

Mécanismes cellulaires d'adaptation des virus Influenza A : Interaction entre protéine virale NS1 et protéines cellulaires

Charlotte Foret -Lucas

▶ To cite this version:

Charlotte Foret -Lucas. Mécanismes cellulaires d'adaptation des virus Influenza A : Interaction entre protéine virale NS1 et protéines cellulaires. Virologie. 2018. hal-01961588

HAL Id: hal-01961588 https://ephe.hal.science/hal-01961588

Submitted on 20 Dec 2018 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

Charlotte FORET - LUCAS

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Mécanismes cellulaires d'adaptation des virus Influenza A : Interaction entre protéine virale NS1 et protéines cellulaires

Soutenu le 12 Décembre 2018 devant le jury suivant :

Dr Maxime RATINIER – Président Dr Mariette DUCATEZ – Tuteur scientifique

Pr Thierry DUPRESSOIR – Tuteur pédagogique

Dr Olivier LEYMARIE – Rapporteur

Dr Cécile MALNOU – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Mariette DUCATEZ et Dr Romain VOLMER Equipe Virologie UMR 1225 IHAP INRA/ ENVT (Toulouse) - Directeur : Dr Christine CITTI

et de :

Pr Thierry DUPRESSOIR Laboratoire de Pathologie comparée des invertébrés - EPHE (SVT) UMR 1333 DGIMI INRA/UM2 (Montpellier) - Directeur : Dr Anne-Nathalie VOLKOFF



École Pratique des Hautes Études PS



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

Charlotte FORET - LUCAS

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Mécanismes cellulaires d'adaptation des virus Influenza A : Interaction entre protéine virale NS1 et protéines cellulaires

Soutenu le 12 Décembre 2018 devant le jury suivant :

Dr Maxime RATINIER – Président Dr Mariette DUCATEZ – Tuteur scientifique

Pr Thierry DUPRESSOIR – Tuteur pédagogique

Dr Olivier LEYMARIE – Rapporteur

Dr Cécile MALNOU – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Mariette DUCATEZ et Dr Romain VOLMER Equipe Virologie UMR 1225 IHAP INRA/ ENVT (Toulouse) - Directeur : Dr Christine CITTI

et de :

Pr Thierry DUPRESSOIR Laboratoire de Pathologie comparée des invertébrés - EPHE (SVT) UMR 1333 DGIMI INRA/UM2 (Montpellier) - Directeur : Dr Anne-Nathalie VOLKOFF

Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier Jean-Luc GUERIN. Ce diplôme c'est toi qui m'en as donné l'idée. Très rapidement après mon arrivée dans l'équipe tu m'as proposé de m'inscrire, tu as cru en moi et tu m'as fait confiance. Je t'en remercie sincèrement. Je te remercie plus largement de la confiance et des responsabilités que tu me donnes quotidiennement.

Un immense merci à ma tutrice Mariette DUCATEZ. En 2 mots, j'adore travailler avec toi ! Tu me fais confiance et tu as su me laisser libre de gérer ma petite vie en autonomie. J'espère que nous allons continuer à travailler ensemble, « chef ». Un grand merci à Romain VOLMER qui a épaulé Mariette pour ce projet. NS1 c'est ton bébé à la base et je suis fière d'avoir apporté quelques phrases à l'histoire que tu as déjà écrite.

Au cours de ces 3 ans, un petit nouveau est venu se greffer à l'équipe Flu A. Merci Thomas de m'avoir soutenue dans les bons et les mauvais moments de ce projet ! Tu m'as aidée à rebondir et à avoir confiance en moi lorsque j'ai une idée... du moins à prendre du recul. Merci aussi d'en avoir eu quelques-unes d'idées... Avec toi nous avons fait front commun et su imposer les qPCR à Romain ! Et j'oubliais, les stats... c'est nul.

Je souhaite remercier également Thierry DUPRESSOIR pour sa présence, discrète et rassurante tout au long de ces 3 ans. J'ai beaucoup apprécié nos quelques discussions à Montpellier. Je crois que vous êtes mon plus grand fan et suis ravie et fière d'être l'une des dernières étudiantes de votre carrière à l'EPHE !

Je remercie chaleureusement les autres membres du jury qui ont évalué avec beaucoup de bienveillance mon travail. Merci à Olivier Leymarie pour son rapport si complet et ses questions qui ont rendu la discussion et les perspectives enrichissantes. Merci Cécile ! T'avoir comme examinatrice était une évidence et tes mots le jour de la soutenance m'ont profondément touchée. Merci enfin à Maxime Ratinier pour avoir présidé ce jury avec tant de gentillesse. J'espère que nous aurons l'occasion de travailler ensemble.

Je souhaite remercier Carole PICHEREAUX et Audrey GARGAROS, ingénieures au plateau de spectrométrie de masse de l'IPBS, pour leur professionnalisme, leur disponibilité et leur aide précieuse pour l'obtention de l'interactome de NS1.

Un grand Merci au Dr Daniel MARC (INRA, Tours) de m'avoir gracieusement fourni l'anticorps anti-NS1 qui m'a permis d'obtenir THE résultat !

Je remercie les ingénieures du plateau d'imagerie du CPTP, Danièle DAVIAUD et Astrid CANIVET-LAFFITTE pour leur compétence ! Vous avez du matériel de pointe incroyable, vous savez vous en servir et vous savez transmettre votre savoir-faire. Grâce à vous j'ai acquis de superbes images et de super copines !!

Je remercie également Alexandre LUCAS (ici en tant que responsable du plateau APC...). Ton aide efficace en biochimie et ta connaissance des techniques d'analyse des protéines me sont précieuses (entre autres...). Bien entendu, j'apprécie particulièrement ta disponibilité !! Je remercie également Anne THOUARD : grâce à toi et à tes conseils j'ai pu obtenir de super résultats en IP et... avec la PLA ! Un immense merci à Josy : sans tes dizaines de TCID50... je ne sais pas ce que j'aurais fait !

Un merci à Cannelle et Ginger, qui ont donné leur sang pour permettre à la science d'avancer (...).

Le diplôme de l'EPHE c'est aussi six semaines de retour sur les bancs de l'école ! Je souhaite remercier tous les professeurs et intervenants des cinq UE que j'ai suivies. En particulier un grand merci à Thierry DUPRESSOIR, Maxime RATINIER et Olivier REYNARD pour les UE de Virologie ! Un vrai bonheur !

Je souhaite remercier l'équipe de Virologie de l'IHAP dans son ensemble pour l'ambiance que nous entretenons. C'est (presque) toujours un plaisir de venir travailler. Je remercie en particulier les membres du poulailler et de la « Cant'team » : Pierre, Justine (qui seule connait l'importance d'une *Gambette box...*), Elias, Maxime, Jessica (tu nous manques), Julien, Guillaume (Le grand), Marie (Team Brides), Adrien (Merci pour ta thèse au passage... J'ai hâte de découper des organes avec toi !!), Manue (Tu nous manques aussi). Un merci particulier à Brigitte, ma maman du labo.... Tu vas me manquer dans un an !

Se relancer dans les études c'est aussi possible grâce au soutien familial et amical. Alors merci à ma famille d'avoir cru en moi et de m'avoir supportée. En particulier, je me dois de remercier Manou et Laetitia... vous m'avez hébergée plusieurs fois lors de mes UE à Montpellier. Nous avons créé de sacrés souvenirs ensemble qu'ils soient scientifiques (Mwwwiiiiiip), aventuriers (le cadre), gastronomiques ou œnologiques (trop d'exemples). Bref, je vous adore !

Merci à ma cousine Audrey pour ton accueil à Lyon lors des UE de Virologie ! Nous aussi nous avons créé des souvenirs (bien qu'il y ait quelques trous noirs...). Quelques Tequilas et un train raté plus tard, nous sommes plus proches que jamais ! Merci !

Maman, tu as fini par comprendre que j'ai la « Virologie dans le sang » et que c'est celle-là LA passion qui m'anime ! Merci de m'avoir transmis l'importance de la passion. Un immense merci à mon Papa pour ton soutien indéfectible ! Je sais que tu es fier de moi et c'est ma plus grande joie ! Marion... on ne remercie pas quelqu'un d'être sa sœur... pourtant, tu as le meilleur job qui soit pour moi ! Je t'aime infiniment.

Papy et Mamy, je ne peux vous oublier dans ces remerciements. Depuis toute petite vous savez me comprendre mieux que personne et notamment mes aspirations professionnelles. Vous m'avez soutenue et c'est aussi grâce à vous que je continue à tracer ma route comme je l'entends.

Je remercie mes amies qui ont été très présentes durant ces trois dernières années mais aussi bien avant pour certaines, vous ne m'avez jamais lâchée et pourtant je ne suis pas sûre de toujours le mériter ... Merci Caro, Anne, Astrid, Mathilde, Aurélie, Florence, Aline et surtout à toi ma Céline...

On ne peut être épanoui professionnellement si on ne l'est personnellement. Ces trois années ont été marquées par de grands changements et bonheurs dans ma vie personnelle. Je veux donc remercier mes deux A, mes deux Amours, à qui je dédie ce travail :

Alice tu as fait de moi une Maman, il y a déjà 3 ans. Tu es une merveilleuse petite fille et mon souhait le plus cher est, à mon tour, de te transmettre LA passion. Pas la mienne, non, mais celle « qui fait que quand tout est bidon, quelque chose reste vrai. [...] cette flamme qui ne s'éteint jamais, qui survit même aux drames les plus longs, les plus laids » (Linda Lemay). Je ne peux te remercier d'être là sans remercier celui sans qui rien n'est possible. Mon Alex depuis 10 ans et mon mari depuis un an : Ensemble, continuons à ajouter quelques grammes de *Glutathion* pour empêcher nos ponts disulfures de se consumer...

Table des matières

Rer	Remerciements			
List	Liste des abréviations			
List	Liste des figures			
List	Liste des tableaux			
List	e des	s ann	exes	. 15
INT	ROD	UCTI	DN	1
1	Les	virus	Influenza A	. 19
1	.1	Hier	et aujourd'hui	. 19
1	.2	Des	cription et classification des virus Influenza	. 21
	1.2.	.1	Classification et nomenclature	. 21
	1.2.	.2	Structure des virions	. 21
	1.2.	.3	Cycle viral	. 25
1	.3	L'Int	fluenza A Aviaire	. 28
	1.3.	.1	Réservoir des virus Influenza A	. 28
	1.3.	.2	Transmission aux volailles domestiques	. 29
	1.3.3		Hautement Pathogène vs Faiblement Pathogène	. 30
	1.3.4		Contrôle et surveillance de l'Influenza A aviaire dans le monde	. 31
2	Les virus		Influenza : des virus adaptables	. 33
2	.1	Méo	canismes d'évolution génétique	. 33
	2.1.	.1	Le glissement antigénique	. 33
	2.1.	.2	La cassure antigénique	. 34
2	.2	Méd	canismes de transmission inter-espèces	. 35
	2.2.	.1	De l'oiseau à l'Homme	. 35
	2.2.2		Le porc : un hôte intermédiaire clé ?	. 37
	2.2.	.3	Le risque pandémique	. 38
2	.3	Méo	canismes cellulaire d'adaptation des virus Influenza A	. 38
	2.3.1		Récepteurs cellulaires des virus Influenza A	. 38
	2.3.2		Le complexe polymérase	. 40
	2.3.3		Les protéines non structurales	. 41
3	La protéine NS1 : un		ine NS1 : un acteur de l'adaptabilité des VIA	. 42
3	.1	NS1	: synthèse et biochimie	. 42

				Page 7
3	5.2	NS1	: une protéine multifonctionnelle	
	3.2.	1	NS1 et la réponse antivirale	
	3.2.	2	Impact de NS1 sur les mécanismes de transcription et traduction	
3	.3	NS1	: un facteur de virulence et d'adaptation des VIA	
	3.3.	1	Variabilité de NS1 d'une espèce à l'autre	
	3.3.	2	Exemple de l'adaptabilité de NS1 : le domaine PBM	
	3.3.	3	Etude de l'interactome de NS1	
4	Prés	senta	ation du projet	51
MA	TERI	EL ET	METHODES	53
1	Mat	ériel		55
1	1	Cell	ules	55
1	2	Viru	IS	55
1	3	Ant	icorps	55
1	4	Plas	mides	57
2	Mét	thod	es	58
2	.1	Spe	ctrométrie de masse	58
	2.1.	1	Co-immunoprécipitation préparative	
	2.1.	2	Spectrométrie de masse	60
2	.2	Etak	plissement de lignées stables	61
	2.2.1 2.2.2		Transfections et sélection	61
			Vérification des lignées par RT-qPCR	62
2	.3	Cine	étiques d'infection	62
	2.3.	1	Cinétique d'infection en cycle multiple	62
	2.3.2		Cinétique d'infection en cycle unique	63
	2.3.	3	Titrage en TCID50	63
2	.4	Biod	chimie	63
	2.4.	1	Western blot	63
	2.4.2 2.4.3 2.4.4		Immunoprécipitations	65
			Immuno-cytochimie	66
			Immunofluorescence	67
	2.4.	5	« Duolink $^{\ensuremath{\mathcal{B}}}$ in situ fluorescence PLA technology »	67
2	2.5	Log	iciels et statistiques	69
RFS		ATS.		71

			P	age 8
1	Intr	oduc	tion	73
2	2 Analyse de l'interactome de NS1 en spectrométrie de masse		73	
	2.1	Co-i	mmunoprécipitation préparative	73
	2.2	Ider	ntification de 17 protéines candidates	75
3	Con	nfirma	ation des interactions par immunoprécipitation	78
	3.1	Test	s infructueux d'anticorps	78
	3.2	Etak	plissement des lignées surexprimant les protéines fusionnées à un FLAG-	Tag 78
	3.3	Con	firmation des interactions avec NS1 par IP	80
	3.3.	1	Précipitation avec l'anticorps Anti-NS1 IA7	80
	3.3.	2	Précipitation avec les billes FLAG	
4	Con	nfirma	ation des interactions par PLA	
	4.1 Mise en évidence de l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF en transfection transitoire		on 82	
	4.1 stable	Mise s	e en évidence de l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF dans les ligné	es
5	Imp	act d	le la surexpression de CTCF et SNRPA1 sur la réplication du virus	
D	ISCUSS	SION		91
В	IBLIOG	RAPH	1IE	
A	NNEXE	S		110

Liste des abréviations

аа	Acide aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN Complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNc	ARN complémentaire
ARNm	ARN messager
ARNv	ARN viral
BSA	Bovine Serum albumin
CDF1	Chicken Derived Fibroblasts
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
Co-IP	Co-immunoprécipitation
CPSF30	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
СРТР	Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (INSERM)
CTCF	CCCTC binding Factor
DMEM	Dulbecco's Minimum Esssential Medium
DTT	Dithiothréitol
ED	Effector Domain (Domaine effecteur de NS1)
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EIF2S3	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3
EIF4GI	Eukaryotic translation initiation factor 4 G
GAPDH	D-glycéraldéhyde-3-phosphate Déshydrogénase
GFP	Green Fluorescent Protein
HA	Hémagglutinine
HRP	Horseradish Peroxiydase (Péroxydase de raifort)
IAFP	Influenza Aviaire Faiblement Pathogène
IAHP	Influenza Aviaire Hautement Pathogène
IFN	Interféron
IFN-I	Interféron de type 1
INF	Infecté(es)
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IP	Immunoprécipitation

