virales pourraient donc interagir directement avec gM ou indirectement par la modification de protéines cellulaires. Une des hypothèses est que gM, ne possédant pas de SLN confirmé (Voir la section 4.1 pour une discussion du SLN), interagit avec une importine par l'intermédiaire d'un partenaire viral possédant un SLN. Ce mécanisme est nommé le « piggybacking » et semble être un processus abondamment utilisé par les protéines retrouvées chez l'humain [341]. D'ailleurs, il a été rapporté qu'ICP34.5 du VHS-1 participe à l'import et au ciblage de la protéine cellulaire p32 à la MNI par ce mécanisme [342]. Outre l'utilisation d'une importine, certaines protéines peuvent agir comme leur propre RTN [296]. Une autre hypothèse est que gM pourrait lier une protéine virale ayant cette caractéristique, ce qui pourrait expliquer l'indépendance de gM par rapport aux importines étudiées. Une expérience de BioID a été récemment effectuée au sein de notre laboratoire dans le but de répondre à ces questions et de détecter des interactions entre gM et de nouveaux partenaires à 4 et 12hpi [184]. Or, aucune protéine virale n'a été détectée comme interagissant avec gM spécifiquement à 4hpi [184].

### 5.3.3 Le mécanisme dépendant d'un INM-SM

L'analyse de gM par divers programmes informatiques a permis d'identifier la présence de 4 possibles INM-SM au sein de sa séquence protéique (**Figure 20**). Ces 4 INM-SM présumées respectent les critères énoncés par *Braunagel et al.*, soit une séquence hautement hydrophobe d'environ 18 à 22 aa suivie d'acides aminés chargés positivement faisant face au cytoplasme [310, 313]. Ces dernières doivent se situer à environ 4-8 aa de la séquence hydrophobique. Or, les critères définissant les INM-SM sont très larges et chaque séquence présumée doit être confirmée expérimentalement. Pour ce faire, des virus mutés dans les 4 INM-SM potentiels pourraient être générés afin de déterminer leur impact sur la localisation de gM au noyau à 4hpi. D'ailleurs, l'extrémité C-terminale et cytoplasmique de gM possède un poids moléculaire d'environ 15kDa selon le programme [Protein Molecular Weight](#), ce qui lui permettrait de passer par les canaux latéraux du CPN en présence d'une importine tronquée telle que Kpn $\alpha$ 4-16 [343]. Toutefois les DsiRNA utilisés contre Kpn $\alpha$ 4 ciblent aussi ses formes tronquées (**Figure 21**). Alors

que Kpn $\alpha$ 4-16 pourrait ne pas jouer un rôle dans le ciblage de gM à la MNI, ceci n'exclut pas la possibilité que d'autres importines possèdent aussi des formes tronquées pouvant participer à ce processus.

### 5.3.2 Les mécanismes indépendants des importines

Le transport nucléocytoplasmique médié par la famille des karyophérines- $\beta$  n'est pas le seul mécanisme actif permettant la translocation de protéines du cytoplasme au noyau. Ainsi, l'absence d'un rôle des importines dans le ciblage de gM à la MN n'implique pas nécessairement un simple mécanisme de diffusion-rétention. Plusieurs mécanismes indépendants des importines ont été découverts et étudiés dans les dernières décennies, suggérant l'existence de plusieurs autres processus d'import inconnus. Certains de ces transporteurs jouent un rôle dans des situations précises. Ainsi, la protéine Hikeshi a été identifiée comme étant le RTN responsable de l'import des protéines reliées au choc thermique, alors que la protéine NTF2 sert spécifiquement à recycler la RanGDP après sa relâche dans le cytoplasme [208, 237, 292, 344]. De ces mécanismes, deux présentent des perspectives intéressantes dans le cas de gM.

#### 5.3.2.1 Le mécanisme RADAR

Les répétitions ankyrines (AR pour « *Ankyrin repeats* ») sont constituées d'environ 33aa contenant deux hélices- $\alpha$  antiparallèles flanquées de boucles- $\beta$  [345]. Ces répétitions s'assemblent entre elles pour former une structure solénoïdale nommée le domaine de répétitions ankyrines (ARD pour « *Ankyrin repeats domain* ») [346]. Ce domaine représente l'un des motifs d'interaction protéine-protéine les plus couramment retrouvés dans la nature [345]. D'ailleurs, les ARDs sont présents dans un ensemble très variés de protéines et ne définissent donc pas leurs fonctions, mais plutôt la présence d'une structure 3D particulière [346]. Il a été précédemment rapporté que certaines protéines possédant des ARDs parvenaient à atteindre le noyau par un processus indépendant d'un SLN [347]. Il a par la suite été découvert que ce sous-ensemble de protéines possédait des résidus dans leurs ARDs qui adoptent une conformation 3D capable de lier la RanGTP [345]. Ainsi, ces protéines parviennent à médier leur propre transport au noyau sans l'intervention d'une karyophérine. Ce mécanisme d'import a été par la suite nommé le mécanisme RaDAR pour RanGTP/AR [345]. L'analyse de ces domaines dans le cas de

gM s'avère difficile et dépasse l'objectif de ce projet de maîtrise, mais reste tout de même une alternative intéressante à considérer.

### 5.3.2.2 Le mécanisme d'import nucléaire glyco-dépendant

Un autre mécanisme d'import ne faisant pas appel aux importines est le transport glyco-dépendant des glycoprotéines [348, 349]. Ce mécanisme a été décrit pour la première fois dans des expériences utilisant des néoglycoprotéines, dont l'albumine bovine synthétiquement modifiée avec des sucres. Par l'ajout de sucres, plus précisément le *O*-*N*-acétylglycosamine (*O*-GlcNAc), cette protéine acquiert la capacité de transiter du cytoplasme vers le noyau en absence d'un SLN [350]. Ce mécanisme partage plusieurs similarités avec le transport médié par les importines, mais utilise plutôt des RTN reconnaissant les sucres; les lectines [348, 349]. Parmi celles-ci, une certaine catégorie de lectines transite entre le cytoplasme et le noyau et permet ainsi le transport de glycoprotéines possédant un *O*-GlcNAc [349]. Or, les sites de glycosylation connus de gM se situent sur des résidus asparagines alors que le *O*-GlcNAc s'effectue sur des résidus sérine ou thréonine [182, 349]. Malgré ces observations, celles-ci n'excluent pas la possibilité que gM possède une *O*-GlcNAc non identifiée au sein de sa séquence ou que des lectines jusqu'ici inconnues participent au transport des glycoprotéines N-glycosylées. D'ailleurs, ce mécanisme de transport est beaucoup moins étudié que celui effectué par les karyophérines et pourrait donc posséder des fonctions jusqu'ici inconnues.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise ouvrent la porte à plusieurs autres hypothèses quant au(x) mécanisme(s) impliqué(s) dans le transport de gM vers la MNI à 4hpi. Alors qu'un rôle des importines n'est pas exclu, un mécanisme de rétention-diffusion, un mécanisme indépendant des importines ou même un mécanisme encore inconnu pourrait permettre à cette protéine transmembranaire d'atteindre la membrane nucléaire interne. Afin d'étudier ces alternatives, d'autres techniques devront être explorées et utilisées. Parmi celles-ci, la microscopie SPEED associées au smFRAP et smFRET représente une avenue prometteuse afin de déterminer si l'extrémité C-terminale de gM emprunte ou non le canal central du pore nucléaire. Cette réponse permettrait d'orienter la suite des expériences en éliminant certains mécanismes tels que celui de diffusion-rétention.

## Chapitre 6 – Conclusion

Très tôt dans l'infection, avant même la réplication du génome viral, la glycoprotéine M est spécifiquement et activement ciblée aux MN, et ce, avant tous ses partenaires d'interaction connus. Alors que sa localisation à la MNO pourrait être expliquée par un simple mouvement de diffusion à partir du ER, le ciblage de gM à la MNI soulève plusieurs interrogations. Le but de ce projet de maîtrise consistait à évaluer l'apport du transport nucléocytoplasmique médié par les importines dans ce ciblage. Les résultats obtenus suggèrent que ce mécanisme n'est pas à la base de la localisation de gM à la MNI ou, tout de moins, est compensé par d'autres importines ou d'autres mécanismes. Or, ces résultats préliminaires doivent être appuyés par des expériences complémentaires. Un élément clé dans la compréhension du mécanisme responsable de ce ciblage serait d'identifier la ou les protéines virales responsables de la localisation de gM au noyau et non au TGN à 4 hpi. Des expériences de co-immunoprécipitation ou de bioID comme précédemment effectués au sein de notre laboratoire pourraient ne pas parvenir à identifier ces protéines si leur rôle est indirect. Toutefois, l'identification de près de 170 partenaires potentiels de gM par bioID est une bonne piste. La compréhension du mécanisme derrière le ciblage de gM aux MN à 4hpi représente une étape importante dans la compréhension de sa fonction à ce compartiment, en plus de permettre de mieux comprendre le ciblage des glycoprotéines cellulaires ou virales à la MNI.



## Références bibliographiques

1. Koonin EV, Starokadomskyy P. Are viruses alive? The replicator paradigm sheds decisive light on an old but misguided question. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2016;59:125-34.
2. van Regenmortel MH. The metaphor that viruses are living is alive and well, but it is no more than a metaphor. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2016;59:117-24.
3. Villarreal LP. Are Viruses Alive? *Scientific American.* 2004;291(6):100-5.
4. Forterre P. To be or not to be alive: How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2016;59:100-8.
5. Darnell JE, Lodish HF. *Molecular Cell Biology.* 4th edition: W. H. Freeman; 2000.
6. Payne S. Introduction to Animal Viruses. *Viruses*2017. p. 1-11.
7. Koonin EV, Dolja VV. A virocentric perspective on the evolution of life. *Curr Opin Virol.* 2013;3(5):546-57.
8. Mougari S, Sahmi-Bounsiar D, Levasseur A, Colson P, La Scola B. Virophages of Giant Viruses: An Update at Eleven. *Viruses.* 2019;11(8).
9. Forterre P, Prangishvili D. The major role of viruses in cellular evolution: facts and hypotheses. *Curr Opin Virol.* 2013;3(5):558-65.
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. Lan K, Luo MH. Herpesviruses: epidemiology, pathogenesis, and interventions. *Virol Sin.* 2017;32(5):347-8.
12. Rechenchoski DZ, Faccin-Galhardi LC, Linhares REC, Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiol (Praha).* 2017;62(2):151-6.
13. Beswick TS. The origin and the use of the word herpes. *Med Hist.* 1962;6:214-32.
14. Stanberry LR. *Understanding Herpes: Revised Second Edition:* University Press of Mississippi; 2009.
15. Prevost JL. Congrès périodique international des sciences médicales: 5me session, Genève, 9 au 15 septembre 1877 : Comptes-rendus et mémoires: H. Georg; 1878.

16. Singh SK, Ruzek D. Neuroviral Infections: General Principles and DNA Viruses: CRC Press/Taylor & Francis; 2013.
17. Longson M. Persistence in herpes simplex virus infections. *Postgrad Med J*. 1978;54(635):603-12.
18. Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Dempsey DM, Dutilh BE, et al. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch Virol*. 2019;164(9):2417-29.
19. Zmasek CM, Knipe DM, Pellett PE, Scheuermann RH. Classification of human Herpesviridae proteins using Domain-architecture Aware Inference of Orthologs (DAIO). *Virology*. 2019;529:29-42.
20. Roizman B, Baines J. The diversity and unity of herpesviridae. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 1991;14(2):63-79.
21. Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 1992;123(3-4):425-49.
22. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E. Human Herpesviruses : Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Arvin AM, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. Leiden: Leiden Cambridge University Press; 2007.
23. Arvin AM. Varicella-zoster virus. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(3):361-81.
24. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr*. 2016;4(4).
25. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis*. 2013;57 Suppl 4:S178-81.
26. Dewhurst S, McIntyre K, Schnabel K, Hall CB. Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):416-8.
27. Yamanishi K, Shiraki K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Asano Y, et al. Identification of Human Herpesvirus-6 as a Causal Agent for Exanthem Subitum. *The Lancet*. 1988;331(8594):1065-7.

28. Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. Human herpesvirus 7: Another causal agent for roseola (exanthem subitum). *The Journal of Pediatrics*. 1994;125(1):1-5.
29. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med*. 1995;332(18):1186-91.
30. Wen KW, Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett*. 2010;289(2):140-50.
31. Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1408):461-73.
32. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;59(1):94-101.
33. James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KM, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 2020;98(5):315-29.
34. Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*. 1998;26(3):541-53; quiz 54-5.
35. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(2):107-21.
36. Scott DA, Coulter WA, Lamey PJ. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *J Oral Pathol Med*. 1997;26(10):441-7.
37. Zhang J, Liu H, Wei B. Immune response of T cells during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017;18(4):277-88.
38. Bello-Morales R, Andreu S, Lopez-Guerrero JA. The Role of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Demyelination of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14).
39. Harris SA, Harris EA. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;48(2):319-53.
40. Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, Ball MJ, Bearer EL, Braak H, et al. Microbes and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(4):979-84.



41. Doll JR, Hoebe K, Thompson RL, Sawtell NM. Resolution of herpes simplex virus reactivation in vivo results in neuronal destruction. *PLoS Pathog.* 2020;16(3):e1008296.
42. Protto V, Tramutola A, Fabiani M, Marcocci ME, Napoletani G, Iavarone F, et al. Multiple Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) Reactivations Induce Protein Oxidative Damage in Mouse Brain: Novel Mechanisms for Alzheimer's Disease Progression. *Microorganisms.* 2020;8(7).
43. Devanand DP. Viral Hypothesis and Antiviral Treatment in Alzheimer's Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018;18(9):55.
44. Jones CA, Isaacs D. Management of herpes simplex virus infections. *Current Paediatrics.* 2004;14(2):131-6.
45. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea.* 2001;20(1):1-13.
46. Kaye S, Choudhary A. Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(4):355-80.
47. Whitley R, Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. *F1000Res.* 2018;7.
48. Seley-Radtke KL, Yates MK. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* 2018;154:66-86.
49. Chapter 64 Antiviral therapy of HSV-1 and -2. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* 2007.
50. Elion GB. Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J Med Virol.* 1993;Suppl 1:2-6.
51. Kimberlin DW, Whitley RJ. Antiviral therapy of HSV-1 and -2. 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.
52. Antoine TE, Park PJ, Shukla D. Glycoprotein targeted therapeutics: a new era of anti-herpes simplex virus-1 therapeutics. *Rev Med Virol.* 2013;23(3):194-208.
53. Koganti R, Yadavalli T, Shukla D. Current and Emerging Therapies for Ocular Herpes Simplex Virus Type-1 Infections. *Microorganisms.* 2019;7(10).