IPBS	Institut de Protéomique et Biologie Structurale
kDa	Kilo Dalton
Μ	Protéine de Matrice
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (cellules de rein de chien)
MOI	Multiplicity Of Infection (Multiplicité d'infection)
Mw	Molecular Weight (Poids moléculaire)
NA	Neuraminidase
NaCl	Chlorure de Sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	Nuclear export Protein
NES	Nuclear Export Sequence
NI	Non infecté(es)
NLS	Nuclear Localisation Signal
NP-40	Nonidet P40 (Octylphenoxy-polyethoxyethanol, IGEPAL®)
NS1	Non structural Protein 1
NS2	Non structural Protein 2
OIE	Office Internationnal des Epizooties ou Organisation Mondiale de la Santé
	Animale (World organization for animal health)
PA	Polymérase acide
PABPI	Polyadenylate-binding protein 1
PB1	Polymérase Basique 1
PB2	Polymérase Basique 2
PBM	PDZ Binding Domain
PBS-T	Phosphate Buffered Saline - Tween 20
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKR	Protein Kinase RNA-activated ou double-stranded RNA-activated protein kinase
PLA	Proximity Ligation Assay
PRP19	Pre-mRNA-processing factor 19
RBD	RNA Binding Domain
RBS	Receptor Binding Site
RIG-I	Retinoic acid-Inducible Gene I
RNP	Ribonucléoprotéine

RNPv	Ribonucléoprotéine virale
rpm	Rotations <i>per</i> minute (Tours par minute)
RT-qPCR	Retro transcrition - quantitative Polymerase chain reaction
SA	Sialic Acid (acide sialique)
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SN	Surnageant
snRNP	Small Nuclear Ribonucleoprotein
SNRPA1	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'
SVF	Serum de Veau Fœtal
ТА	Température Ambiante
TBS-T	Tris Buffered Saline - Tween 20
TCID50	50% Tissue Culture Infective Dose
TGS	Tris Glycine SDS
ТОТ	Total (Lysat total)
ТРСК	Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (Inhibiteur de protéases)
TRIM25	Tripartite Motif-Containing 25
VIA	Virus Influenza de type A
WB	Western Blot

Liste des figures

Figure 1: Ravages de la Grippe espagnole20
Figure 2: Schéma d'une particule virale de virus Influenza A
Figure 3: Virions observés en microscopie électronique à transmission
Figure 4: Mécanisme d'activation de l'hémagglutinine et fusion
Figure 5 : Cycle de réplication des virus Influenza A27
Figure 6: Schématisation de la diffusion des virus influenza A par les oiseaux sauvages
aquatiques
Figure 7: Localisation de la réplication des virus IAFP et IAHP chez le poulet
Figure 8: Evolution des virus Influenza A pandémiques au cours du temps
Figure 9: Transmission inter-espèces de virus influenza A
Figure 10: Reconstruction de la séquence d'évènements de réassortiments ayant conduit à
l'émergence du VIA A(H1N1)pdm0937
Figure 11: Effets de la combinaison PB1/PB2 d'origines différentes et selon la température . 41
Figure 12: Structure monomérique de NS142
Figure 13: Structure tridimensionnelle de la NS143
Figure 14: Schéma des différents niveaux d'implication de NS1 au cours du cycle de
réplication en cellules humaines45
Figure 15: Distribution des motifs PBM dans 1196 protéines NS1 de VIA
Figure 16: Réseau des interactions de la NS1 du VIA H7N9 (A/Taiwan/1/2013) en cellules
humaines
Figure 17: Carte du vecteur pcDNA3.1 (FLAG-Tag)57
Figure 18: Marqueur de poids moléculaire Lonza60
Figure 19: Marqueur de poids moléculaire BIO-RAD64
Figure 20: Principe de la technologie de marquage fluorescent in situ Duolink® (PLA)
Figure 21: IP préparative Col de SDS PAGE 74
rigure 21. IF preparative, Ger de 3D3-FAGE
Figure 22: Gel préparatif pour la spectrométrie de masse
Figure 22: Gel préparatif pour la spectrométrie de masse
Figure 22: Gel préparatif pour la spectrométrie de masse
Figure 22: Gel préparatif pour la spectrométrie de masse

Figure 26: IP anti-FLAG avec les lignées CDF1-SNRPA1 et CDF1-CTCF
Figure 27: Vérification de l'efficacité d'infection et de transfection (transitoire) des CDF1
en IF
Figure 28 : Analyse par PLA des interactions de NS1 avec SNRPA1 et CTCF dans les CDF1
transfectées transitoirement et infectées
Figure 29: Analyse par PLA des interactions de NS1 avec SNRPA1 et CTCF dans les lignées
stables
Figure 30: Cinétiques d'infection du virus 977 dans les lignées CDF1 surexprimant SNRPA1 ou
CTCF (Cycles multiples)

Liste des tableaux

Tableau 1: Nombre de cas confirmés de H5N1 chez l'Homme depuis 2003	. 36
Tableau 2: Les protéines interagissant avec NS1 en cellules humaines	49
Tableau 3: Liste des anticorps utilisés	56
Tableau 4: Vecteurs Genscript	. 57
Tableau 5: amorces de RT-qPCR	62
Tableau 6: Programmes de transfert (Trans-blot [®] Turbo)	64
Tableau 7: Liste des billes utilisées pour les co-immunoprécipitations	65
Tableau 8: Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse	77

Liste des annexes

- Annexe 1 : Liste brute des 381 protéines identifiées en spectrométrie de masse
- Annexe 2 : Rapport de fin d'étude de la plateforme de spectrométrie de masse de l'IPBS
- Annexe 3 : Protocole de transfection à la Lipofectamine[®] 2000 reagent (Invitrogen)
- Annexe 4 : Protocole de Duolink[®] PLA (Sigma Merck Millipore)
- Annexe 5 : Liste des anticorps testés en WB non validés
- Annexe 6 : Poster présenté aux XIX^{èmes} Journées Francophones de Virologie (2017)

INTRODUCTION

1 Les virus Influenza A

1.1 Hier et aujourd'hui

Un siècle après la terrible pandémie de « Grippe espagnole » les virus Influenza continuent leurs ravages. L'Histoire ne commence pourtant pas là. Une première description de la maladie remonte à 2430 ans : dans son traité « *Epidémies* » Hippocrate évoque une épidémie de toux, suivie de pneumonies et autres symptômes typiques, à Perinthus dans le nord de la Grèce (Martin and Martin-Granel, 2006). Dans la Rome antique, Tite-Live décrit dans son œuvre l'*Histoire romaine* des épidémies brutales qui semblent *a posteriori* pouvoir être attribuées à la grippe. Les données historiques concernant la grippe sont complexes à interpréter, car le syndrome grippal se rencontre aussi dans d'autres maladies épidémiques (diphtérie, fièvre typhoïde, dengue, ...). Ce n'est qu'en 1743, à Paris, que le terme de grippe apparait ; dérivé de « agrippe » :

[... esquissant en deux syllabes l'anxieuse et typique physionomie du patient. Vers le même temps, les Italiens, frappés surtout du nombre incalculable des personnes qui subissaient, dans chaque manifestation et à des degrés divers, l'influence du catarrhe épidémique, le désignaient par ce caractère même, en le qualifiant d'Influenza : c'est-à-dire l'influence au suprême degré] (Delmas, 1896).

En appliquant les critères modernes de caractérisation d'une épidémie comme étant une pandémie d'Influenza, on dénombre 14 pandémies entre 1509 et 2009 (Taubenberger and Morens, 2010). Cependant, près d'un tiers de ces épisodes ont eu lieu durant le seul XX^{ème} siècle notamment la tristement célèbre Grippe espagnole. A l'origine d'au minimum 50 millions de décès en l'espace d'une année (Figure 1) l'agent responsable est un virus Influenza A H1N1 d'origine aviaire.

Caractérisé génétiquement dans les années 1980 grâce au développement des méthodes de PCR et de séquençage, puis de génétique inverse (Taubenberger et al., 2012), il est considéré comme l'ascendant de tous les virus Influenza circulant chez l'homme aujourd'hui (Taubenberger and Morens, 2006).





Figure 1: Ravages de la Grippe espagnole

A) Courbes de mortalité lors de la pandémie d'Influenza entre 1918 et 1919 en Europe et aux Etats-Unis B) Hôpital militaire d'urgence durant l'épidémie d'Influenza en 1918 (Camp Funston, Kansas, Etats-Unis, 1918). D'après (Nicholls, 2006).

Si l'on excepte les épisodes ponctuels bien que récurrents de pandémies, la grippe fait également parler d'elle chaque année au retour de l'hiver. Chaque année 3 à 5 millions de cas et jusqu'à 650 000 décès seraient associés aux affections respiratoires dues à la grippe saisonnière, selon de nouvelles estimations publiées par l'Organisation mondiale de la Santé (*Décembre 2017, www.who.int*).

Du coté des animaux, et plus particulièrement des oiseaux (sauvages ou domestiques) il est plus difficile de connaitre avec certitude les épizooties causées par les virus Influenza au cours de l'Histoire. Depuis l'antiquité de nombreux épisodes graves de maladies contagieuses ont été rapportés chez les oiseaux certainement dus à plusieurs agents pathogènes différents (Blancou, 2000). La première référence à la « grippe aviaire » date de 1878. Edoardo Perroncito décrit alors « une maladie contagieuse et hautement mortelle affectant la volaille ». La maladie incriminée est alors appelée peste aviaire et est confondue avec une forme septicémique sévère de choléra aviaire (causée, elle, par la bactérie *Pasteurella multocida*). La différence entre les deux pathologies est faite en 1880 par Rivolta et Delprato de par leurs caractères cliniques. En 1901, l'agent causal de la peste aviaire est identifié comme étant un virus filtrable par Centunni et Savunzzi. Il faudra attendre 1955 pour que cette pathologie soit attribuée à un virus Influenza A. Le terme de peste aviaire est alors abandonné au profit de « Influenza aviaire hautement pathogène » lors du premier symposium international sur l'Influenza Aviaire de 1981 (Lupiani and Reddy, 2009).

1.2 Description et classification des virus Influenza

1.2.1 Classification et nomenclature

Les virus Influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Ils sont regroupés en 4 genres différents : *Influenzavirus* A, B, C et D contenant chacun une seule espèce virale désignée communément comme virus Influenza de type A, B, C ou D. Les virus de type B et C sont principalement détectés chez l'Homme et ceux de type D, récemment identifiés, infectent principalement les bovins et les porcs mais semblent plus largement répandus chez les mammifères (Hause et al., 2014). Quant aux virus Influenza de type A, les plus répandus, ils possèdent un vaste spectre d'hôtes vertébrés. Ils sont classés en sous-types désignant les types antigéniques des deux glycoprotéines virales présentes à leur surface (*cf 1.2.2*).

A ce jour 18 types d'hémagglutinines et 11 types de neuraminidases (Alexander, 2000; Wu et al., 2014) ont été identifiées. Appartenant au type des virus influenza A (VIA), les virus Influenza aviaires sont quant à eux très surveillés et étudiés. D'un point de vue santé publique, les virus Influenza aviaires peuvent être transmis aux mammifères et notamment à l'Homme et sont susceptibles d'engendrer une pandémie comme évoqué précédemment. De plus, ces virus infectant un large éventail d'oiseaux sauvages comme domestiques, ils représentent une menace économique importante pour l'industrie avicole mondiale.

1.2.2 Structure des virions

Les virus Influenza sont des virus enveloppés possédant un génome à ARN simple brin de polarité négative et segmenté en 8 fragments codant pour environ 14 protéines (Figure 2). Ils possèdent une capside hélicoïdale et sont généralement sphériques (environ 100nm de diamètre) mais des virions d'aspect filamenteux (100nm x 20µm) sont observés notamment dans les prélèvements humains (Figure 3). L'enveloppe virale provient de la bicouche lipidique de la membrane des cellules infectées. Trois protéines virales sont enchâssées dans l'enveloppe: les deux glycoprotéines de surface, hémagglutinine et neuraminidase, ainsi que le canal ionique M2.



Figure 2: Schéma d'une particule virale de virus Influenza A

Le génome du virus influenza de type A est composé de 8 segments d'ARN négatifs simple brin. Les segments 1, 2 et 3 codent pour les protéines PB2, PB1 et PA constituant le complexe polymérase. Certains virus possèdent les protéines accessoires PB1 N40 et PB1-F2 sur le segment 2 ainsi que la protéine PA-X sur le troisième segment. Le segment 4 code pour la protéine HA nécessaire à l'adhésion à la cellule cible. Le segment 5 code pour la nucléoprotéine (NP). Le segment 6 code pour la protéine NA, indispensable pour la libération du virion depuis la cellule hôte. Le segment 7 code pour à la protéine de matrice (M1) et des protéines du canal ionique (M2 et M42). Le dernier segment code pour les protéines non structurales NS1 et NS2 (ou NEP). L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique originaire de la membrane plasmidique de la cellule hôte. La face interne de l'enveloppe virale est recouverte de protéines de matrice M1. L'association de chaque ARN viral avec NP, PA, PB1 et PB2 forme les RNP (Ribonucléoprotéines, à droite). D'après (Lion, 2017; Medina and García-Sastre, 2011)



Figure 3: Virions observés en microscopie électronique à transmission

A) Particules virales issues d'isolement sur cellules (A/H1N1pdm) sous forme sphériques, barre d'échelle 100nm **B)** Particules virales observées dans une coupe de poumon (A/H1N1pdm) sous forme filamenteuse, Barre d'échelle 200nm. (Nakajima et al., 2010)

• Les protéines de surface

L'hémagglutinine et la neuraminidase sont les principaux déterminants antigéniques des VIA. L'hémagglutinine (HA), codée par le segment 4, est un homotrimère, chaque monomère étant composé de deux sous-unités HA1 et HA2 (issues du clivage d'un précurseur : HA0). La sous-unité HA1, essentiellement extracellulaire, comporte le site de liaison au récepteur (RBS, *Receptor binding site* en anglais) qui permet l'adhésion de la particule virale à la cellule cible. Elle est aussi la cible majeure des anticorps neutralisants de l'hôte. La sous unité HA2 constitue essentiellement la tige et contient un peptide hydrophobe qui assure la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome de la cellule cible. Cette fusion nécessite que ce peptide soit libre, c'est-à-dire que HA0 soit effectivement clivée en HA1 et HA2. Ce sont généralement des protéases extracellulaires qui assurent ce clivage au niveau du site de clivage situé en amont du peptide de fusion (Figure 4) (Cheung and Poon, 2007).



Figure 4: Mécanisme d'activation de l'hémagglutinine et fusion

L'hémagglutinine est une glycoprotéine homotrimérique qui résulte de l'association de trois monomères HAO (à gauche). Chaque monomère est constitué d'un domaine HA2 (en violet) ancré dans la bicouche lipidique (C2) de l'enveloppe virale sur laquelle repose HA1 (en bleu). Une fois le virion internalisé dans l'endosome, l'acidification du contenu endosomal induit une transformation structurale de HA (à droite). HA2 se déploie alors verticalement, exposant à son extrémité distale le peptide de fusion (N2), lequel va s'insérer dans la membrane de la vésicule d'endocytose pour conduire à la fusion des membranes. D'après (Lion, 2017; Russell et al., 2008) La neuraminidase (NA), codée par le segment 6, est un homotétramère formant une structure en tige surmontée d'une tête globulaire. Elle possède une activité enzymatique de type sialidase qui permet la libération des nouveaux virions par clivage des acides sialiques cellulaires liés à l'hémagglutinine (*cf. 2.3.1*). Elle est également une cible privilégiée des anticorps neutralisants de l'hôte.(Cheung and Poon, 2007)

Du fait de leur exposition à la surface du virion, les deux glycoprotéines de surface NA et HA des virus influenza sont également des cibles de choix pour les traitements antiviraux. L'HA est également le composant principal des vaccins antigrippaux.