54. Johnston C, Gottlieb SL, Wald A. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine*. 2016;34(26):2948-52.
55. Truong NR, Smith JB, Sandgren KJ, Cunningham AL. Mechanisms of Immune Control of Mucosal HSV Infection: A Guide to Rational Vaccine Design. *Front Immunol*. 2019;10:373.
56. Coleman JL, Shukla D. Recent advances in vaccine development for herpes simplex virus types I and II. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(4):729-35.
57. Bailer SM, Funk C, Riedl A, Ruzsics Z. Herpesviral vectors and their application in oncolytic therapy, vaccination, and gene transfer. *Virus Genes*. 2017;53(5):741-8.
58. Watanabe D. Medical application of herpes simplex virus. *Journal of Dermatological Science*. 2010;57(2):75-82.
59. Sokolowski NA, Rizos H, Diefenbach RJ. Oncolytic virotherapy using herpes simplex virus: how far have we come? *Oncolytic Virother*. 2015;4:207-19.
60. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(9):642-62.
61. Heming JD, Conway JF, Homa FL. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2017;223:119-42.
62. *Cell Biology of Herpes Viruses* 2017.
63. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc)*. 2014;79(13):1635-52.
64. McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, et al. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*. 1988;69 ( Pt 7):1531-74.
65. Liu YT, Jih J, Dai X, Bi GQ, Zhou ZH. Cryo-EM structures of herpes simplex virus type 1 portal vertex and packaged genome. *Nature*. 2019;570(7760):257-61.
66. Loret S, Guay G, Lippe R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*. 2008;82(17):8605-18.
67. Lippe R. Intracellular transport of Alphaherpesvirinae. *Virologie (Montrouge)*. 2020;24(4):210-30.

68. 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.
69. McGeoch DJ. The genome of herpes simplex virus: structure, replication and evolution. *J Cell Sci Suppl.* 1987;7:67-94.
70. Shen Y, Nemunaitis J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther.* 2006;13(11):975-92.
71. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Curr Opin Virol.* 2011;1(2):142-9.
72. Zhou ZH, Dougherty M, Jakana J, He J, Rixon FJ, Chiu W. Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science.* 2000;288(5467):877-80.
73. 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.
74. Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.* 2009;145(2):173-86.
75. Owen DJ, Crump CM, Graham SC. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses.* 2015;7(9):5084-114.
76. Diefenbach RJ. Conserved tegument protein complexes: Essential components in the assembly of herpesviruses. *Virus Res.* 2015;210:308-17.
77. 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.
78. 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.
79. Karasneh GA, Shukla D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. *Virol J.* 2011;8:481.
80. 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.

81. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol*. 2007;17(3):205-15.
82. Aranda AM, Epstein AL. [Herpes simplex virus type 1 latency and reactivation: an update]. *Med Sci (Paris)*. 2015;31(5):506-14.
83. Strang BL, Stow ND. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J Virol*. 2005;79(19):12487-94.
84. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, et al. *Fields virology*. 6th edition.. ed: Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
85. Spear PG, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol*. 2003;77(19):10179-85.
86. 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.
87. Oh MJ, Akhtar J, Desai P, Shukla D. A role for heparan sulfate in viral surfing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):176-81.
88. Ibanez FJ, Farias MA, Gonzalez-Troncoso MP, Corrales N, Duarte LF, Retamal-Diaz A, et al. Experimental Dissection of the Lytic Replication Cycles of Herpes Simplex Viruses in vitro. *Front Microbiol*. 2018;9:2406.
89. Agelidis AM, Shukla D. Cell entry mechanisms of HSV: what we have learned in recent years. *Future Virol*. 2015;10(10):1145-54.
90. Coen DM, Schaffer PA. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(4):278-88.
91. 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).
92. 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.
93. Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses*. 2012;4(5):800-32.

94. Wittels M, Spear PG. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Research*. 1991;18(2-3):271-90.
95. 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.
96. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(5):369-81.
97. Aggarwal A, Miranda-Saksena M, Boadle RA, Kelly BJ, Diefenbach RJ, Alam W, et al. Ultrastructural visualization of individual tegument protein dissociation during entry of herpes simplex virus 1 into human and rat dorsal root ganglion neurons. *J Virol*. 2012;86(11):6123-37.
98. Sodeik B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends in Microbiology*. 2000;8(10):465-72.
99. Wolfstein A, Nagel CH, Radtke K, Dohner K, Allan VJ, Sodeik B. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic*. 2006;7(2):227-37.
100. Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*. 2002;13(8):2795-809.
101. Zhong M, Zheng K, Chen M, Xiang Y, Jin F, Ma K, et al. Heat-shock protein 90 promotes nuclear transport of herpes simplex virus 1 capsid protein by interacting with acetylated tubulin. *PLoS One*. 2014;9(6):e99425.
102. Abaitua F, Hollinshead M, Bolstad M, Crump CM, O'Hare P. A Nuclear localization signal in herpesvirus protein VP1-2 is essential for infection via capsid routing to the nuclear pore. *J Virol*. 2012;86(17):8998-9014.
103. 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.
104. Padeloup D, Blondel D, Isidro AL, Rixon FJ. Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J Virol*. 2009;83(13):6610-23.

105. Jovasevic V, Liang L, Roizman B. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol.* 2008;82(7):3311-9.
106. Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(4):1276-80.
107. Gruffat H, Marchione R, Manet E. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Front Microbiol.* 2016;7:869.
108. Roizman B, Zhou G. The 3 facets of regulation of herpes simplex virus gene expression: A critical inquiry. *Virology.* 2015;479-480:562-7.
109. Kalamvoki M, Roizman B. Circadian CLOCK histone acetyl transferase localizes at ND10 nuclear bodies and enables herpes simplex virus gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(41):17721-6.
110. Kobiler O, Weitzman MD. Herpes simplex virus replication compartments: From naked release to recombining together. *PLoS Pathog.* 2019;15(6):e1007714.
111. Godowski PJ, Knipe DM. Transcriptional control of herpesvirus gene expression: gene functions required for positive and negative regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(2):256-60.
112. Advani SJ, Weichselbaum RR, Roizman B. Herpes simplex virus 1 activates cdc2 to recruit topoisomerase II alpha for post-DNA synthesis expression of late genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(8):4825-30.
113. Rice SA, Long MC, Lam V, Schaffer PA, Spencer CA. Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 is required for viral modification of host RNA polymerase II and establishment of the normal viral transcription program. *J Virol.* 1995;69(9):5550-9.
114. Igarashi K, Fawl R, Roller RJ, Roizman B. Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus 1 lacking both S-component origins of DNA synthesis. *J Virol.* 1993;67(4):2123-32.
115. Polvino-Bodnar M, Orberg PK, Schaffer PA. Herpes simplex virus type 1 oriL is not required for virus replication or for the establishment and reactivation of latent infection in mice. *J Virol.* 1987;61(11):3528-35.

116. Makhov AM, Boehmer PE, Lehman IR, Griffith JD. The herpes simplex virus type 1 origin-binding protein carries out origin specific DNA unwinding and forms stem-loop structures. *Embo j.* 1996;15(7):1742-50.
117. Makhov AM, Lee SS, Lehman IR, Griffith JD. Origin-specific unwinding of herpes simplex virus 1 DNA by the viral UL9 and ICP8 proteins: visualization of a specific preunwinding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):898-903.
118. Muylaert I, Tang KW, Elias P. Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem.* 2011;286(18):15619-24.
119. Skaliter R, Lehman IR. Rolling circle DNA replication in vitro by a complex of herpes simplex virus type 1-encoded enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(22):10665-9.
120. Weller SK. Herpes Simplex Virus DNA Replication and Genome Maturation. *The DNA Provirus2014.* p. 189-213.
121. Severini A, Scraba DG, Tyrrell DL. Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology.* 1996;70(5):3169-75.
122. Wilkinson DE, Weller SK. The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. *IUBMB Life.* 2003;55(8):451-8.
123. Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, Trus BL, Cheng N, Steven A, et al. Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins. *J Virol.* 1999;73(5):4239-50.
124. Tatman JD, Preston VG, Nicholson P, Elliott RM, Rixon FJ. Assembly of herpes simplex virus type 1 capsids using a panel of recombinant baculoviruses. *J Gen Virol.* 1994;75 ( Pt 5):1101-13.
125. 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.
126. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res.* 2009;143(2):222-34.
127. Rixon FJ, Addison C, McGregor A, Macnab SJ, Nicholson P, Preston VG, et al. Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J Gen Virol.* 1996;77 ( Pt 9):2251-60.

128. 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.
129. 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.
130. Yang K, Baines JD. Proline and tyrosine residues in scaffold proteins of herpes simplex virus 1 critical to the interaction with portal protein and its incorporation into capsids. *J Virol.* 2009;83(16):8076-81.
131. Rixon FJ, McNab D. Packaging-competent capsids of a herpes simplex virus temperature-sensitive mutant have properties similar to those of in vitro-assembled procapsids. *J Virol.* 1999;73(7):5714-21.
132. Gao M, Matusick-Kumar L, Hurlburt W, DiTusa SF, Newcomb WW, Brown JC, et al. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. *J Virol.* 1994;68(6):3702-12.
133. Tandon R, Mocarski ES, Conway JF. The A, B, Cs of herpesvirus capsids. *Viruses.* 2015;7(3):899-914.
134. Gibson W, Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol.* 1972;10(5):1044-52.
135. Loret S, El Bilali N, Lippe R. Analysis of herpes simplex virus type I nuclear particles by flow cytometry. *Cytometry A.* 2012;81(11):950-9.
136. Trus BL, Newcomb WW, Cheng N, Cardone G, Marekov L, Homa FL, et al. Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids. *Mol Cell.* 2007;26(4):479-89.
137. 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.
138. Wills E, Scholtes L, Baines JD. Herpes simplex virus 1 DNA packaging proteins encoded by UL6, UL15, UL17, UL28, and UL33 are located on the external surface of the viral capsid. *J Virol.* 2006;80(21):10894-9.



139. Yang K, Homa F, Baines JD. Putative terminase subunits of herpes simplex virus 1 form a complex in the cytoplasm and interact with portal protein in the nucleus. *J Virol.* 2007;81(12):6419-33.
140. Lamberti C, Weller SK. The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J Virol.* 1998;72(3):2463-73.
141. Dasgupta A, Wilson DW. ATP depletion blocks herpes simplex virus DNA packaging and capsid maturation. *J Virol.* 1999;73(3):2006-15.
142. Beilstein F, Higgs MR, Stow ND. Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL33. *J Virol.* 2009;83(17):8938-45.
143. Yang K, Dang X, Baines JD. A Domain of Herpes Simplex Virus pUL33 Required To Release Monomeric Viral Genomes from Cleaved Concatemeric DNA. *J Virol.* 2017;91(20).
144. Huet A, Makhov AM, Huffman JB, Vos M, Homa FL, Conway JF. Extensive subunit contacts underpin herpesvirus capsid stability and interior-to-exterior allostery. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(6):531-9.
145. Cockrell SK, Huffman JB, Toropova K, Conway JF, Homa FL. Residues of the UL25 protein of herpes simplex virus that are required for its stable interaction with capsids. *J Virol.* 2011;85(10):4875-87.
146. Thurlow JK, Murphy M, Stow ND, Preston VG. Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids. *J Virol.* 2006;80(5):2118-26.
147. Ogasawara M, Suzutani T, Yoshida I, Azuma M. Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA. *J Virol.* 2001;75(3):1427-36.
148. 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.
149. Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol.* 2001;75(8):3675-84.

150. Henaff D, Radtke K, Lippe R. Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment. *Traffic*. 2012;13(11):1443-9.
151. Klupp BG, Granzow H, Fuchs W, Keil GM, Finke S, Mettenleiter TC. Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(17):7241-6.
152. 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.
153. Huguet F, Flynn S, Vagnarelli P. The Role of Phosphatases in Nuclear Envelope Disassembly and Reassembly and Their Relevance to Pathologies. *Cells*. 2019;8(7).
154. 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.
155. 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.
156. Vlazny DA, Kwong A, Frenkel N. Site-specific cleavage/packaging of herpes simplex virus DNA and the selective maturation of nucleocapsids containing full-length viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(5):1423-7.
157. 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.
158. Baines JD, Wills E, Jacob RJ, Pennington J, Roizman B. Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane. *J Virol*. 2007;81(2):800-12.
159. Wills E, Mou F, Baines JD. The U(L)31 and U(L)34 gene products of herpes simplex virus 1 are required for optimal localization of viral glycoproteins D and M to the inner nuclear membranes of infected cells. *J Virol*. 2009;83(10):4800-9.

160. Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, et al. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol.* 2009;83(7):3115-26.
161. 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.
162. 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.
163. Johnson DC, Baines JD. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(5):382-94.
164. 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.
165. 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.
166. 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.
167. 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.
168. Lv Y, Zhou S, Gao S, Deng H. Remodeling of host membranes during herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell.* 2019;10(5):315-26.
169. Lehner R, Meyer H, Mach M. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. *J Virol.* 1989;63(9):3792-800.
170. Alba MM, Das R, Orengo CA, Kellam P. Genomewide function conservation and phylogeny in the Herpesviridae. *Genome Res.* 2001;11(1):43-54.