A la surface du virion on retrouve enfin la protéine de matrice M2. Codée par le segment 7, c'est un homotétramère qui forme un canal à protons traversant l'enveloppe virale. Ce canal permet l'acidification interne du virion, ainsi que l'acidification de la vésicule d'endocytose cellulaire, qui assure la fusion des virions lors de l'infection cellulaire.

• Les protéines structurales

Chacun des huit ARN viraux est associé à plusieurs nucléoprotéines virales (NP), codées par le segment 5. Elles forment ainsi des ribonucléoprotéines virales (RNPv) de structure hélicoïdale. Chacune de ces RNP contient aussi un exemplaire de la polymérase virale constituée des 3 sousunités PA (polymérase acide codée par le segment 3), PB1 et PB2 (polymérases basiques 1 et 2, codées respectivement par les segments 2 et 1) (Figure 2). Ce complexe a pour rôle de convertir l'ARN *génomique viral* (ARNv, négatif) en ARN complémentaire (ARNc, positif) et en ARN messager (ARNm, positif). L'ARNm est destiné à la synthèse des protéines virales (Transcription, traduction) l'ARNc sert de support à la transcription de brins d'ARNv (réplication) qui constitueront le matériel génétique des nouveaux virions (Cheung and Poon, 2007; Herz et al., 1981; Palese, 1977). Egalement codée par le segment 7, la protéine de matrice M1 tapisse la face interne de l'enveloppe virale. Elle interagit avec l'ARN viral ainsi qu'avec les protéines des RNPv lors de leur assemblage et désassemblage, ce qui lui confère plusieurs fonctions importantes pour le virus

• Les protéines non-structurales

(Chen et al., 2001; Cheung and Poon, 2007).

Outre les huit protéines citées plus haut, la particule virale contient aussi quelques exemplaires des protéines non structurales NS1 et NS2.Egalement appelée NEP (*Nuclear Export Protein*), NS2 joue un rôle important dans l'export nucléo-cytoplasmique des RNP précédant la libération des

virions (Yasuda et al., 1993). NS1 quant à elle reste la moins représentée des protéines virales dans la particule (Hutchinson et al., 2014).

• Les protéines accessoires

Certaines souches de virus influenza A possèdent des protéines accessoires (structurales ou non) dont notamment PB1-F2 (facteur de virulence) et PB1-N40 (favorisant la réplication virale), issues de cadres ouverts de lecture alternatifs. Ces deux protéines sont également des protéines non structurales, non présentes dans le virion. La protéine PA-X, quant à elle, résulte d'un saut du cadre de lecture au sein du segment PA (Jagger et al., 2012).

A l'instar d'autres virus enveloppés tels que les *herpesvirus*, les virus Influenza peuvent emporter certaines protéines cellulaires au sein du virion. Des études en spectrométrie de masse ont permis d'identifier pas moins de 36 protéines cellulaires dont 25 communes à plusieurs familles de virus. Ces protéines de l'hôte sont soit enchâssées dans l'enveloppe lipidique du virus (protéines transmembranaires ou localisées à la membrane telles que les protéines du cystosquelette) ou encore à l'intérieur de la nucléocapside (telles que les annexines). Le rôle de ces protéines est encore peu décrit. L'hypothèse la plus probable suggère que les protéines de l'hôte favorise l'entrée du virus dans la cellule (Shaw et al., 2008).

1.2.3 Cycle viral

Les cellules de l'épithélium de l'appareil respiratoire de l'hôte sont les premières exposées au virus et donc ses premières cibles. De plus, elles expriment à leur surface des récepteurs cellulaires riches en groupements acides sialiques. Or l'HA des VIA est spécifique de ces groupements permettant l'entrée du virus dans la cellule. S'en suit alors le processus de réplication virale tel que décrit ci-dessous (Figure 5) (Knipe and Howley, 2007; Medina and García-Sastre, 2011; Rossman and Lamb, 2011) :

- I. L'hémagglutinine se lie aux acides sialiques de la cellule cible.
- Le virion pénètre dans la cellule par endocytose par la voie des clathrines qui recouvrent la face cytosolique de la cellule (qui devient ensuite la vésicule d'endocytose).
- III. La vésicule d'endocytose et la partie interne de la particule virale, grâce au canal ionique M2, s'acidifient. L'acidification entraîne le remaniement structural de l'HA, qui provoque la fusion de la membrane endosomale avec l'enveloppe virale.

- IV. Les RNPv sont alors libérées dans le cytosol et transportées vers le noyau grâce aux NP qui portent un signal de localisation nucléaire (NLS) leur permettant d'interagir avec la machinerie d'import nucléaire de la cellule.
- V. Les ARNv de polarité négative sont transcrits en ARN messagers par la polymérase virale formée par le complexe PB1, PB2 et PA et grâce au mécanisme de *cap snatching* (vol d'une coiffe d'ARN pré-messager cellulaire).
- VI. Les ARNm viraux, exportés dans le cytoplasme cellulaire, sont traduits en protéines virales. Les protéines HA, NA et M2, en passant par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, intègrent la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Leur accumulation entraine la formation de radeaux lipidiques, sites de d'assemblages des futurs virions.
- VII. En parallèle, les ARN viraux sont répliqués pour synthétiser le futur génome viral : la polymérase virale synthétise des ARN complémentaires (ARNc) de polarité positive, lesquels servent de matrice pour la synthèse de nouveaux ARNv de polarité négative. Ceux-ci forment alors de nouvelles RNP.
- VIII. Les RNPv, nouvellement produites, sont exportées du noyau vers le cytoplasme à l'aide des protéines virales NEP et M1.
 - IX. Les 8 RNPv s'assemblent avec les protéines d'enveloppe dans le noyau et/ou le cytoplasme via la protéine M1 formant de nouvelles particules virales bourgeonnant à la surface des cellules.
 - X. Les particules virales liées aux acides sialiques de la surface de la cellule sont libérées, grâce à l'activité sialidase de la neuraminidase.



Figure 5 : Cycle de réplication des virus Influenza A D'après (Medina and García-Sastre, 2011)

1.3 L'Influenza A Aviaire

1.3.1 Réservoir des virus Influenza A

Les oiseaux aquatiques sauvages, essentiellement ceux des ordres des *Ansériformes* (oies et canards) et des *Charadriiformes* (échassiers, oiseaux marins...), constituent le réservoir naturel des virus influenza A (Alexander, 2000). Cela signifie que tous les VIA (incluant les souches responsables de la grippe saisonnière humaine et celles associées à des infections de mammifères) ont pour origine des virus aviaires.

L'extrême variété de l'avifaune sauvage, notamment des « canards » (colverts, pilets, plongeurs, sarcelles, ...) (Olsen et al., 2006) contribue à l'apparition de nouvelles souches. En effet, l'ensemble des types d'hémagglutinine H1 à H16 et de neuraminidase N1 à N9 a été retrouvé chez des oiseaux aquatiques sauvages, avec une répartition mondiale. De plus, ces oiseaux, en particuliers les canards, vivent et se nourrissent dans des zones humides d'eau douce (marais, étangs, lacs, rivières) dans toutes les régions tempérées et subtropicales du monde. Chez ces oiseaux aquatiques, le virus se multiplie en général dans les voies intestinales et ce de façon asymptomatique dans la majorité des cas. Son excrétion favorise ainsi le maintien d'une population virale dans le milieu aquatique (les virus pouvant persister dans l'eau plusieurs semaines, une transmission oro-fécale est donc possible) (Nazir et al., 2011).

L'infection de ces espèces, dont beaucoup sont migratrices, entraîne également une dissémination des virus le long des couloirs de migration entre continents. L'infection asymptomatique ainsi que la dissémination lors des migrations favorise la circulation des virus depuis l'avifaune sauvage vers les volailles domestiques.

Enfin les VIA peuvent diffuser depuis les oiseaux sauvages aquatiques vers les humains, les porcs, les mammifères marins ou les volailles domestiques (Figure 6).

Le cumul de toutes ces voies de dissémination et de transmission des virus Influenza A entrainent un brassage génétique intense, la persistance d'une grande variété de virus circulant et donc l'apparition constante de nouvelles souches.



Figure 6: Schématisation de la diffusion des virus influenza A par les oiseaux sauvages aquatiques

D'après (Knipe and Howley, 2007; Tong et al., 2012)

1.3.2 Transmission aux volailles domestiques

Les virus influenza aviaires, qui circulent de façon continue dans l'avifaune sauvage, peuvent infecter les volailles domestiques principalement de l'ordre des *Galliformes* (poulets, dindes, cailles, pintades, ...) et de celui des *ansériformes* (canards, oies, ...). La contamination des volailles domestiques est favorisée par des situations de proximité avec l'avifaune sauvage comme les élevages de plein air. Dans ce type d'élevage, la contamination se fait le plus souvent par contact indirect par exposition aux fientes d'oiseaux migrateurs (Munster and Fouchier, 2009) contenant des particules virales ou par contact direct entre animaux (plus rare). Une fois qu'un élevage est contaminé, le virus peut être transmis à d'autres élevages par le transport de volailles entre élevages (très fréquents en élevage (chaussures, vêtements et/ou équipements de travail contaminés). Les VIA peuvent persister jusqu'à un an dans des eaux présentant des conditions idéales en termes de pH, de température et de salinité ainsi que dans des sédiments de lacs (Nazir et al., 2011). Les VIA pourrait aussi se maintenir à l'état congelé dans les sols durant l'hiver (Ito et al., 1995) ou persister à bas bruit chez les oiseaux migrateurs (Krauss et al., 2004).

Un large éventail de sous-types de VIA peuvent infecter les volailles et causer des infections

asymptomatiques comme létales (Pantin-Jackwook and Swayne, 2009). Les sous-types H5, H6, H7 et H9 sont les plus fréquents en Eurasie (Alexander, 2000; Brown, 2010). Cependant on observe des profils d'infection distincts et des sensibilités variables selon l'espèce de volaille touchée (poulet, canard, oies, dindes, etc).

1.3.3 Hautement Pathogène vs Faiblement Pathogène

Du point de vue santé publique, l'influenza aviaire est une maladie infectieuse des oiseaux sauvages et domestiques qui peut être transmise aux mammifères, y compris l'Homme, et constitue donc une menace permanente pour la santé humaine. Dans une perspective vétérinaire, l'influenza aviaire est une épizootie hautement contagieuse de la volaille domestique (*Galliformes* et *Ansériformes*) qui cause des pertes économiques importantes aux industries avicoles du monde entier. Cette épizootie est typiquement caractérisée par des épisodes récurrents d'infections par des virus influenza aviaires des sous-types H5, H6, H7 ou H9 déjà évoqués.

Néanmoins, les VIA aviaires sont classés en deux niveaux de pathogénicité pour les volailles : les virus influenza aviaires hautement pathogènes (IAHP) et faiblement pathogènes (IAFP). Ce classement est réalisé soit par évaluation directe après infection expérimentale de poulets suivant un protocole standardisé de l'Organisation Mondiale de la Santé animale (OIE), soit par le séquençage du gène de l'hémagglutinine qui révèle la présence ou l'absence d'un site de clivage de HAO polybasique (Figure 7). A ce jour, le pathotype IAHP a été exclusivement associé aux sous-types H5 et H7.

Certains virus IAHP peuvent entraîner des taux de mortalité très importants dans les élevages atteints. La volaille domestique est sensible à des transmissions par voies oro-fécale et respiratoire (Munster and Fouchier, 2009). Selon l'OIE, le délai d'incubation des virus est de 3 à 5 jours en moyenne (maximum 21 jours). Les gallinacées (poules et dindes) sont généralement plus enclines à développer des signes cliniques graves de la maladie avec une mortalité allant jusqu'à 100% avec des virus IAHP. L'infection est le plus souvent asymptomatique chez les palmipèdes, y compris avec des virus IAHP. Toutefois, de graves pertes ont été à déplorer chez certaines espèces sauvages et dans les élevages de palmipèdes touchés par certains virus IAHP. Ces observations ont été très bien illustrées par la récente épizootie de virus IAHP de sous-type H5N8 dans toute l'Europe durant l'hiver 2016-2017, qui a entraîné des pertes considérables dans la filière de palmipèdes à foie gras.



Figure 7: Localisation de la réplication des virus IAFP et IAHP chez le poulet

La réplication de virus IAFP et IAHP dans l'organisme est déterminée par la distribution des protéases chez le poulet : la HA des virus IAHP possèdent un site de clivage polybasique permettant à des protéases cellulaires ubiquitaires de le cliver (Vey et al., 1992). La présence de ce site polybasique est associée à la réplication des virus IAHP hors des tractus respiratoire ou digestif. Il permet donc au virus de causer d'importants dégâts dans un spectre tissulaire élargi. D'après (Horimoto and Kawaoka, 2005)

1.3.4 Contrôle et surveillance de l'Influenza A aviaire dans le monde

Les raisons de santé publique et économiques évoquées précédemment conduisent à une surveillance importante de la circulation des virus Influenza. Des mesures sont dictées par l'OIE et les autorités nationales à l'attention des producteurs de volailles lors d'une épizootie, mais aussi en période d'absence de maladie afin de contrôler et prévenir la dissémination des agents pathogènes. En cas de morbidités ou de mortalités suspectes, des prélèvements sont réalisés et analysés (inoculation d'œufs embryonnés et tests d'hémagglutination, tests d'inhibition de l'hémagglutination ou RT-PCR quantitative). Lorsqu'un cas d'influenza aviaire de type H5 ou H7 est confirmé, le signalement auprès de l'OIE est obligatoire. Il s'en suit l'abattage systématique de l'élevage ainsi que sa mise en quarantaine (un délai de trois semaines après décontamination de l'élevage doit être respecté avant l'introduction de nouveaux animaux). Lors d'épizooties, en plus des règles précédentes, certaines zones à hauts risques peuvent être soumises à une stratégie de vaccination comme mesure d'urgence
notamment pour des populations d'oiseaux qu'il faut préserver (zoo par exemple). Ces stratégies de vaccination sont appliquées quand les mesures complémentaires d'éradication sont insuffisantes pour maîtriser le foyer. Par exemple, le programme de vaccination en Asie du Sud-Est (Chine, Vietnam, Indonésie et Hong-Kong), zone d'endémie des virus IAHP H5N1, représente 125 milliards de doses vaccinales administrées aux volailles entre 2004 et 2012 (Castellan et al., 2014). En Egypte, où il existe une zone d'endémie depuis 2006 pour des virus IAHP H5N1, une stratégie de vaccination a été mise en place (Grund et al., 2011). Cependant la vaccination incomplète des élevages dans ces zones d'endémies conduit à une pression de sélection permettant l'échappement de nouveaux virus après glissement antigénique (Carrat and Flahault, 2007).

Malgré les efforts internationaux en termes de préparation pré-pandémique, nous sommes toujours incapables de prédire l'apparition d'une nouvelle souche aviaire à haut pouvoir pandémique chez l'Homme. Mieux comprendre les interactions hôte-virus devrait nous permettre d'identifier des déterminants de l'adaptation des VIA à leurs hôtes (franchissement de la barrière d'espèce) aux niveaux protéique et moléculaire et contribuer ainsi à améliorer notre préparation pré-pandémique.