171. Baines JD, Roizman B. The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J Virol.* 1991;65(2):938-44.
172. Fuchs W, Mettenleiter TC. DNA sequence of the UL6 to UL20 genes of infectious laryngotracheitis virus and characterization of the UL10 gene product as a nonglycosylated and nonessential virion protein. *J Gen Virol.* 1999;80 ( Pt 8):2173-82.
173. May JS, Colaco S, Stevenson PG. Glycoprotein M is an essential lytic replication protein of the murine gammaherpesvirus 68. *J Virol.* 2005;79(6):3459-67.
174. König P, Giesow K, Keil GM. Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells. *Veterinary Microbiology.* 2002;86(1-2):37-49.
175. Dijkstra JM, Visser N, Mettenleiter TC, Klupp BG. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J Virol.* 1996;70(8):5684-8.
176. Kawabata A, Jasirwan C, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus 6 glycoprotein M is essential for virus growth and requires glycoprotein N for its maturation. *Virology.* 2012;429(1):21-8.
177. Ren Y, Bell S, Zenner HL, Lau SK, Crump CM. Glycoprotein M is important for the efficient incorporation of glycoprotein H-L into herpes simplex virus type 1 particles. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 2):319-29.
178. Striebinger H, Zhang J, Ott M, Funk C, Radtke K, Duron J, et al. Subcellular trafficking and functional importance of herpes simplex virus type 1 glycoprotein M domains. *J Gen Virol.* 2015;96(11):3313-25.
179. Chouljenko DV, Kim IJ, Chouljenko VN, Subramanian R, Walker JD, Kousoulas KG. Functional hierarchy of herpes simplex virus 1 viral glycoproteins in cytoplasmic virion envelopment and egress. *J Virol.* 2012;86(8):4262-70.
180. Browne H, Bell S, Minson T. Analysis of the requirement for glycoprotein m in herpes simplex virus type 1 morphogenesis. *J Virol.* 2004;78(2):1039-41.

181. MacLean CA, Robertson LM, Jamieson FE. Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo. *J Gen Virol.* 1993;74 ( Pt 6):975-83.
182. Baines JD, Roizman B. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J Virol.* 1993;67(3):1441-52.
183. El Kasmi I, Lippe R. Herpes simplex virus 1 gN partners with gM to modulate the viral fusion machinery. *J Virol.* 2015;89(4):2313-23.
184. Boruchowicz H, Hawkins J, Cruz-Palomar K, Lippe R. The XPO6 exportin mediates HSV-1 gM nuclear release late in infection. *J Virol.* 2020.
185. Crump CM, Bruun B, Bell S, Pomeranz LE, Minson T, Browne HM. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 12):3517-27.
186. Striebinger H, Funk C, Raschbichler V, Bailer SM. Subcellular Trafficking and Functional Relationship of the HSV-1 Glycoproteins N and M. *Viruses.* 2016;8(3):83.
187. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(11):2430-7.
188. Zhang J, Nagel CH, Sodeik B, Lippe R. Early, active, and specific localization of herpes simplex virus type 1 gM to nuclear membranes. *J Virol.* 2009;83(24):12984-97.
189. Kim IJ, Chouljenko VN, Walker JD, Kousoulas KG. Herpes simplex virus 1 glycoprotein M and the membrane-associated protein UL11 are required for virus-induced cell fusion and efficient virus entry. *J Virol.* 2013;87(14):8029-37.
190. Klupp BG, Nixdorf R, Mettenleiter TC. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. *J Virol.* 2000;74(15):6760-8.
191. Osterrieder N, Neubauer A, Brandmuller C, Braun B, Kaaden OR, Baines JD. The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *Journal of Virology.* 1996;70(6):4110-5.

192. Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Kim J, Kousoulas KG. The herpes simplex virus type 1 UL20 protein and the amino terminus of glycoprotein K (gK) physically interact with gB. *J Virol.* 2010;84(17):8596-606.
193. Davis-Poynter N, Bell S, Minson T, Browne H. Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion. *J Virol.* 1994;68(11):7586-90.
194. Koyano S, Mar EC, Stamey FR, Inoue N. Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 6):1485-91.
195. 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.
196. Kopp M, Granzow H, Fuchs W, Klupp B, Mettenleiter TC. Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment. *J Virol.* 2004;78(6):3024-34.
197. Campadelli G, Brandimarti R, Di Lazzaro C, Ward PL, Roizman B, Torrisi MR. Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(7):2798-802.
198. Stingley SW, Ramirez JJ, Aguilar SA, Simmen K, Sandri-Goldin RM, Ghazal P, et al. Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray. *J Virol.* 2000;74(21):9916-27.
199. Baradaran K, Dabrowski CE, Schaffer PA. Transcriptional analysis of the region of the herpes simplex virus type 1 genome containing the UL8, UL9, and UL10 genes and identification of a novel delayed-early gene product, OBPC. *J Virol.* 1994;68(7):4251-61.
200. Fossum E, Friedel CC, Rajagopala SV, Titz B, Baiker A, Schmidt T, et al. Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS Pathog.* 2009;5(9):e1000570.
201. El Kasmi I, Khadivjam B, Lackman M, Duron J, Bonneil E, Thibault P, et al. Extended Synaptotagmin 1 Interacts with Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein M and Negatively Modulates Virus-Induced Membrane Fusion. *J Virol.* 2018;92(1).

202. Wentze SR, Rout MP. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(10):a000562.
203. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, Johnson G. *Cell Biology E-Book.* Philadelphia, UNITED STATES: Elsevier; 2016.
204. Kim YH, Han ME, Oh SO. The molecular mechanism for nuclear transport and its application. *Anat Cell Biol.* 2017;50(2):77-85.
205. O'Reilly AJ, Dacks JB, Field MC. Evolution of the karyopherin-beta family of nucleocytoplasmic transport factors; ancient origins and continued specialization. *PLoS One.* 2011;6(4):e19308.
206. DeGrasse JA, DuBois KN, Devos D, Siegel TN, Sali A, Field MC, et al. Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(9):2119-30.
207. Nuclear-Cytoplasmic Transport. Nicholson AW, editor: Springer International Publishing; 2018 2018. 274 p.
208. Christie M, Chang CW, Rona G, Smith KM, Stewart AG, Takeda AA, et al. Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J Mol Biol.* 2016;428(10 Pt A):2060-90.
209. Tran EJ, Bolger TA, Wentze SR. SnapShot: nuclear transport. *Cell.* 2007;131(2):420.
210. 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.
211. Hetzer MW, Wentze SR. Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes. *Dev Cell.* 2009;17(5):606-16.
212. Otsuka S, Bui KH, Schorb M, Hossain MJ, Politi AZ, Koch B, et al. Nuclear pore assembly proceeds by an inside-out extrusion of the nuclear envelope. *Elife.* 2016;5.
213. Lim RYH, Ullman KS, Fahrenkrog B. Biology and Biophysics of the Nuclear Pore Complex and Its Components. *International Review of Cell and Molecular Biology*2008. p. 299-342.
214. 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).

215. Burns LT, Wente SR. Trafficking to uncharted territory of the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(3):341-9.
216. 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.
217. Schirmer EC, Gerace L. The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(10):551-8.
218. Korfali N, Wilkie GS, Swanson SK, Srsen V, de Las Heras J, Batrakou DG, et al. The nuclear envelope proteome differs notably between tissues. *Nucleus.* 2012;3(6):552-64.
219. Chang W, Worman HJ, Gundersen GG. Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J Cell Biol.* 2015;208(1):11-22.
220. Stroud MJ, Banerjee I, Veevers J, Chen J. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex proteins in cardiac structure, function, and disease. *Circ Res.* 2014;114(3):538-48.
221. Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 2002;158(5):915-27.
222. Kabachinski G, Schwartz TU. The nuclear pore complex--structure and function at a glance. *J Cell Sci.* 2015;128(3):423-9.
223. Frey S, Richter RP, Gorlich D. FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science.* 2006;314(5800):815-7.
224. Adam SA, Marr RS, Gerace L. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol.* 1990;111(3):807-16.
225. Lin DH, Hoelz A. The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update). *Annu Rev Biochem.* 2019;88:725-83.
226. Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(2):73-89.
227. Upla P, Kim SJ, Sampathkumar P, Dutta K, Cahill SM, Chemmama IE, et al. Molecular Architecture of the Major Membrane Ring Component of the Nuclear Pore Complex. *Structure.* 2017;25(3):434-45.



228. 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.
229. Laba JK, Steen A, Veenhoff LM. Traffic to the inner membrane of the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;28:36-45.
230. Zuleger N, Kerr AR, Schirmer EC. Many mechanisms, one entrance: membrane protein translocation into the nucleus. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(13):2205-16.
231. Azimi M, Mofrad MR. Higher nucleoporin-Importin $\beta$  affinity at the nuclear basket increases nucleocytoplasmic import. *PLoS One.* 2013;8(11):e81741.
232. Goldberg MW, Allen TD. The nuclear pore complex: three-dimensional surface structure revealed by field emission, in-lens scanning electron microscopy, with underlying structure uncovered by proteolysis. *Journal of Cell Science.* 1993;106(1):261-74.
233. Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(7):490-501.
234. Sakuma S, D'Angelo MA. The roles of the nuclear pore complex in cellular dysfunction, aging and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;68:72-84.
235. Raices M, D'Angelo MA. Nuclear pore complexes and regulation of gene expression. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;46:26-32.
236. Kuhn TM, Capelson M. Nuclear Pore Proteins in Regulation of Chromatin State. *Cells.* 2019;8(11).
237. Kimura M, Imamoto N. Biological Significance of the Importin- $\beta$  Family-Dependent Nucleocytoplasmic Transport Pathways. *Traffic.* 2014;15(7):727-48.
238. Miyamoto Y, Yoneda Y, Oka M. Protein Transport Between the Nucleus and Cytoplasm. *Nuclear Architecture and Dynamics* 2018. p. 387-403.
239. Zachariae U, Grubmuller H. Importin-beta: structural and dynamic determinants of a molecular spring. *Structure.* 2008;16(6):906-15.
240. Kimura M, Morinaka Y, Imai K, Kose S, Horton P, Imamoto N. Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 importin pathways. *Elife.* 2017;6.

241. Pumroy RA, Cingolani G. Diversification of importin-alpha isoforms in cellular trafficking and disease states. *Biochem J.* 2015;466(1):13-28.
242. Mihalas BP, Western PS, Loveland KL, McLaughlin EA, Holt JE. Changing expression and subcellular distribution of karyopherins during murine oogenesis. *Reproduction.* 2015;150(6):485-96.
243. Jovanovic-Talisman T, Zilman A. Protein Transport by the Nuclear Pore Complex: Simple Biophysics of a Complex Biomachine. *Biophys J.* 2017;113(1):6-14.
244. Mackmull MT, Klaus B, Heinze I, Chokkalingam M, Beyer A, Russell RB, et al. Landscape of nuclear transport receptor cargo specificity. *Mol Syst Biol.* 2017;13(12):962.
245. Zhang ZC, Satterly N, Fontoura BM, Chook YM. Evolutionary development of redundant nuclear localization signals in the mRNA export factor NXF1. *Mol Biol Cell.* 2011;22(23):4657-68.
246. Rexach M, Blobel G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell.* 1995;83(5):683-92.
247. Jakel S, Albig W, Kutay U, Bischoff FR, Schwamborn K, Doenecke D, et al. The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.* 1999;18(9):2411-23.
248. Chook YM, Suel KE. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(9):1593-606.
249. Twyffels L, Gueydan C, Kruys V. Transportin-1 and Transportin-2: protein nuclear import and beyond. *FEBS Lett.* 2014;588(10):1857-68.
250. Christ F, Debyser Z. Role of Transportin-SR2 (Transportin-3, TRN-SR2, TNPO3) in HIV Replication. *Encyclopedia of AIDS2013.* p. 1-5.
251. Campos EI, Fillingham J, Li G, Zheng H, Voigt P, Kuo WH, et al. The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(11):1343-51.
252. Yoshimura SH, Kumeta M, Takeyasu K. Structural mechanism of nuclear transport mediated by importin beta and flexible amphiphilic proteins. *Structure.* 2014;22(12):1699-710.
253. Kobe B, Gleichmann T, Horne J, Jennings IG, Scotney PD, Teh T. Turn up the HEAT. *Structure.* 1999;7(5):R91-R7.

254. Forwood JK, Lange A, Zachariae U, Marfori M, Preast C, Grubmuller H, et al. Quantitative structural analysis of importin-beta flexibility: paradigm for solenoid protein structures. *Structure*. 2010;18(9):1171-83.
255. Conti E, Muller CW, Stewart M. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol*. 2006;16(2):237-44.
256. Harel A, Forbes DJ. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol Cell*. 2004;16(3):319-30.
257. Gorlich D, Vogel F, Mills AD, Hartmann E, Laskey RA. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*. 1995;377(6546):246-8.
258. Moroianu J, Blobel G, Radu A. Nuclear protein import: Ran-GTP dissociates the karyopherin alphabeta heterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(14):7059-62.
259. Otsuka S, Iwasaka S, Yoneda Y, Takeyasu K, Yoshimura SH. Individual binding pockets of importin-beta for FG-nucleoporins have different binding properties and different sensitivities to RanGTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(42):16101-6.
260. Quan Y, Ji ZL, Wang X, Tartakoff AM, Tao T. Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin beta superfamily proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(7):1254-69.
261. Cagatay T, Chook YM. Karyopherins in cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2018;52:30-42.
262. Mahipal A, Malafa M. Importins and exportins as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther*. 2016;164:135-43.
263. Kelley JB, Talley AM, Spencer A, Gioeli D, Paschal BM. Karyopherin alpha7 (KPNA7), a divergent member of the importin alpha family of nuclear import receptors. *BMC Cell Biol*. 2010;11:63.
264. Oka M, Yoneda Y. Importin alpha: functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2018;94(7):259-74.
265. Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5101-5.

266. Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences — a consensus? Trends in Biochemical Sciences. 1991;16:478-81.
267. Fang Y, Jang HS, Watson GW, Wellappili DP, Tyler BM. Distinctive Nuclear Localization Signals in the Oomycete *Phytophthora sojae*. Front Microbiol. 2017;8:10.
268. Riddick G, Macara IG. The adapter importin- $\alpha$  provides flexible control of nuclear import at the expense of efficiency. Mol Syst Biol. 2007;3:118.
269. Miyamoto Y, Yamada K, Yoneda Y. Importin  $\alpha$ : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. J Biochem. 2016;160(2):69-75.
270. Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. Importin  $\alpha$ : a multipurpose nuclear-transport receptor. Trends Cell Biol. 2004;14(9):505-14.
271. Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J. Crystallographic Analysis of the Recognition of a Nuclear Localization Signal by the Nuclear Import Factor Karyopherin  $\alpha$ . Cell. 1998;94(2):193-204.
272. Chang CW, Counago RM, Williams SJ, Boden M, Kobe B. Distinctive conformation of minor site-specific nuclear localization signals bound to importin- $\alpha$ . Traffic. 2013;14(11):1144-54.
273. Pumroy RA, Ke S, Hart DJ, Zachariae U, Cingolani G. Molecular determinants for nuclear import of influenza A PB2 by importin  $\alpha$  isoforms 3 and 7. Structure. 2015;23(2):374-84.
274. Harreman MT, Hodel MR, Fanara P, Hodel AE, Corbett AH. The auto-inhibitory function of importin  $\alpha$  is essential in vivo. J Biol Chem. 2003;278(8):5854-63.
275. Lott K, Cingolani G. The importin  $\beta$  binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. Biochim Biophys Acta. 2011;1813(9):1578-92.
276. Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):195-208.
277. Köhler M, Ansieau S, Prehn S, Leutz A, Haller H, Hartmann E. Cloning of two novel human importin- $\alpha$  subunits and analysis of the expression pattern of the importin- $\alpha$  protein family. FEBS Letters. 1997;417(1):104-8.
278. Sekimoto T, Miyamoto Y, Arai S, Yoneda Y. Importin  $\alpha$  protein acts as a negative regulator for Snail protein nuclear import. J Biol Chem. 2011;286(17):15126-31.