2 Les virus Influenza : des virus adaptables

2.1 Mécanismes d'évolution génétique

Les virus Influenza A se caractérisent par leur grande capacité d'évolution. Deux mécanismes majeurs régissent leur extrême variabilité génétique : le glissement antigénique (*Antigenic Drift*) et la cassure antigénique (*Genetic shift*). Ces mécanismes, combinés au temps de génération court du virus, sont sources de variabilité et donc d'adaptabilité rapide à un nouvel environnement ou à un nouvel hôte.

2.1.1 Le glissement antigénique

Appelé également dérive génétique, ce mécanisme est dû au caractère peu fidèle de l'ARN polymérase ARN dépendante. Celle-ci ne possède pas d'activité exonucléase et ne peut ni relire ni corriger ses erreurs. Cela entraine l'introduction, la délétion ou la substitution de nucléotides avec un taux d'erreur de 10⁻⁵ à 10⁻⁶ par nucléotide et par cycle infectieux (1 000 fois plus que l'ADN polymérase humaine) (Chen and Holmes, 2006; Parvin et al.). Ces erreurs aboutissent à des mutations ponctuelles des gènes viraux et par conséquent à des modifications des protéines pour lesquelles ils codent. Les glycoprotéines de surface (HA et NA) peuvent être soumises à une forte pression de sélection par les anticorps neutralisants de l'hôte, en revanche des modifications de leur séquence n'entraînent pas de modification du sous-type viral. Elles peuvent toutefois avoir des conséquences sur l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (Abed et al., 2002). Le passage d'un virus faiblement pathogène à hautement pathogène est une autre conséquence notable de ces évènements : les hémagglutinines de types H5 et H7 sont les plus sensibles à l'accumulation de mutations et induisent régulièrement une telle évolution comme pour les virus H7N1 ayant circulés en Italie en 1999 (Monne et al., 2014).

Les mutations sont dites adaptatives lorsqu'elles entraînent une amélioration dans la réplication et/ou le maintien du virus. Si l'on prend l'exemple de la polymérase, une mutation du gène PB2 de virus aviaires (Pan99 : A/Panama/2007/99 (H3N2) et VN1204 : A/Viet Nam/1203/04 (H5N1)) modifiant la séquence protéique lui permet d'interagir avec les importines α 7 et favorise la réplication virale au sein de cellules de mammifère (Steel et al., 2009).

2.1.2 La cassure antigénique

Du fait de la segmentation du génome, le réassortiment génétique est un mécanisme fondamental pour l'évolution des virus Influenza. L'échange de segments géniques entre deux virus différents infectant une même cellule peut ainsi aboutir à l'apparition de nouveaux virus dits « réassortants ». Les co-infections sont courantes chez les oiseaux sauvages et le réassortiment y est un événement fréquents comme avec les virus H5N1 par exemple (Dugan et al., 2008). Les réassortiments peuvent avoir lieu chez d'autres espèces également, notamment chez le porc. Celui-ci possède les récepteurs permettant des infections simultanées par des virus aviaires et mammifères (*cf. 2.2.2*). Les réassortiments résultant de ces co-infections peuvent donc conduire à l'apparition de nouvelles souches virales. Ces nouveaux virus possèdent alors des caractéristiques différentes telles qu'une virulence accrue, une spécificité d'hôte différente et/ou une absence de réponse immunitaire de l'hôte. Ce nouveau statut antigénique peut alors leur conférer un potentiel pandémique (Figure 8).



Figure 8: Evolution des virus Influenza A pandémiques au cours du temps

Les grandes pandémies des XX^{ème} et XXI^{ème} siècles ont été provoquées successivement par un virus aviaire (« Grippe espagnole », H1N1 en 1918), un virus réassortant humain possédant des protéines HA, NA et PB1 d'origine aviaire (H2N2 en 1957) et un autre virus réassortant humain contenant des protéines HA et PB1 aviaires (H3N2 en 1968). En 1977, une pandémie plus modeste est causée par une ré-emergence de H1N1., la dernière pandémie récente est causée en 2009 par un virus Influenza A réassortant possédant des segments PA et PB2 aviaires, PB1 humain et les autres d'origine porcine. D'après (Marcelin et al., 2011; Watanabe et al., 2012)

Les futures souches virales à haut pouvoir pandémique pourraient émerger grâce à l'accumulation de tous ces mécanismes d'évolution : adaptation à l'hôte par accumulation de mutations, réassortiments génétiques et réémergence de virus n'ayant pas infecté l'Homme au cours des

dernières générations (Watanabe et al., 2012).

2.2 Mécanismes de transmission inter-espèces

2.2.1 De l'oiseau à l'Homme

Le spectre d'hôte des virus Influenza Aviaires est particulièrement large. Outre les espèces aviaires sauvages et domestiques, on les retrouve chez de nombreux mammifères tels que l'Homme, le porc, les canidés ou encore les félins (Figure 9). La transmission des virus influenza aviaires aux mammifères se fait principalement par voie respiratoire lors de contact étroit avec des oiseaux infectés.



Figure 9: Transmission inter-espèces de virus influenza A

Diagramme représentant les transmissions inter-espèces des virus influenza A et les sous-types impliqués. Les flèches pleines représentent les transmissions directes. Les flèches en pointillés représentent une infection sporadique ou limitée des sous-types. Ainsi, des virus issus du réservoir de l'avifaune sauvage peuvent infecter des palmipèdes et des volailles domestiques. A leur tour d'autres espèces, notamment de mammifères, peuvent s'infecter au contact de volailles domestiques. Le porc semble avoir un rôle privilégié d'espèce relais qui peut générer de nouveaux virus par réassortiments entre des virus aviaires et mammifères (exemple du virus pandémique de 2009). D'après (Joseph et al., 2017).

Chez l'homme, la diffusion de VIA reste limitée, en raison de l'affinité plus marquée des VIA pour les récepteurs situés dans l'arbre respiratoire profond (cf. 2.3.1), un contact rapproché est donc nécessaire à la contamination. De plus, les virus influenza aviaires ne se répliquent pas efficacement chez l'Homme et les infections productives sont rarement établies. Toutefois, plusieurs centaines de cas humains d'infection à virus aviaires H5N1 et H7N9 ont été observés depuis 1997 et 2013, respectivement. D'autres franchissements de la barrière d'espèce directement de l'oiseau à l'homme ont été observés pour d'autres virus aviaires de sous-types H6, H7, H9 et H10 (Figure 9). Les symptômes chez l'homme infecté par ces virus vont de la conjonctivite, des symptômes d'une grippe saisonnière, jusqu'à la pneumonie sévère, un syndrome de détresse respiratoire aiguë, voire la mort. En particulier, le nombre croissant d'infections humaines mortelles avec les virus IAHP de sous-type H5N1 (454 décès sur 860 cas confirmés depuis 2003) et le virus IAFP de sous-type H7N9 (624 décès sur 1625 cas confirmés depuis 2013) constituent une préoccupation majeure pour la santé publique (http://www.who.int).

Country	2003-2009*		2010-2014**		2015		2016		2017		2018		Total	
country	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths
Azerbaijan	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5
Bangladesh	1	0	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	8	1
Cambodia	9	7	47	30	0	0	0	0	0	0	0	0	56	37
Canada	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
China	38	25	9	5	6	1	0	0	0	0	0	0	53	31
Djibouti	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Egypt	90	27	120	50	136	39	10	3	3	1	0	0	359	120
Indonesia	162	134	35	31	2	2	0	0	1	1	0	0	200	168
Iraq	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Lao People's														
Democratic Republic	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Myanmar	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Nigeria	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Pakistan	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1
Thailand	25	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	17
Turkey	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	4
Viet Nam	112	57	15	7	0	0	0	0	0	0	0	0	127	64
Total	468	282	233	125	145	42	10	3	4	2	0	0	860	454

Tableau 1: Nombre de cas confirmés de H5N1 chez l'Homme depuis 2003



*2003-2009 Nombre total : Les détails par année sont disponibles sur le site (<u>http://www.who.int</u>) **2010-2014 Nombre total : Les détails par année sont disponibles sur le site (<u>http://www.who.int</u>) Le nombre total de cas inclus le nombre de décès. Ces chiffres sont issus uniquement des cas rapportés et confirmés par les laboratoires. Les dates s'entendent à partir de l'apparition des symptômes. Document mis à jour le 15 Septembre 2018. D'après (<u>http://www.who.int</u>)

La transmission à l'homme est souvent liée à une proximité étroite avec la volaille domestique infectée, en particulier le poulet ou le canard (marchés de volailles vivantes en Asie par exemple (Wan et al., 2011)).

2.2.2 Le porc : un hôte intermédiaire clé ?

La circulation des virus influenza aviaires entre les volailles et d'autres animaux d'élevage, comme les porcs, favorisée par la mixité des élevages dans certains pays, contribue au réassortiment de différents virus Influenza A. Dans ces conditions, les virus peuvent franchir plus aisément les différentes barrières d'espèces y compris celle vers l'Homme. Par la présence des récepteurs aux VIA d'origines humaine et aviaire dans ses épithéliums respiratoires, le porc est largement reconnu comme étant un pivot de ce mécanisme (Joseph et al., 2017; Ma et al., 2009). Le virus H1N1 pandémique de 2009 d'origine porcine illustre parfaitement cela, puisqu'il résulte de plusieurs événements de réassortiment chez le porc (Figure 10), entre des virus aviaires, humains et porcins (Smith et al., 2009).



Figure 10: Reconstruction de la séquence d'évènements de réassortiments ayant conduit à l'émergence du VIA A(H1N1)pdm09.

Chaque couleur représente une espèce d'hôte : Aviaire (vert), porcin (rouge) et humain (violet). Les lignes colorées représentent les transmissions inter-espèces selon les gènes viraux (les 8 segments génomiques sont représentés par 8 lignes parallèles par ordre décroissant de taille). Les lignes pointillées verticales indiquent la date « moyenne » à laquelle ont eu lieu les divergences des gènes correspondant au lignage du virus. D'après (Smith et al., 2009)

Fort Dix (1976) est l'épidémie la plus significative de VIA d'origine porcine connue chez l'Homme.

Le premier triple-réassortant fut identifié en 1998 mais pour améliorer la clarté des lignages a été placé avant.

Les réassortiments n'ayant aucun lien avec l'émergence du virus A(H1N1)pdm09 ont été omis.

S-OIV2009 = Swine-origin Influenza A virus 2009 (A(H1N1)pdm09)

2.2.3 Le risque pandémique

Jusqu'à présent aucune transmission interhumaine intense n'a été observée, ni pour le virus H5N1, ni pour le virus H7N9. Cependant 2 cas probables de transmission de H5N1 ont été décrits en Chine et Thaïlande suggérant qu'une transmission directe interhumaine, bien que limitée soit possible (Ungchusak et al., 2005; Wang et al., 2008). Ces deux virus aviaires font donc peser la menace de nouvelles pandémies (Bui et al., 2016). La circulation des VIA chez les oiseaux sauvages, chez les volailles domestiques et l'origine aviaire des pandémies de grippe humaine du XX^{ème} siècle (dont la grippe espagnole de 1918) soulignent un risque de santé publique important. Afin de pouvoir se répliquer, un virus détourne la machinerie cellulaire et l'énergie de l'hôte qu'il infecte. Cette prise de contrôle dépend de la capacité des virus à interagir avec les protéines cellulaires lors du cycle de réplication virale (Samji, 2009). Or la machinerie cellulaire aviaire est protéines homologues entre Homme et oiseaux sont différentes. Par conséquent, les interactions entre protéines virales aviaires et protéines cellulaires diffèrent selon l'hôte étudié. Certaines interactions entre protéines cellulaires et protéines virales favorisent, voire sont indispensables à la réplication et/ou au maintien du virus au sein de l'hôte.

2.3 Mécanismes cellulaire d'adaptation des virus Influenza A

2.3.1 Récepteurs cellulaires des virus Influenza A

Le spectre cellulaire des VIA est notamment défini par la HA. Les virus Influenza A peuvent infecter efficacement des cellules exprimant des récepteurs cellulaires riches en groupements acides sialiques (SA) (Medina and García-Sastre, 2011). Les VIA aviaires ont une spécificité pour les récepteurs possédant des groupements α -2,3-SA. On retrouve ces récepteurs principalement dans les tractus respiratoire et digestif des oiseaux, organes cibles de la réplication virale chez ces hôtes. Les VIA d'origine humaine ont une spécificité pour les récepteurs possédant des groupements α -2,6-SA. Ces récepteurs sont présents le long de l'arbre respiratoire de l'Homme (Nasopharynx, trachée bronches et alvéoles pulmonaires) (Nicholls et al., 2007).Cette spécificité de récepteurs est une première barrière dans le passage des virus aviaires à l'Homme. En effet, les virus aviaires se fixent préférentiellement sur les récepteurs α -2,3-SA dans la partie basse de son arbre respiratoire rendant l'infection possible par des virus aviaires (Shinya et al., 2006).

Chez le porc, les deux types de groupements SA sont retrouvés à la surface des cellules épithéliales de la trachée, expliquant leur susceptibilité élevée aux virus tant aviaires qu'humains.

C'est ainsi que de nouvelles souches de VIA infectant l'Homme ont pu émerger telles que les souches de H5N1 et H7N9, déjà citées (*cf. 2.2.1*). Cependant ces virus ne sont pas adaptés à l'Homme puisque les cas de transmission interhumaine sont rares voire inexistants. En revanche, l'étude des virus pandémiques du XXème siècle (H1N1 de 1918, H2N2 de 1957 et H3N2 de 1968 (Figure 8)) permet de mieux comprendre l'implication de l'Hémagglutinine dans l'adaptation des virus aviaires à l'Homme leur conférant un pouvoir pandémique (Horimoto and Kawaoka, 2005). Les acides aminés déterminant la spécificité aux groupements α -2,6-SA ou α -2,3-SA diffèrent selon le sous-type de la HA. Ainsi, la HA H3 (A/Aichi/2/1968 (H3N2)) possède une Leucine en position 226 (HA humaine) en lieu et place d'une Glutamine (HA aviaire) ce qui la rend spécifique des groupements α -2,6-SA (Connor et al., 1994). La HA H1 (A/H1N1pdm) possède quant à elle un acide aspartique en position 190 (HA Humaine et porcine) à la place d'un acide glutamique (HA aviaire) lui conférant une spécificité pour les récepteurs de mammifères (Matrosovich et al., 2000).

Les sous-types H5 et H7 quant à eux, ont une très faible affinité pour les groupements SA humains. Cependant, il a été montré par génétique inverse, *in vitro*, qu'une mutation de la HA (Glutamine remplacée par une Arginine en position 190) permet d'obtenir une affinité de celle-ci pour les groupements α -2,6-SA humains. Le modèle d'infection expérimentale de furets par ce virus mutant montre qu'une transmission par contact direct (Fèces) est possible, contrairement au virus H5N1 sauvage, mais pas par voie aéroportée. En revanche, un virus réassortant possédant une Neuraminidase N2 et les autres gènes du virus mutant précédemment décrit, peut être partiellement transmis par voie aéroportée entre furets (Chen et al., 2012). D'autres mutations de la HA, conférant au virus H5N1 la capacité d'une transmission aéroportée ont également été identifiées. Un virus réassortant dérivé du virus pandémique H1N1 de 2009 possédant une HA H5 est capable de se transmettre par voie aéroportée entre furets avec seulement quatre mutations (Imai et al., 2012).

Ces modifications montrent des changements modestes du mécanisme de transmission mais soulignent l'implication des glycoprotéines de surface HA et NA dans les mécanismes d'adaptation. Néanmoins une voire même deux modifications des protéines de surface du virus ne sont pas suffisantes pour rendre sa transmission interhumaine possible. L'émergence d'une nouvelle souche de H5N1 pandémique nécessiterait donc plusieurs autres modifications à l'échelle moléculaire (Herfst et al., 2012).