279. Quimby B. The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;15(3):338-44.
280. Görlich D, Panté N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *The EMBO Journal*. 1996;15(20):5584-94.
281. Kutay U, Izaurralde E, Bischoff FR, Mattaj IW, Gorlich D. Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *EMBO J*. 1997;16(6):1153-63.
282. Lee SJ, Matsuura Y, Liu SM, Stewart M. Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature*. 2005;435(7042):693-6.
283. Kimoto C, Moriyama T, Tsujii A, Igarashi Y, Obuse C, Miyamoto Y, et al. Functional characterization of importin alpha8 as a classical nuclear localization signal receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(10 Pt A):2676-83.
284. Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Görlich D. Export of Importin  $\alpha$  from the Nucleus Is Mediated by a Specific Nuclear Transport Factor. *Cell*. 1997;90(6):1061-71.
285. Gorlich D. Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J*. 1998;17(10):2721-7.
286. Bischoff FR, Klebe C, Kretschmer J, Wittinghofer A, Ponstingl H. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(7):2587-91.
287. Koyama M, Matsuura Y. An allosteric mechanism to displace nuclear export cargo from CRM1 and RanGTP by RanBP1. *EMBO J*. 2010;29(12):2002-13.
288. Sun C, Fu G, Ciziene D, Stewart M, Musser SM. Choreography of importin-alpha/CAS complex assembly and disassembly at nuclear pores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(17):E1584-93.
289. Ritterhoff T, Das H, Hofhaus G, Schroder RR, Flotho A, Melchior F. The RanBP2/RanGAP1\*SUMO1/Ubc9 SUMO E3 ligase is a disassembly machine for Crm1-dependent nuclear export complexes. *Nat Commun*. 2016;7:11482.
290. Walther TC, Pickersgill HS, Cordes VC, Goldberg MW, Allen TD, Mattaj IW, et al. The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import. *J Cell Biol*. 2002;158(1):63-77.

291. Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M, Gorlich D. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* 1998;17(22):6587-98.
292. Smith A, Brownawell A, Macara IG. Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Current Biology.* 1998;8(25):1403-S1.
293. Bischoff FR, Ponstingl H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature.* 1991;354(6348):80-2.
294. Saksena S, Shao Y, Braunagel SC, Summers MD, Johnson AE. Cotranslational integration and initial sorting at the endoplasmic reticulum translocon of proteins destined for the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(34):12537-42.
295. Laba JK, Steen A, Popken P, Chernova A, Poolman B, Veenhoff LM. Active Nuclear Import of Membrane Proteins Revisited. *Cells.* 2015;4(4):653-73.
296. 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.
297. 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.
298. 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.
299. Torrisi MR, Lotti LV, Pavan A, Migliaccio G, Bonatti S. Free diffusion to and from the inner nuclear membrane of newly synthesized plasma membrane glycoproteins. *J Cell Biol.* 1987;104(3):733-7.
300. Boni A, Politi AZ, Strnad P, Xiang W, Hossain MJ, Ellenberg J. Live imaging and modeling of inner nuclear membrane targeting reveals its molecular requirements in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2015;209(5):705-20.
301. Soullam B, Worman HJ. Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol.* 1995;130(1):15-27.
302. Powell L, Burke B. Internuclear exchange of an inner nuclear membrane protein (p55) in heterokaryons: in vivo evidence for the interaction of p55 with the nuclear lamina. *J Cell Biol.* 1990;111(6 Pt 1):2225-34.

303. Kerr AR, Schirmer EC. FG repeats facilitate integral protein trafficking to the inner nuclear membrane. *Commun Integr Biol.* 2011;4(5):557-9.
304. 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.
305. Katta SS, Smoyer CJ, Jaspersen SL. Destination: inner nuclear membrane. *Trends Cell Biol.* 2014;24(4):221-9.
306. Ohba T, Schirmer EC, Nishimoto T, Gerace L. Energy- and temperature-dependent transport of integral proteins to the inner nuclear membrane via the nuclear pore. *J Cell Biol.* 2004;167(6):1051-62.
307. King MC, Lusk CP, Blobel G. Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature.* 2006;442(7106):1003-7.
308. 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.
309. Meinema AC, Laba JK, Hapsari RA, Otten R, Mulder FA, Kralt A, et al. Long unfolded linkers facilitate membrane protein import through the nuclear pore complex. *Science.* 2011;333(6038):90-3.
310. Braunagel SC, Williamson ST, Saksena S, Zhong Z, Russell WK, Russell DH, et al. Trafficking of ODV-E66 is mediated via a sorting motif and other viral proteins: facilitated trafficking to the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(22):8372-7.
311. 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.
312. Rexach MF. A sorting importin on Sec61. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(6):476-8.
313. Braunagel SC, Williamson ST, Ding Q, Wu X, Summers MD. Early sorting of inner nuclear membrane proteins is conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(22):9307-12.
314. Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature.* 2007;450(7170):695-701.

315. Walker EJ, Ghildyal R. Editorial: Viral Interactions with the Nucleus. *Front Microbiol.* 2017;8:951.
316. Tessier TM, Dodge MJ, Prusinkiewicz MA, Mymryk JS. Viral Appropriation: Laying Claim to Host Nuclear Transport Machinery. *Cells.* 2019;8(6).
317. Alvisi G, Musiani D, Jans DA, Ripalti A. An importin alpha/beta-recognized bipartite nuclear localization signal mediates targeting of the human herpes simplex virus type 1 DNA polymerase catalytic subunit pUL30 to the nucleus. *Biochemistry.* 2007;46(32):9155-63.
318. Dohner K, Ramos-Nascimento A, Bialy D, Anderson F, Hickford-Martinez A, Rother F, et al. Importin alpha1 is required for nuclear import of herpes simplex virus proteins and capsid assembly in fibroblasts and neurons. *PLoS Pathog.* 2018;14(1):e1006823.
319. Copeland AM, Newcomb WW, Brown JC. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J Virol.* 2009;83(4):1660-8.
320. Alvisi G, Avanzi S, Musiani D, Camozzi D, Leoni V, Ly-Huynh JD, et al. Nuclear import of HSV-1 DNA polymerase processivity factor UL42 is mediated by a C-terminally located bipartite nuclear localization signal. *Biochemistry.* 2008;47(52):13764-77.
321. Braunagel SC, Cox V, Summers MD. Baculovirus data suggest a common but multifaceted pathway for sorting proteins to the inner nuclear membrane. *J Virol.* 2009;83(3):1280-8.
322. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 2016;351(6268):84-8.
323. Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods.* 2014;11(2):122-3.
324. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science.* 2014;343(6166):84-7.
325. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol.* 2005;23(2):222-6.
326. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes<sup>11</sup>Edited by F. Cohen. *Journal of Molecular Biology.* 2001;305(3):567-80.



327. Rost B, Yachdav G, Liu J. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Web Server issue):W321-6.
328. Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kubler J, Lozajic M, et al. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J Mol Biol.* 2018;430(15):2237-43.
329. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(25):10171-6.
330. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:202.
331. Lin JR, Mondal AM, Liu R, Hu J. Minimalist ensemble algorithms for genome-wide protein localization prediction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:157.
332. Ishida T, Kinoshita K. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W460-4.
333. Hanson J, Paliwal KK, Litfin T, Zhou Y. SPOT-Disorder2: Improved Protein Intrinsic Disorder Prediction by Ensembled Deep Learning. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2019;17(6):645-56.
334. Klausen MS, Jespersen MC, Nielsen H, Jensen KK, Jurtz VI, Sonderby CK, et al. NetSurfP-2.0: Improved prediction of protein structural features by integrated deep learning. *Proteins.* 2019;87(6):520-7.
335. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature.* 2014;513(7519):569-73.
336. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1304-9.
337. Grosche L, Döhner K, Dühorn A, Hickford-Martinez A, Steinkasserer A, Sodeik B. Herpes Simplex Virus Type 1 Propagation, Titration and Single-step Growth Curves. *Bio-Protocol.* 2019;9(23).

338. Stegen C, Yakova Y, Henaff D, Nadjar J, Duron J, Lippe R. Analysis of virion-incorporated host proteins required for herpes simplex virus type 1 infection through a RNA interference screen. *PLoS One*. 2013;8(1):e53276.
339. Quensel C, Friedrich B, Sommer T, Hartmann E, Kohler M. In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol Cell Biol*. 2004;24(23):10246-55.
340. Sormanni P, Camilloni C, Fariselli P, Vendruscolo M. The s2D method: simultaneous sequence-based prediction of the statistical populations of ordered and disordered regions in proteins. *J Mol Biol*. 2015;427(4):982-96.
341. Tessier TM, MacNeil KM, Mymryk JS. Piggybacking on Classical Import and Other Non-Classical Mechanisms of Nuclear Import Appear Highly Prevalent within the Human Proteome. *Biology (Basel)*. 2020;9(8).
342. Wang Y, Yang Y, Wu S, Pan S, Zhou C, Ma Y, et al. p32 is a novel target for viral protein ICP34.5 of herpes simplex virus type 1 and facilitates viral nuclear egress. *J Biol Chem*. 2014;289(52):35795-805.
343. Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*. 2000;28(6):1102, 4.
344. Kose S, Furuta M, Imamoto N. Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage. *Cell*. 2012;149(3):578-89.
345. Lu M, Zak J, Chen S, Sanchez-Pulido L, Severson DT, Endicott J, et al. A code for RanGDP binding in ankyrin repeats defines a nuclear import pathway. *Cell*. 2014;157(5):1130-45.
346. Li J, Mahajan A, Tsai MD. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry*. 2006;45(51):15168-78.
347. Sachdev S, Hoffmann A, Hannink M. Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol Cell Biol*. 1998;18(5):2524-34.
348. Rondanino C, Bousser MT, Monsigny M, Roche AC. Sugar-dependent nuclear import of glycosylated proteins in living cells. *Glycobiology*. 2003;13(7):509-19.

349. Monsigny M, Rondanino C, Duverger E, Fajac I, Roche AC. Glyco-dependent nuclear import of glycoproteins, glycoplexes and glycosylated plasmids. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1673(1-2):94-103.
350. Duverger E, Roche AC, Monsigny M. N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology*. 1996;6(4):381-6.

## Annexes

Le tableau ci-dessous présente les gènes du VHS-1 provenant des régions uniques longues et courtes ( $U_L$  et  $U_S$ ) en plus des régions répétées longues et courtes ( $R_L$  et  $R_S$ ) qui codent pour des protéines. Le tableau est tiré et modifié avec la permission de [67].

**Tableau 6.** – Nomenclature des gènes du VHS-1 et des protéines y étant associées

Gène	Protéine	Gène	Protéine	Gène	Protéine
$U_L1$	gL	$U_L25$	$pU_L25$	$U_L49$	VP22
$U_L2$	$pU_L2$	$U_L26$	VP21 et VP24	$U_L49A$	gN
$U_L3$	$pU_L3$	$U_L26.5$	VP22a	$U_L50$	$pU_L50$
$U_L4$	$pU_L4$	$U_L27$	gB	$U_L51$	$pU_L51$
$U_L5$	$pU_L5$	$U_L28$	ICP18.5	$U_L52$	$pU_L52$
$U_L6$	$pU_L6$	$U_L29$	ICP8	$U_L53$	gK
$U_L7$	$pU_L7$	$U_L30$	$pU_L30$	$U_L54$	ICP27
$U_L8$	$pU_L8$	$U_L31$	$pU_L31$	$U_L55$	$pU_L55$
$U_L9$	$pU_L9$	$U_L32$	$pU_L32$	$U_L56$	$pU_L56$
$U_L10$	gM	$U_L33$	$pU_L33$	$U_S1$	ICP22
$U_L11$	$pU_L11$	$U_L34$	$pU_L34$	$U_S2$	$pU_S2$
$U_L12$	$pU_L12$	$U_L35$	VP26	$U_S3$	$pU_S3$
$U_L13$	$pU_L13$	$U_L36$	VP1/2	$U_S4$	gG
$U_L14$	$pU_L14$	$U_L37$	$pU_L37$	$U_S5$	gJ
$U_L15$	$pU_L15$	$U_L38$	VP19c	$U_S6$	gD
$U_L16$	$pU_L16$	$U_L39$	$pU_L39$	$U_S7$	gI
$U_L17$	$pU_L17$	$U_L40$	$pU_L40$	$U_S8$	gE
$U_L18$	VP23	$U_L41$	VHS	$U_S8A$	$pU_S8A$
$U_L19$	VP5	$U_L42$	$pU_L42$	$U_S9$	$pU_S9$
$U_L20$	$pU_L20$	$U_L43$	$pU_L43$	$U_S10$	$pU_S10$
$U_L20.5$	$pU_L20.5$	$U_L44$	gC	$U_S11$	$pU_S11$
$U_L21$	$pU_L21$	$U_L45$	$pU_L45$	$U_S12$	ICP47
$U_L22$	gH	$U_L46$	VP11/12	$R_L1$	$\gamma 34.5$
$U_L23$	TK	$U_L47$	VP13/14	$R_L2$	ICP0
$U_L24$	$pU_L24$	$U_L48$	VP16	$R_S1$	ICP4

**Légende** : p = protéine, g = glycoprotéine, TK = Thymidine kinase, VP = « Viral Protein », ICP = « Infected Cell Protein »