2.3.2 Le complexe polymérase

Les glycoprotéines de surfaces ne sont pas les seuls facteurs viraux responsables de l'adaptation de virus aviaires à l'Homme. Au cours du cycle viral, le virus interagit avec un grand nombre de protéines cellulaires indispensables à sa réplication. Le complexe polymérase, comprenant PB1 (Polymerase Basic 1), PB2 (Polymerase Basic 2) et PA (Polymerase Acid) est considéré comme un facteur essentiel dans la virulence ainsi que la transmission inter-espèce des VIA (Li et al., 2009). Par exemple, parmi les segments codant pour les protéines internes des VIA (PB1, PB2, PA, NP, M et NS), le segment codant pour PB1 est le seul d'origine aviaire chez les virus réassortants pandémiques H2N2 (1957) et H3N2 (1968) (Horimoto and Kawaoka, 2005). En parallèle, une mutation de la protéine PB2 a été identifiée comme étant suffisante et nécessaire à la réplication de VIA aviaires chez un hôte mammifère. Cette mutation est l'apparition d'une lysine en position 627 (région C-terminale) à la place d'un glutamate (E627K) (Subbarao et al., 1993). Cette mutation confère à la polymérase une activité accrue à des températures plus faibles (33-35°C), températures du tractus respiratoire supérieur humain par opposition aux températures du système digestif aviaire (38-40°C). Elle apporte également un avantage lors de la formation des RNP virales : l'appariement des protéines et de l'ARN viral d'origine aviaires est défectueux en cellules humaines. En revanche la présence de la mutation permet une formation correcte des RNP en cellules humaines. De plus, PB2 est impliquée dans le transport du matériel génétique viral vers le noyau en interagissant avec les importines cellulaires. La PB2 aviaire interagit avec les importines α -3 tandis que la PB2 d'origine humaine interagit avec les importines α -7. La mutation E627K permet à une PB2 d'origine aviaire d'interagir avec les importines α -7 chez la souris entrainant une réplication et une virulence accrues (Mänz et al., 2013).

Enfin, des études ont montré que certaines sous-unités de polymérases virales d'origine humaine ne sont pas entièrement compatibles avec d'autres provenant de souches aviaires. Cependant si l'on combine par génétique inverse une PB1 d'origine aviaire et une PB2 d'origine humaine, le virus qui en résulte aura une très forte activité polymérase (Figure 11). Une activité polymérase robuste est un facteur crucial pour la création de mutations adaptatives (glissement antigénique, *cf. 2.1.1*) surtout dans des conditions de pression sélective telles que l'infection d'un hôte « accidentel » (Li et al., 2009).

Néanmoins, la transmission inter-espèce ainsi que l'adaptation des VIA sont multifactorielles. Elles ne dépendent pas uniquement de la séquence protéique des protéines virales mais également de la composition des protéines cellulaires de l'hôte qu'ils infectent.



Figure 11: Effets de la combinaison PB1/PB2 d'origines différentes et selon la température A : Aviaire (VIA H5N1 A/Indonesia/05/2005) M : Mammifère (VIA H1N1 humain A/WSN/1933). Mesure de l'activité polymérase des RNP virales recombinantes (obtenues par génétique inverse) en cellules humaine (HEK293T) par un système de *"Luciferase reporter assay"*. D'après (Li et al., 2009)

2.3.3 Les protéines non structurales

Le segment 8 du génome des VIA code pour deux protéines non structurales NEP (Nuclear Export Protein ou NS2) et NS1 (Non structural protein) non-essentielles. Non présentes dans le virion, elles sont exprimées durant la réplication du virus dans la cellule. Le rôle majeur de la protéine NS1 est d'inhiber la réponse immunitaire innée de l'hôte. Elle bloque en particulier la réponse interféron (IFN de types I et II) ainsi que la réponse antivirale des protéines activées par l'IFN (Hale et al., 2008). La protéine NS1 interagit avec de nombreuses protéines cellulaires et par conséquent a de multiples fonctions au cours du cycle viral qui seront détaillées en partie 3 de l'introduction. En ce qui concerne NEP, des travaux récents suggèrent qu'elle joue un rôle important dans l'adaptation des VIA notamment H5N1. En effet, des mutations isolées retrouvées dans la séquence de NEP de VIA H5N1 isolés chez l'Homme semblent suffisantes pour stimuler la synthèse de l'ARN viral par une polymérase d'origine aviaire et ce en cellules humaines. Ce mécanisme a été observé en particulier dans les virus ne possédant pas la mutation E627K de PB2 précédemment décrite (PB2 aviaire) (Joseph et al., 2017; Mänz et al., 2013).

3 La protéine NS1 : un acteur de l'adaptabilité des VIA

3.1 NS1 : synthèse et biochimie

Sans être un composant structural du virion, la protéine NS1 est une protéine fortement exprimée dans les cellules infectées. Codée par le segment 8 du génome, elle est issue de la traduction d'un ARNm lui-même issu de l'ARN viral. Le même ARNv peut également être traduit en NEP suite à un évènement d'épissage. NS1 est une protéine de 230 à 237 acides aminés (aa) selon la souche de VIA, soit 26kDa. La partie N-Terminale de 73aa est un domaine de liaison à l'ARN (RBD pour *RNA Binding Domain*). Le reste de la protéine constitue le domaine effecteur (ED pour *Effector Domain*), responsable de l'interaction avec de nombreuses protéines (virales et cellulaires). On retrouve deux séquences de localisation nucléaire (NLS1 et NLS2 pour *Nuclear Localization sequence*) ainsi qu'une séquence d'export nucléaire (NES pour *Nuclear export sequence*). La séquence C-terminale de la protéine possède un site de 4 acides aminés de liaison aux protéines possédant un motif PDZ (PBM pour *PDZ binding Motif*) (Figure 12).



Figure 12: Structure monomérique de NS1

A) 10 à 15% des ARNm de NS1 sont épissé en NEP (121 AA). B) Structure de la protéine. D'après (Hale et al., 2008; Marc, 2012a).

Bien que de petite taille, NS1 possède une structure tridimensionnelle relativement complexe qui a été révélée en deux temps par cristallographie et résonnance magnétique nucléaire (Figure 13). Tout d'abord, le RBD est composé de six hélices (deux monomères de trois hélices chacun α 1, α 2, α 3 et α 1', α 2', α 3'). Les deux hélices antiparallèles α 2 et α 2' se lient au sillon majeur de l'ARN double-brin grâce à plusieurs acides aminés basiques. Le domaine effecteur ED a été révélé plus tardivement (Bornholdt and Prasad, 2006). Il comporte un large feuillet β (composé de 7 brins β en orientation antiparallèle) et trois hélices α (α 4, α 5, α 6). L'ED est relié au RBD par le brin β 1 du feuillet β lequel enveloppe la longue hélice α 5 (Marc, 2012).



Figure 13: Structure tridimensionnelle de la NS1

A) RBD (Domaine de liaison à l'ARN). Les deux hélices antiparallèles $\alpha 2$ et $\alpha 2^{-}$ (en vert) entourent l'ARN en rose. Schéma établi d'après la structure cristallographique de numéro d'accès PDB 2ZKO. **B)** ED (Domaine effecteur). Dans cette représentation très schématisée, le feuillet β qui enveloppe la longue hélice $\alpha 5$ a été «déroulé», afin de rendre plus visibles la connectivité et la topologie des éléments de structure. Le domaine ED est connecté au RBD par la région non structurée des aa 73 à 88 (flèche) Schéma établi d'après la structure cristallographique de numéro d'accès PDB 2GX9. D'après (Marc, 2012).

Quel que soit le virus, l'architecture est toujours la même et une comparaison attentive de toutes ces structures fait apparaître à leur surface des motifs d'acides aminés extrêmement conservés, en dépit de la variabilité des séquences peptidiques entre les différentes NS1 (Darapaneni et al., 2009). Ces résidus conservés sont d'excellents candidats pour les interactions protéines-protéines ainsi que des cibles intéressantes pour de nouvelles formulations anti-virales.

3.2 NS1 : une protéine multifonctionnelle

La plupart des virus produisent des protéines qui s'opposent aux mécanismes antiviraux de plusieurs façons. Chez les VIA c'est la protéine NS1 qui assure cette fonction. Cependant par ses interactions nombreuses avec les protéines cellulaires et virales, NS1 exerce plusieurs activités concourant à favoriser la réplication virale. Elle agit ainsi sur la réponse antivirale de type interféron, sur la régulation des ARNm cellulaires ainsi que sur celle des ARN viraux (Figure 14). Chez l'Homme, ces fonctions sont très étudiées et décrites.

3.2.1 NS1 et la réponse antivirale

Dans la cellule infectée, NS1 bloque ou réduit la réponse antivirale du système interféron, soit en empêchant l'activation de protéines inductrices du système, soit en bloquant l'action de protéines effectrices. Ainsi, elle empêche directement l'activation de RIG-I (*retinoic acidinducible gene I*), laquelle déclenche normalement la réponse antivirale après avoir été activée par certains motifs d'ARN double-brin (Pichlmair et al., 2006; Schmidt et al., 2009). NS1 empêche aussi l'action de TRIM25 (*Tripartite Motif-containing protein 25*), qui est nécessaire à l'activation de RIG-I. Par ces deux inhibitions, NS1 bloque donc toute une voie d'activation de la réponse antivirale.

NS1 agit également en aval de la voie interféron : elle empêche l'activation de la PKR (*Protein Kinase RNA-activated* ou *double-stranded RNA-activated protein kinase*), une autre protéine signalisatrice activée par la présence d'ARN double brin spécifique d'une infection virale et induite par les interférons. De plus, en séquestrant les ARN double-brin au niveau de son RBD, elle empêche l'activation des enzymes 2'-5'OAS (2'5'-ppp-OligoA) responsables de l'activation de la RNase L, l'endonucléase cellulaire censée cliver les ARN viraux. Ces multiples blocages des voies d'induction conduisent à la déstabilisation de la voie du système IFN-I notamment en bloquant les facteurs d'activation de la transcription des gènes du système interféron. Outre son effet sur l'interféron, NS1 active la PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) en se liant à sa

sous-unité p85- β , laquelle régule l'activité de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K. Cette activation a des effets notamment sur l'inhibition de l'apoptose (Hale et al., 2008).

3.2.2 Impact de NS1 sur les mécanismes de transcription et traduction

Grâce au mécanisme de *cap-snatching* les ARNm viraux présentent une coiffe à leur extrémité 5' identique à celle des ARNm cellulaires. Cependant, les ARNm viraux sont préférentiellement traduits. En effet, NS1 est responsable du recrutement des protéines cellulaires PABPI (*polyadenylate binding protein I*) et eIF4GI (*Eukaryotic translation initiation factor 4 G*) favorisant la traduction et la traduction des ARNm (Hale et al., 2008; Marc, 2012a). Mais NS1 a des effets encore plus contrastés sur la maturation des ARNm. D'une part, elle inhibe l'épissage et le transport nucléocytoplasmique des ARNm cellulaires, empêchant ainsi la synthèse protéique cellulaire (Satterly et al., 2007). D'autre part elle est capable d'inhiber la polyadénylation des ARNm cellulaires en interagissant avec la protéine CPSF30 (*Cleavage and polyadenylation specificity factor 30*) (Hale et al., 2008).

De plus, NS1 interagit aussi avec le complexe polymérase du virus (Marion et al., 1997) ou avec certaines de ses sous-unités, comme NP (Robb et al., 2011), notamment au sein de complexes contenant à la fois NS1, CPSF30, PB1, PB2, NP et PA. Le rôle de ces complexes semble être de stabiliser l'interaction de NS1 avec CPSF30 (Kuo and Krug, 2009).

Enfin, NS1 inhibe également l'export nucléaire et l'épissage des ARNm cellulaires en interagissant avec des protéines du spliceosome telles que les snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) empêchant ainsi leur fixation sur les ARNm (Qiu et al., 1995).



Figure 14: Schéma des différents niveaux d'implication de NS1 au cours du cycle de réplication en cellules humaines

La protéine NS1 assure de nombreuses fonctions au cours du cycle viral :

A) NS1 limite l'induction de la réponse IFN-I, et donc la mise en place de mécanismes antiviraux.

B) NS1 agit également sur d'autres mécanismes antiviraux et inhibe leur fonction (inhibition des mécanismes de clivage des ARN viraux par exemple).

C) NS1 interfère avec la maturation des ARNm cellulaires.

D) NS1 interagit avec des protéines cellulaires impliquées dans le mécanisme de traduction afin de favoriser la production de ses propres ARNm (viraux)

E) NS1 assure également la survie de la cellule infectée en inhibant l'apoptose (activation de la voie PI3K/Akt). D'après (Hale et al., 2008).

3.3 NS1 : un facteur de virulence et d'adaptation des VIA

3.3.1 Variabilité de NS1 d'une espèce à l'autre

Avec HA et NA, NS1 est le gène qui contribue le plus à la variabilité génétique des VIA (Obenauer, 2006). Parmi les milliers de séguences de NS1 disponibles dans Genbank (plus de 50 000 à ce jour), il existe de grandes variabilités dans la séquence peptidique et la longueur de la protéine. NS1 contient en général 230 acides aminés avec un codon stop en position 231. Des mutations supprimant le codon stop, ou créant un codon stop prématuré, entrainent des variations de longueur de NS1. Ainsi, depuis la fin des années 1940 et jusqu'au milieu des années 1980, la NS1 qui s'est transmise des virus humains saisonniers H1N1 aux H2N2 puis aux H3N2 portait généralement l'extension C-terminale de sept acides aminés 231RRNKMAD237. Inversement, la NS1 du virus pandémique H1N1 de 2009, comme celle de la majorité des virus porcins, se termine à l'acide aminé 219. Outre les troncations, de courtes délétions internes sont aussi observées : depuis 2001 environ, la NS1 des virus IAHP H5N1 est amputée des acides aminés 80 à 84, ce qui raccourcit la région non structurée liant le RBD au domaine effecteur. La séquence peptidique de NS1 montre aussi de nombreux polymorphismes, malgré la contrainte d'une double phase de lecture (NEP et NS1). L'origine de cette variabilité reste floue mais il semble que la NS1 soit plus ou moins spécifique de l'hôte infecté (Marc, 2012).

Historiquement, deux allèles distincts de NS1 ont été définis sur la base de similitudes de la séquence génétique et nommés allèle A et allèle B (Munir et al., 2011; Treanor et al., 1989). Il a ensuite été défini que l'allèle A appartenait à des virus d'origines aviaire et mammifère et que l'allèle B appartenait exclusivement aux virus aviaires. Cependant, il a été montré que l'introduction de chacun de ces allèles dans des virus d'origine humaine conduisait invariablement au maintien des propriétés du virus (réplication, pathogénicité chez l'hôte mammifère). Cela laisse penser que les NS1 d'allèle B pourraient être fonctionnelles chez l'homme et qu'un virus présentant l'allèle B de NS1 pourrait avoir un potentiel pandémique (Turnbull et al., 2016).

3.3.2 Exemple de l'adaptabilité de NS1 : le domaine PBM

En N-terminal NS1 possède 4 acides aminés formant un domaine spécifique des motifs PDZ de certaines protéines. Ces protéines sont le plus souvent des protéines intermédiaires capables de former des complexes protéiques plus importants. Ce motif PDZ (80-90aa) leur permet de se lier spécifiquement à la protéine cible. Elles assurent également de nombreuses fonctions dans plusieurs voies de signalisation (Nourry et al., 2003). En ce qui concerne NS1, des études de séquençage à haut débit de différentes souches de VIA ont permis de montrer que son domaine PBM était spécifique de l'espèce infectée. En effet, 78% des isolats aviaires comportent un motif ESEV (Acide Glutamique / Serine / Acide Glutamique / Valine) tandis que 85% des virus d'origine humaine ont un motif RSKV (Arginine / Serine / Lysine / Valine) (Obenauer, 2006) (Figure 15).

PL	Avian	Human	Swine	Equine	-3
	5	2	4		
EPEV	23	21	1	14	
EPKV				1	
ESEI	48		4		
ESEV	483	12	7	10	
ESKV	55				E/G
GPEV	2	1	19	2	
GPKV			6		
GSEA	1				
GSEI			1		
GSEV	4		4		
GSKV	1	2			
KSEV		1			
RPKV		1			
RSEA			1		R/k
RSEV		22	4		IVI
RSKI		9			
RSKV		403	21		
TSEV			1		
Totals	622	474	73	27	

Figure 15: Distribution des motifs PBM dans 1196 protéines NS1 de VIA

Les séquences des motifs PBM sont listées dans la colonne PL (pour *PDZ-domain Ligand*). Les nombres en gras montrent les motifs les plus représentés en l'occurrence ESEV pour les VIA aviaires et RSKV pour les VIA humains. D'après (Obenauer, 2006).

L'influence de cette variabilité du domaine PBM a été démontrée en réalisant la substitution d'une NS1 possédant un motif RSKV dans un virus aviaire (A/turkey/Italy/977/1999 (H7N1)) par génétique inverse. La comparaison de ce virus avec son homologue possédant la NS1 aviaire (motif ESEV) a confirmé que le motif RSKV entraine bien une meilleure réplication du virus en cellules humaines. En revanche, *in vivo*, le virus ESEV entraîne une virulence accrue du virus chez les souris infectées. Cette virulence a été reliée à une pathogénicité plus forte chez les souris due à une inflammation particulièrement élevée dans les poumons associée

alors à une forte réponse Interféron de type I. De même, le domaine RSKV confère une réplication accrue du virus ainsi qu'une réponse interféron de type I (via la protéine Mx) plus élevée chez les canards. Le domaine C-terminal de la protéine NS1 est donc bien un caractère de virulence spécifique de l'espèce infectée (Soubies et al., 2010a).

L'implication de NS1 dans la virulence du virus chez l'hôte (aviaire ou mammifère) a également été décrite pour le virus IAHP H5N1 (Zielecki et al., 2010). Néanmoins, le rôle de ce domaine ne s'arrête pas là puisque il a également été montré que la NS1 aviaire (ESEV) interagit avec plusieurs protéines à domaine PDZ (Scribble, MAGI-1, MAGI-2 et MAGI-3). L'interaction avec Scribble est particulièrement intéressante puisque celle-ci est une protéine pro-apoptotique localisée à la membrane plasmique.

En effet, dans les cellules infectées, NS1 possédant un PBM ESEV a pour effet de relocaliser la protéine Scribble dans l'espace périnucléaire et possède bien un effet anti-apoptotique (Liu et al., 2010).

3.3.3 Etude de l'interactome de NS1

NS1 est probablement la protéine virale la plus impliquée dans les interactions du virus avec la cellule hôte. L'interactome de NS1 en cellules humaines et de mammifères est très étudié. Ces études permettent notamment de mieux comprendre l'implication de NS1 dans les mécanismes de réponse Interféron de type I, la maturation des ARN messagers viraux et cellulaires (Tableau 2).

Ces dernières années, la connaissance de l'interactome de NS1 en cellules humaines s'est encore enrichie. Grâce à la généralisation des méthodes d'études des interactions comme le criblage par système de double-hybride en levure ou bactérie, la spectrométrie de masse ou encore les technologies de SPR (Résonnance Plasmonique de surface) de nombreuses données sont disponibles et les interactions sont caractérisées. Ainsi, des analyses en spectrométrie de masse ont montré que NS1 (A/Puerto Rico/1934 (H1N1)) interagit avec la protéine PACT (*protein activator of the interferon-induced protein kinase*) un partenaire essentiel de RIG-I. NS1 se lie à PACT durant la réplication, empêchant son interaction avec RIG-I et bloquant la réponse interféron (Tawaratsumida et al., 2014). L'interaction de la NS1 (A/Puerto Rico/1934 (H1N1)) avec la protéine PRP19 (*Pre-mRNA processing factor 19*) a été identifiée récemment comme étant un régulateur positif de la réplication virale. La protéine PRP19 est un facteur d'épissage des ARN messagers cellulaires. La déplétion de PRP19 conduit ainsi à une baisse significative de la réplication du virus (Kuo et al., 2016).

	Protéine	Site d'interaction dans NS1	Méthode d'identification	Dépendance ARN
	CPSF30	ED	Y2H (Co-IP)	ND
	PABII	ED	Y2H (GST-PD)	Non
	NXF1, Rae1 (+Nup98)	ED+RBD	GST-PD	Non
Protéines	p15	ED	GST-PD	Non
nucléaires/métabolisme	E1B-AP5	ED+RBD	GST-PD	Oui
des ARN	NS1-BP (protéine nucléaire)	NS1	Y2H (GST-PD)	ND
	nucleolin	RBD	phage displ.	ND
	hnRNP-F	RBD	Y2H (Co-IP)	Non
	RNA Helicase A (DHX9)	NS1	StrepTag-NS1	Oui
	elF4GI	région 1-113 de NS1	GST-PD (Co-IP)	Non
-	hStaufen	NS1	Y2H (GST-PD)	Non
Proteines cytoplas-	PABPI	RBD	Co-IP	Non
iniques/hbosomes	NS1-I	NS1	Y2H (GST–PD)	ND
	Importine α	RBD	GST-PD	ND
	Sous-unité p85-β de PI3K	ED	GST-PD, Co-IP	Non
	RIG-I	NS1	Co-IP, Coloc	Oui
	TRIM25	NS1	Co-IP	
	PKR	ED (123-127)	GST-PD	
Système interféron et	PACT	NS1	GST-PD	
voies de signalisation	Dsh, PSD-95	C-term (PBM)		ND
	Scribble, Dlg1, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3	C-term (PBM)	GST-PD	ND
	Ubc9	NS1	Y2H, GST-PD	ND
	Herc5	RBD	GST-PD, Co-IP	Non
	NP	RBD	Co-IP	Non
Proteines virales	NP et PA	NS1	Co-IP	ND

Tableau 2: Les protéines interagissant avec NS1 en cellules humaines

RBD : *RNA-binding domain* ; ED : *effector domain* ; PBM : *PDZ-binding motif* ; Y2H : double hybride en levure ; GST-PD : *GST-PullDown* ; Co-IP : co-immunoprécipitation; Coloc : colocalisation ; phage displ. : *Phage display* ; PI3K : *phosphatidylinositol 3-kinase*. Lorsque deux méthodes sont indiquées, la première est celle utilisée pour l'identification, la seconde est celle utilisée pour la confirmation. D'après (Aragon et al., 2000; Burgui et al., 2003; Chen et al., 1999; Falcon et al., 1999; Hale et al., 2006, 2009; Lin et al., 2012; Murayama et al., 2007; Nemeroff et al., 1998; Satterly et al., 2007) dans (Marc, 2012).

Plus récemment, l'analyse de l'interactome du VIA A/Taiwan/1/2013 (H7N9) a permis de préciser le rôle de NS1 dans la maturation des ARNm de l'hôte (en cellules humaines). NS1 interagit en effet avec les protéines CPSF2 et CPSF7 (*cleavage and polyadenylation specific factor subunit 2 / 7*). La surexpression de NS1 comme l'infection par le virus complet induisent un effet similaire sur la maturation des ARNm notamment leur polyadénylation. Les données de spectrométrie de masse associées à cette étude permettent même aux auteurs de dessiner une cartographie des nombreux partenaires cellulaires et des interactions de NS1 pour démontrer son implication dans les processus de maturation des ARNm (Figure 16) (Kuo et al., 2018).



Figure 16: Réseau des interactions de la NS1 du VIA H7N9 (A/Taiwan/1/2013) en cellules humaines

Résultats issus d'une analyse par co-immunoprécipitation par un anticorps anti-NS1 des protéines interagissant avec NS1, puis analysés par spectrométrie de masse. Les données de spectrométrie de masse ont permis d'établir une liste de 36 protéines potentiellement partenaires de NS1. Ce réseau est une prédiction réalisée à partir de la base de données STRING v10 database (<u>http://string-db.org/</u>). D'après (Kuo et al., 2018).

Toutes ces données appuient l'implication importante de NS1 dans les processus cellulaires, favorisant la réplication et la virulence des VIA.

4 Présentation du projet

L'étude des interactions de NS1 présentée dans ce projet se place sous un angle différent : celui de l'implication de NS1 dans l'adaptation à l'espèce infectée notamment dans la réplication et la virulence des VIA. La mise en évidence des mécanismes de franchissement de la barrière d'espèce entre hôte aviaire et humain est également un objectif à long terme de ce projet avec la mise en évidence de similarités et de différences dans l'interaction entre cellules mammifères ou aviaires et VIA.

L'identification de marqueurs moléculaires de franchissement de la barrière de l'espèce chez des souches d'influenza aviaire pourrait alors permettre d'orienter la veille sanitaire sur des souches plus « à risque pandémique », et peut être de gagner un temps précieux en cas d'émergence d'une nouvelle pandémie.

Deux axes se dégagent autour de cette étude dont l'objectif est d'identifier et caractériser les interactions entre NS1 et protéines cellulaires aviaires pouvant intervenir dans l'adaptation des virus Influenza A:

Axe1 : Identification de protéines cellulaires aviaires interagissant avec la protéine NS1 du virus influenza A

L'objectif de ce premier axe est de réaliser l'interactome de NS1 en cellules aviaires par spectrométrie de masse.

Axe 2 : Caractérisation des interactions de NS1 en cellules aviaires

L'objectif de cet axe est de confirmer l'interaction de certains des partenaires identifiés avec NS1 par des approches de biochimie ainsi que l'impact de ces interactions sur la réplication du virus.

MATERIEL ET METHODES

1 Matériel

1.1 Cellules

Afin d'établir et d'étudier l'interactome de NS1 en cellules aviaires, nous avons choisi de travailler avec la lignée cellulaire CDF1 (*Chicken Derived Fibroblasts*, UMNSAH/DF1, ATCC[®] CRL12203[™]). Ces cellules adhérentes sont des fibroblastes issus d'embryons de poulet (*Gallus gallus*) et immortalisés spontanément. Elles ont été cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), à 37°C et 5% de CO₂. Les titrages de suspension virale sont effectués avec des MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cellules de rein de chien sensibles aux VIA. Elles sont également entretenues en milieu DMEM + 10% de SVF à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules d'origines humaine HEK293T (Human Embryonnic Kidney, cellules issues de rein embryonnaire humain) et murine NIH/3T3 (Fibroblastes embryonnaires de souris) ont été utilisées ponctuellement comme contrôles.

1.2 Virus

Le virus Influenza A faiblement pathogène A/turkey/Italy/977/1999 (H7N1) nous a été gracieusement fourni par le Professeur Ilaria Capua de *l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro* en Italie. Il a été amplifié par passages successifs sur œuf embryonnés de poule (White Leghorn Standard PA12), fournis par la Plateforme d'Infectiologie Expérimentale de l'INRA de Tours (PFIE). Le liquide allantoïque est récolté après 48h d'infection et titré en plages de lyse. Le quatrième passage utilisé dans cette étude (E4) possède un titre de 3,0.10⁷ PFU/ ml. Le virus ainsi produit est aliquoté et conservé à -80°C.

1.3 Anticorps

La liste des anticorps utilisés est présentée dans le Tableau 3.

Tableau 3: Liste des anticorps utilisés

Anticorps	Description	Espèce de production	Espèce cible	Provenance	Application	Tampon de dilution	Facteur de dilution
Anti-NS1 clone IA7	- Anticorps monoclonal (Immunoglobuline de classe IgG2ак) - Purifié à partir de surnageant d'hybridome murin par chromatographie d'affinité sur protéine G	Souris	x	BEI Ressources #NR-44426	IP	Tampon de lyse	6 à 9µg /ml de lysat
Anti-NS1 "Tours"	Sérum polyclonal	Lapin	x	Dr Daniel MARC (INRA. Tours, France)	WB	TBS-T, 5% lait	1/10000
			^		IF, PLA	PBS-T 2,5% SVF	1/400
Anti-FLAG	- Anticorps polyclonal (IgG) dirigé contre le tag "DDDDK"	Lapin	x	Abcam #ab1162	WB	TBS-T, 3% lait	1/5000
	- Purifié par chromatographie immunogène				IF	PBS-T 2,5% SVF	1/400
Anti-FLAG	- Anticorps monoclonal (Immunogobuline de type IgG1) dirigé contre le tag "DDDDK" - Purifié par chromatographie d'affinité	Souris	x	Sigma Aldrich #F1804	IF,PLA	PBS-T 2,5% SVF	1/400
Anti-CTCF	- Anticorps polyclonal (IgG) dirigé contre le peptide interne de CTCF: CKKSKLRYTEEGKD - Purifié par chromatographie immunogène	Chèvre	Humain, poulet	Abcam #ab223224	WB	TBS-T, 3% lait	1/5000
Secondaire anti-souris HRP	- Anticorps monoclonal dirigé contre les IgG de souris et couplée à la péroxidase - purifié par chromatographie échangeuse d'ions	Lapin	Souris	Sigma Aldrich #A9044	WB	TBS-T, 3% lait	1/2000
Secondaire anti-lapin HRP	- Anticorps monoclonal dirigé contre les IgG de lapin et couplé à la péroxidase - purifié par chromatographie échangeuse d'ions	Chèvre	Lapin	Sigma Aldrich #A0545	WB	TBS-T, 3% lait	1/2000
Secondaire anti-souris A568	- Anticorps polyclonal dirigé contre les IgG (H + L) de souris et couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 568 (rouge)	Chèvre	Souris	Thermofisher scientific (Invitrogen) #A-11031	IF	PBS-T 2,5% SVF	1/2000
Secondaire anti-lapin A488	- Anticorps polyclonal dirigé contre les IgG (H + L) de lapin et couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 488 (vert)	Âne	Lapin	Jackson Immunoresearch #711-545-152	IF	PBS-T 2,5% SVF	1/800

PBS-T : PBS (*Phosphate Buffered Saline*) + 0,05% triton X100. TBS-T : TBS (*Tris Buffered saline*) + 0,05% Tween 20

1.4 Plasmides

Quatre vecteurs ont été utilisés pour la génération des lignées cellulaires de protéines d'intérêt fusionnées à un FLAG-Tag. La carte du vecteur d'expression est présentée en Figure 17. Ces vecteurs ont été produits par la société Genscript[®] Biotech Corporation (New Jersey, Etats-Unis) (Tableau 4). Un cinquième plasmide a été utilisé permettant l'expression de la protéine TRAF6 (TNF receptor associated factor) également fusionnée à un FLAG-Tag (Cao et al., 1996).



pcDNA3.1⁺/C-(K)-DYK Vector Map

Figure 17: Carte du vecteur pcDNA3.1 (FLAG-Tag) DYK Tag = FLAG-Tag

Tableau 4: Vecteurs Genscript

Nom du gène et de la protéine (insert)	Numéro d'accession GenBank (ARNm)	Référence du clone Genscript
SNRPA1 (Gallus gallus <i>small nuclear ribonucleoprotein</i> polypeptide A')	NM_001005823	OGa25453D
EIF2S3 (Gallus gallus eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma)	NM_001006260	OGa26716D
PRPF19 (Gallus gallus pre-mRNA processing factor 19)	NM_001039331	OGa28662D
CTCF (Gallus gallus CCCTC-binding factor, zinc finger protein)	NM_205332	OGa28417D

2 Méthodes

2.1 Spectrométrie de masse

2.1.1 Co-immunoprécipitation préparative

• Conditions d'infection

Pour chaque condition, infectées (INF) ou non (NI), 10 boites de culture cellulaire de 10 cm de diamètre sont ensemencées avec 3,5.10⁶ cellules CDF1, 24h avant infection. Les cellules (INF) sont infectées avec le virus Influenza 977 E4 avec une MOI (*Multiplicity of Infection*) de 3 (soit 3 particules virales infectieuses (PFU) par cellule). Le virus est dilué dans du milieu DMEM + 0,2% de BSA (Bovine serum albumin). Les cellules NI reçoivent le même volume de milieu d'infection seul. Les cellules sont incubées 1h30, avant ajout de milieu DMEM + 2% BSA et incubation de 6h30 supplémentaires.

• Conditions de lyse

Le tampon de lyse utilisé (Cyto+) est un tampon permettant l'extraction des protéines cytoplasmiques et une très faible partie des protéines nucléaires. Ce tampon est constitué de Tris HCl pH 7,4 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM et NP-40 0,5%. Afin de préserver l'intégrité des protéines, il est complémenté par des antiprotéases extemporanément (cOmpleteTM, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail - Roche). Cette étape de lyse est entièrement réalisée sur glace. Les cellules sont lavées deux fois en PBS puis grattées dans 1ml/boite de tampon de lyse. Les lysats sont mélangés par condition et incubés 15 minutes sur glace. Ils sont ensuite centrifugés 10 minutes à 14 000rpm 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires soit 10ml de surnageant / condition (un échantillon de lysat total (TOT) est conservé pour analyse en gel SDS-PAGE, *cf.2.4.1*).

• Conditions de co-Immunoprécipitation

Les billes A/G sont préalablement lavées dans du tampon de lyse (3 lavages, le surnageant est ôté après chaque centrifugation à 2500rpm 4°C) à raison de 12µl de billes par ml de lysat et ce pour chaque condition (NI / INF). La co-IP est ensuite réalisée en 3 étapes :

- Préclear : afin d'éliminer des protéines non spécifiques, les lysats sont mis en contact avec

l'équivalent de 4µl de billes lavées par ml de lysat pendant 1h à température ambiante (TA) avec agitation orbitale. Ils sont ensuite centrifugés 2min à 2500rpm 4°C et seuls les surnageants sont conservés.

- Ces lysats (surnageants) sont alors mis en contact avec 9µg d'anticorps / ml de lysat et incubés sur la nuit à 4°C avec agitation orbitale.

- Enfin l'IP est réalisée par ajout des billes lavées restantes aux lysats durant 2h à 4°C avec agitation orbitale. Les billes sont récupérées après centrifugation à 5 000rpm 3min 4°C et le surnageant d'IP éliminé (un échantillon de surnageant est prélevé (SN) pour analyse en gel SDS-PAGE).

• Conditions de lavages

Les billes sont lavées cinq fois dans 1ml de tampon cyto -, c'est-à-dire sans détergent (NP-40) afin de préserver les interactions durant 5 min à 4°C avec agitation orbitale. Les billes sont centrifugées 3 min à 5 000rpm entre chaque lavage et le surnageant éliminé.

• Elution

L'élution des complexes protéiques est réalisée dans 60µl de Tampon de Laemmli 2X (Tris HCl pH6.4 120mM, Glycérol 10%, 3.2% SDS, 0,01% Bleu de Bromophénol, DTT 100mM) et incubés à 95°C durant 5min.

10µl de surnageant d'IP sont ensuite déposés en gel SDS-PAGE (*cf. 2.4.1*) avec un marqueur de poids moléculaire (Mw pour *Molecular Weight* : Marqueur protéique ProSieve[™] QuadColor[™] - Lonza (Figure 18))(. Après migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie et révélée par caméra (ChemiDoc[™] *MP* -BIO-RAD) afin de vérifier la présence des protéines virales dans les échantillons TOT / INF ainsi que l'efficacité des lavages et la précipitation de NS1. Le reste des échantillons est alors déposés en gel préparatif ou conservé à -20°C.

• Gel préparatif

Le protocole de ce gel est fourni par la plateforme de protéomique de l'IPBS (Institut de pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS, Toulouse) :

- Dépôt de la totalité du surnageant de co-IP en gel SDS-PAGE (gel de concentration 0,125M tris, pH 6,8 4% et gel de séparation 0,325M tris, pH8,8 12%)

- Migration de 1 cm dans le gel de séparation.

- Coloration du gel au Bleu de Coomassie puis lavage, dépôt en acide acétique jusqu'à excision et traitement des bandes



Figure 18: Marqueur de poids moléculaire Lonza

2.1.2 Spectrométrie de masse

La totalité des étapes décrites ici est réalisée par les ingénieures de la plateforme de protéomique de l'IPBS.

• Préparation des peptides

Chaque bande d'échantillon présente dans le gel est excisée et mise en contact avec 60μ l de Trypsine modifiée ($10ng/\mu$ l, 25mM NH_4HCO_3 - Promega) à $37^{\circ}C$ durant 15h. 14μ L d'acétonitrile 2% / acide trifluoroacétique 0,05% sont ajoutés à l'extrait peptidique sec.

• Analyse par nano-LC-MS/MS et analyse des spectre de masse

5µl d'extrait peptidique sont analysés par HPLC (Système nanoRS UHPLC - Dionex) couplé au spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific).

Les données brutes sont traitées et mis en forme par les ingénieures de la plateforme. La liste intégrale des protéines (avant traitement statistique) ainsi que le rapport sont présentés en annexes 1 et 2.

2.2 Etablissement de lignées stables

2.2.1 Transfections et sélection

La transfection des CDF1 est réalisée avec la Lipofectamine 2000 reagent[®] (#11668 - Invitrogen). Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de 2 puits indépendants par lignée (A et B) et de 1.10⁶ cellules / puits. La transfection est ensuite réalisée selon le protocole du fabricant (Annexe 3). La quantité d'ADN plasmidique utilisée est de 5µg/puits de cellules.

Les vecteurs pcDNA 3.1 possèdent un gène de résistance à la Néomycine (conférant également une résistance à la Généticine ou G418), un antibiotique bloquant la synthèse protéique eucaryote et donc la croissance des cellules eucaryotes et ce à partir d'une concentration donnée. Cette propriété permet de sélectionner une population cellulaire ayant conservé le plasmide conférant la résistance et possédant la protéine fusionnée au FLAG-Tag et donc de créer des lignées (ici polyclonales) stables. La sélection a été réalisée à une concentration de 500µg/ml de G418 (G418 sulfate #10131035 – Gibco), concentration préalablement validé pour la lignée CDF1 comme étant celle permettant l'élimination totale des cellules ne possédant pas le gène de résistance.

A 48h post transfection, le milieu est donc remplacé par du milieu contenant 500µg/ml de G418 et changé tous les 3-4 jours. La mortalité des cellules témoins (transfectées avec un plasmide GFP sans gène de résistance à la Néomycine) est observée après 15 jours. La proportion de cellules résistant au G418 étant d'environ 10%, elles sont passées en plaque 12 puits afin d'augmenter la densité cellulaire et favoriser leur croissance. De plus, afin d'assurer une sélection plus drastique des cellules possédant le gène de résistance, la concentration en G418 dans le milieu est augmentée à 1mg/ml. En effet, la néomycine bloquant la synthèse protéique, seules les cellules possédant le gène de résistance ont la capacité de synthétiser les protéines d'adhésion et donc de se fixer à nouveau au support.

Ainsi, à 24h après passage, seules les cellules *a priori* transfectées adhèrent. Le milieu est alors remplacé par du milieu contenant 0,5mg/ml de G418 et 20% de SVF pour favoriser la croissance des cellules. Un tapis confluent est obtenu après 12 jours de culture et les lignées polyclonales sont amplifiées et en partie conservées en azote.

Taille de l'amplicon ADNg 700 pb

1420 pb

700 pb

400 pb

582 pb

2.2.2 Vérification des lignées par RT-qPCR

L'extraction d'ARN est réalisée à partir de 5.10⁶ cellules avec le kit d'extraction d'ARN total RNeasy Mini kit (Qiagen #74106). Un traitement à DNAse est ensuite effectué afin d'éliminer l'ADN génomique. (*DNAse I, RNase free* - Thermoscientific[™] #10649890). La RT-qPCR en une étape est réalisée avec les amorces présentées dans le Tableau 5 et le kit *iTaq™ Universal* SYBR®Green One-Step Kit (BIO-RAD #172-5150). La GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase : gène de ménage) de poulet est utilisé comme gène de référence pour la normalisation. La réaction a été réalisée avec le LightCycler[®]96 (Roche).

Tableau 5: amorces de RT-qPCR							
Gène	Séquence (F / R)	Longueur	Tm	Début /fin (sur ARNm)	Taille de l'amplicon ARNm		
CTCL	GAGCAGCAGGAGGGTTTATT	20	62	1369	118 nh		
CICF	GTTCACACTGGAATGTCTTCTTTAC	25	62	1486	110 hp		
ELEDCO	CGCACTGAAGGAGACAAGAA	20	62	1153	100 pb		
EIFZ33	TGACTCTCCCTCCAGTAGATAAG	23	62	1252	aq 001		
SNRPA1	CCTCTGTTGAGAAGGCTGAAA	21	62	246	107 pb		
	GTAAGAACGAGCTCTGTGAGAC	22	62	352	107 bp		

22

20

20

21

21

62

68

67

55

55

352

1272

1457

119

319

186 pb

221 pb

Tahl

*D'après (Figueroa et al., 2016)

PRPF19

GAPDH*

2.3 Cinétiques d'infection

TCTGGCCCCATCACCAGCAT

GCCCAAGGCAAGGTAGGTGC

TCCTCTCTGGCAAAGTCCAAG

CACAACATACTCAGCACCTGC

2.3.1 Cinétique d'infection en cycle multiple

Les cellules sont ensemencées en plague 6 puits à raison de 1.10^6 cellules/puits en triplicat. Elles sont infectées à 24h avec le virus 977 avec une MOI de 0,001. Le virus est dilué dans du milieu DMEM + 0,2% de BSA (Bovine Serum Albumin) + Trypsine-TPCK 1µg/ml (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone : inhibiteur de Chymotrypsine). Les prélèvements (70µl) sont réalisés avant infection (T0) puis après ajout du milieu de culture à 1h30 (T1), 24h (T24), 48h (T48), 72h (T72) et 80h (T80) post-infection. Ils sont conservés à -80°C jusqu'au titrage. Trois expériences indépendantes sont réalisées.

2.3.2 Cinétique d'infection en cycle unique

Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de 1.10⁶ cellules/puits en duplicat. Elles sont infectées à 24h avec le virus 977 avec une MOI de 3. A 1h30 post infection, l'*inoculum* est retiré et le tapis cellulaire est lavé 2 fois au PBS 1X stérile puis du milieu DMEM + 2% BSA est ajouté. Les prélèvements (70µl) sont réalisés avant infection (T0) puis après changement du milieu de culture à 1h30 (T1) et à 10h (T10) post-infection. Ils sont conservés à -80°C jusqu'au titrage. Trois expériences indépendantes sont réalisées.

2.3.3 Titrage en TCID50

La dose infectieuse nécessaire à l'infection de 50% d'une population cellulaire ou TCID50 (*50% Tissue Culture Infective Dose*) est la mesure du titre infectieux d'une suspension virale par dilutions successives. Le calcul du titre final prend en compte les erreurs pouvant advenir à chaque dilution. Le titrage est réalisé par infection de cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*, cellules de rein de chien sensibles aux VIA) ensemencées en plaque 96 puits à raison de 48 puits / échantillon titré. A 24h, les échantillons sont dilués : une dilution initiale au 1/10° est réalisée par ajout de 630µl aux 70µl de prélèvement puis 11 dilutions sériées d'un demi *log* $(10^{0,5})$ sont réalisées. 50µl de dilution sont déposés sur les cellules. Après 1h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, l'inoculum est retiré. Le tapis cellulaire est lavé 1 fois (DMEM) et 200µl de milieu d'infection (DMEM + 2% BSA + TPCK 1µg/ml) sont ajoutés. Les plaques sont incubées 48h à 37°C et 5% CO₂.

Les surnageant sont ensuite dosé par test d'hémagglutination: 50µl de surnageant de cellules sont mis en contact avec 50µl d'hématies de poule. Lorsque le surnageant contient du virus, celui-ci forme des agrégats d'hématies; le sang reste trouble. En l'absence de virus, les hématies sédimentent au fond du puits. Les dilutions présentant au moins 50% des puits (2/4) positifs sont relevées et le titre est calculé selon la méthode Reed-Muench (Reed and Muench, 1938).

2.4 Biochimie

2.4.1 Western blot

Les gels dénaturant SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel electrophoresis*) sont réalisés avec une solution « prête-à-couler » (TGX fast cast Acrylamide Solution StainFree - BIO-RAD). Cette solution contient un composé *trihalo* ayant la capacité de se lier aux

tryptophanes des protéines de façon covalente par activation aux UV. Cette technologie permet de révéler les protéines totales sans coloration au bleu de Coomassie, sans altérer le transfert sur membrane ni le western blot en suivant. La technologie *Stain free* permet également de réaliser une quantification et une normalisation des dépôts. Selon le poids moléculaire de la protéine étudiée, la concentration du gel choisi est de 12% (25 à 100kDa) ou de 7,5% (au-delà de 100kDa). Un marqueur de poids moléculaire standard (Mw) est déposé dans le gel en parallèle des échantillons (Precision Plus Protein All blue Standards - BIO-RAD # 1610393) (Figure 19).

- 3	250 kD
-	150
-	100
-	75
-	50
-	37
1 1	25 20
-	15
-	10
	T T T T T T T T T

Figure 19: Marqueur de poids moléculaire BIO-RAD

La migration (système *Mini PROTEAN[®] Tetra cell* - BIO-RAD) est effectuée en tampon TGS (*Tris Glycine SDS* : 2,5 mM Tris pH 8,6, 19,2 mM glycine et 0,01% SDS). Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose est ensuite réalisé en semi-sec (Trans-blot[®] TURBO - BIO-RAD) avec les kits de transfert dédiés (Trans-Blot[®] Turbo RTA Transfer Kit - BIO-RAD). La membrane et les filtres de transfert sont imprégnés de tampon de transfert (50ml de Tampon de transfert BIO-RAD 5x, 50ml d'éthanol 100%, qsp 250ml d'H₂O ultra pure). Un premier filtre est déposé sur l'électrode, suivi de la membrane, du gel et du second filtre. Les bulles d'air sont chassées puis le système est refermé avec la seconde électrode. Le programme de transfert est choisi en fonction de différents critères (Tableau 6).

Tableau 6: Programmes de transfert (Trans-blot[®] Turbo)

	Protocol Name	MW, kD	Time, min	2 Mini Gels or 1 Midi Gel	1 Mini Gel
	STANDARD SD	Any	30	Up to 1.0 A; 25 V cons	stant
	1.5 MM GEL	Any	10		
	HIGH MW	>150	10	2.5 A constant;	1.3 A constant;
	LOW MW	<30	5	up to 25 V	up to 25 V
*	MIXED MW*	5–150	7		
	1 Mini TGX [™] *	5–150	3	N/A	2.5 A constant; up to 25 V

*programme utilisé ici

Chaque membrane est ensuite bloquée 1h à TA dans du lait à 5% en TBS-T (28mM Tris pH 7,5, 100mM NaCl et 0,1% Tween20). L'anticorps primaire est ensuite incubé à 4°C sur la nuit (agitation). Les membranes sont lavées 5 fois au TBS-T puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la péroxydase (HRP : *Horseradish peroxydase*), 2h à TA (Agitation). Elles sont à nouveau lavées 5 fois au TBS-T. La révélation est réalisée avec le substrat de la HRP (Clarity Western ECL substrate - Bio-RAD) qui génère une réaction de chimioluminescence. Les membranes sont lues par caméra (ChemiDoc[™] MP - BIO-RAD) avec un temps d'exposition variable (de 3 à 15 secondes) selon l'intensité des bandes.

2.4.2 Immunoprécipitations

Billes

Trois types de billes ont été utilisés pour la réalisation des co-immunoprécipitation (Co-IP) :

Billes	Description	Provenance	Volume utilisée pour 1 réaction
Billes A/G (Protein A/G PLUS-Agarose immunoprecipitation Reagent)	Billes d'agarose couplées à des protéine A et G reconnaissant les immunoglobuline de classes: - IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgA (souris) - IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c (rats) - IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 (humains) - Anticorps polyclonaux de chèvres et lapins	Santa Cruz #sc-2003	8-20µl / ml de lysat
Billes L (Protein L-Agarose immunoprecipitation Reagent)	Billes d'agarose couplées à des protéines L reconnaissant les IgG, IgM, IgA et IgE de souris, rats et humains	Santa Cruz #sc-2336	8-20µl / ml de lysat
Billes Flag (EZview [™] Red ANTI-FLAG ® M2 Affinity Gel)	Billes d'agarose couplées à un anticorps monoclonal anti-flag M2 (dirigé contre le tag "DDDDK")	Sigma Aldrich #F2426	10-20µl / ml de lysat

Tableau 7: Liste des billes utilisées pour les co-immunoprécipitations

• Lyse totale et normalisation

Pour confirmer les interactions entre NS1 et les protéines d'intérêt, des immunoprécipitations ont été réalisées. Plusieurs protéines identifiées étant localisée dans le noyau (tout comme une partie de NS1) le parti a été pris de réaliser ces expériences sur un lysat total. Afin de préserver les complexes protéine-protéine tout en s'affranchissant des contaminants génomiques, la lyse par sonication a été privilégiée plutôt qu'un tampon dénaturant permettant de déstabiliser l'enveloppe nucléaire mais également de dénaturer les protéines. Les lysats sont préparés de la même manière que pour la co-IP préparative (*cf. 2.1.1*). Une fois

dans le tampon cyto+, les cellules sont immédiatement congelées à -80°C (sans étape d'élimination des débris cellulaires). Après décongélation lente sur glace, elles sont soumises à 5 cycles de 5 secondes d'ultrasons (amplitude : 20%) entrecoupés de 5 secondes de pause, toujours sur glace (Sonicateur : Vibracell[™] 73408 - Bioblock Scientific).

Pour chaque condition, 10µl de lysat additionné de bleu de Laemmli sont déposés en SDS-PAGE Stain Free (*cf. 2.4.1*). Une quantification relative des échantillons est alors effectuée et la concentration de chaque lysat est normalisée (par rapport à l'échantillon le moins concentré) avant l'IP.

• Billes A/G ou L et anticorps anti-NS1 IA7

La suite du protocole d'IP est identique à celui de la co-IP préparative. La révélation est réalisée en WB par un anticorps anti- FLAG-Tag.

Dans un but d'optimisation de la spécificité de l'anticorps anti-NS1 en IP, plusieurs conditions de lavage des billes ont été testées (Tampon contenant 0,1% de SDS et tampon Cyto+ avec des concentrations en NP-40 plus faibles : 0,1% et 0,05%). Le même protocole a été réalisé avec des billes couplées à des protéines L.

• Billes anti- FLAG-Tag

Avec les lignées exprimant les protéines d'intérêt fusionnées au FLAG-Tag, les IP ont été réalisées avec des billes couplées à un anticorps anti-FLAG-Tag. Les billes sont préalablement lavées dans du tampon de lyse (3 lavages, le surnageant est ôté après chaque centrifugation à 2500rpm 4°C) à raison de 20µl de billes par ml de lysat et ce pour chaque condition (NI/INF). Les billes lavées sont mises en contact avec les lysats durant une nuit à 4°C et sur roue. Les billes sont récupérées après centrifugation à 5 000rpm 3min 4°C et le surnageant d'IP éliminé. Trois lavages de 5 minutes sur roue à 4°C en TBS + SDS 0,1% sont réalisés. Les billes sont centrifugées 3 min à 5 000rpm entre chaque lavage et le surnageant éliminé. L'élution est réalisée de la même manière que pour les autres IP.

2.4.3 Immuno-cytochimie

Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits contenant une lamelle de verre de 15mm de diamètre et 0,5mm d'épaisseur selon les recommandations de la plateforme d'Imagerie (CPTP, Centre de Physiologie de Toulouse Purpan, INSERM, Toulouse) à raison

de 1 ou 2.10⁵ cellules/puits (selon la durée de l'incubation totale : 48 ou 24h). En fin d'incubation (après transfection et ou infection), les cellules sont fixées et perméabilisées : après avoir retiré le milieu, 500µl de PFA (Paraformaldéhyde) diluée à 4% (Formaldehyde 32%, EM Grade - Electron Microscopy Sciences) sont déposés (sous sorbonne) et les lamelles sont incubées 15 minutes à TA. La PFA est retirée et les lamelles sont lavées 3 fois au PBS 1X. Elles sont ensuite perméabilisées au PBS 1X + Triton 0,5% durant 10 minutes à TA. Enfin, les lamelles sont bloquées en PBS-T (0,05% de Triton X100) + 5% SVF, durant 1h à TA ou à 4°C jusqu'au marquage en immunofluorescence (IF).

2.4.4 Immunofluorescence

Le marquage par IF est réalisé avec les anticorps présentés dans le Tableau 3 à raison de 2h à TA pour les anticorps primaires et 1h à TA pour les secondaires (à l'obscurité pour éviter le photoblanchiement des fluorochromes). Chaque incubation est suivie de 3 lavages en PBS-T et d'un lavage en PBS (5 minutes sur agitation). Un rinçage à l'eau est effectué avant montage des lamelles sur lame de verre en milieu de montage contenant du DAPI pour marquer les noyaux (VECTASHIELD[®] Antifade Mounting Medium with DAPI - Vector #H-1200). Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) contenu dans le milieu de montage. L'acquisition des images est réalisée au plateau de microscopie du CPTP sur un microscope confocal SP8-STED 3X (LEICA).

2.4.5 « Duolink[®] in situ fluorescence PLA technology »

Le marquage fluorescent *in situ* Duolink[®] est une technologie développée à l'origine par la firme OLink[®] Bioscience et commercialisée par la société Sigma Aldrich-Merck-Millipore. Basée sur le principe de la PLA (*Proximity Ligation Assay* ou ligation de proximité), elle combine des techniques de biochimie des protéines et de biologie moléculaire (Figure 20). Elle permet entre autres de révéler l'interaction de deux protéines dans un tissu ou une cellule isolée.

Les cellules sont préparées de la même façon que pour une IF classique mais avec les tampons fournis dans le kit (Blocage, dilutions des anticorps, lavages, montage). Après blocage, Le marquage immunologique des protéines est réalisé avec les mêmes anticorps primaires et conditions que ceux utilisés en IF. La suite du protocole est réalisée selon les recommandations du fabricant (Annexe 4) à savoir une étape de détection par des anticorps secondaires dirigés contre les IgG de chacune des espèces des anticorps primaires (ici lapin et
souris). Chacun de ces deux anticorps est lui-même couplé de façon covalente à une sonde d'acides nucléiques d'une dizaine de paires de bases. Ces deux sondes (*Minus* et *Plus*) sont complémentaires : après lavages, une étape de ligation des sondes est réalisée. La dernière étape consiste à amplifier l'acide nucléique circulaire ainsi formé avec une polymérase. Des sondes spécifiques de l'ADN circulaire et couplées à un fluorochrome (ici équivalent d'une cyanine 5, $\lambda_{émission} = 547$ nm) s'hybrident durant l'amplification. Les lamelles sont lavées et montées de la même manière que pour les IF. Elles sont conservées à -20°C jusqu'à acquisition.



Figure 20: Principe de la technologie de marquage fluorescent in situ Duolink® (PLA)

L'acquisition est réalisée au plateau de microscopie du CPTP (INSERM, Toulouse) sur un microscope confocal SP8 (LEICA) avec un objectif à immersion 63x. Pour chaque condition, la lamelle a été balayée de façon aléatoire et 5 à 10 champs ont été acquis. Pour les cellules infectées, les images ont été réalisées en *Z-Stack* (coupes successives sur la totalité de l'épaisseur de la cellule) afin de détecter tous les foyers de PLA dans la cellule. Pour la quantification, une projection de l'intensité maximum de chaque pixel de tous les plans acquis a été réalisée pour chaque image. Pour les cellules contrôles (NI, Wt ou contrôle négatif de transfection), 10 champs ont été sélectionnés et acquis en plan simple. Les réglages optiques du microscope ont été conservés entre contrôles et essais (intensité des lasers et du photomultiplicateur).

2.5 Logiciels et statistiques

Les données concernant les séquences des protéines et leurs gènes ont été collectées dans les bases de données disponibles via NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) et UNIprot (https://www.uniprot.org/). Les alignements de séquences ont été réalisés soit avec les programmes BLAST disponibles sur NCBI soit avec le logiciel en ligne Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/). Les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism (Version 5.01). Les western blots ont été analysés avec le logiciel BIO-RAD, Image Lab Software (Version5.2.1). Les amorces de RT-qPCR ont été dessinées avec le logiciel en ligne IDT (https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). Les résultats de qPCR ont été analysés avec le logiciel Roche LightCycler[®] 96 SW1.1 (version 1.1.0,1320). Les images de microscopie confocale ont été analysées avec le logiciel FIJI (Image J version 1.52d).

Les tests statistiques pour les données de spectrométrie de masse (t-test de Student apparié des ratios : <u>https://www.graphpad.com/support/faq/the-ratio-paired-t-test/</u>) et les calculs de TCID50 (Reed-Muench) ont été réalisés avec le logiciel Excel.

Les graphiques (qPCR, WB, Cinétiques, PLA) et les tests statistiques pour les données de PLA (t-test de Students non apparié) ont été réalisés avec le logiciel Graphpad PRISM (version 7.00).

RESULTATS

1 Introduction

L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation des virus Influenza A aviaire à un hôte mammifère, en l'occurrence l'Homme. Plusieurs facteurs sont impliqués dans ces mécanismes tels que le complexe polymérase ou les récepteurs cellulaires spécifiques de la HA. Dans cette étude, nous nous concentrons sur la protéine virale non structurale NS1 et ses interactions cellulaires. Plusieurs études ont précédemment été menées dans l'équipe sur l'implication de NS1 dans la virulence et la pathogénicité des VIA (Soubies et al., 2010a, 2010b). La localisation de NS1 dans les compartiments cellulaires durant l'infection a également été étudiée. Des différences entre cellules mammifères et aviaires ont été soulevées, appuyant de nouveau l'implication de NS1 dans les mécanismes d'adaptation des VIA à l'hôte (Volmer et al., 2010). Ce projet est donc la continuité évidente de ces études. De plus, celles-ci ayant été menées dans l'équipe, des outils (cellules, virus et anticorps) permettant l'étude de NS1 étaient déjà disponibles au laboratoire. Nous avons choisi de travailler avec le virus aviaire A/turkey/Italy/977/1999 (H7N1) car un système complet de génétique inverse a été créé et est disponible dans l'équipe. En ce qui concerne le choix des cellules, l'interactome de NS1 en cellules aviaires n'ayant jamais été étudié, nous devions choisir une lignée cellulaire pertinente, disponible et pour laquelle une banque de données de peptides existait pour l'analyse en spectrométrie de masse. Le choix s'est donc porté sur les cellules de poulet CDF1 (banque Gallus gallus disponible) plutôt que sur des cellules de caille (QT6 : Coturnix coturnix japonica quail tumor) pour laquelle il n'existe pas de banque de peptides.

Les résultats de cette étude nous ont permis de révéler l'interactome probable de NS1 en cellules de poulet. Nous avons confirmé l'interaction de certaines de ces protéines, nous avons créé des outils pour étudier ces interactions et avons commencé à les caractériser.

2 Analyse de l'interactome de NS1 en spectrométrie de masse

2.1 Co-immunoprécipitation préparative

Dans un premier temps il a été nécessaire de réaliser l'optimisation des conditions d'immunoprécipitation afin notamment de confirmer que l'anticorps IA7 était bien immunoprécipitant. Cinq expériences ont été nécessaires pour déterminer les conditions d'infection (nombre de cellules fixé à $3.5.10^6$ / boite, MOI durant 8h d'infection), les conditions de co-IP (billes A/G, ratio de 9µg d'anticorps pour 12µl de billes / ml de lysat et pas de pré-couplage de l'anticorps aux billes), améliorer les conditions de lavage (stringence du tampon : sans détergent) et d'élution (concentration finale du tampon de Laemmli de 2X) (Figure 21).



Figure 21: IP préparative, Gel de SDS-PAGE

TOT : Lysat total (tampon cyto +), SN (Surnageant avant lavage des billes) IP (surnageant d'IP) IgG Hc : Chaine lourde de l'anticorps anti-NS1 IA7 (50kDa) IgG Lc : Chaine légère de l'anticorps l'anticorps anti-NS1 IA7 (25kDa). NS1 : 26kDa. Mw : ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker (Lonza)

Après optimisation, 3 expériences indépendantes ont été réalisées. Les échantillons ont été déposés en gel préparatif (Figure 22) selon les recommandations de la plateforme de protéomique de l'IPBS et leur ont été envoyés.



Figure 22: Gel préparatif pour la spectrométrie de masse

La totalité sur surnageant d'IP est déposé dans un gel SDS-PAGE comprenant un gel de concentration à 4% et un gel de séparation à 12% afin de concentrer au maximum les protéines précipitées. Chaque puits d'échantillon est séparé par un puits vide pour éviter les contaminations croisées et le gel est coloré au bleu de Coomassie afin de faciliter l'excision des bandes.

2.2 Identification de 17 protéines candidates

La plateforme de protéomique de l'IPBS nous a remis une liste de 381 protéines cellulaires de poulet (Annexe 1) retrouvées dans l'échantillon infecté et interagissant potentiellement avec la protéine NS1 du virus. Pour chacune une concentration relative nous a été donnée.

La technique de co-IP ne permettant pas d'obtenir une solution pure de ces protéines, une grande partie des protéines détectées dans les échantillons infectés a également été détectée dans les échantillons non infectés. Il a donc été nécessaire de déterminer si la présence d'une protéine était significative ou non dans l'extrait infecté par rapport à celui non-infecté .Un test statistique (*T-test de Student apparié unilatéral des ratios*) a donc été réalisé sur les 3 expériences. Ce test permet de comparer chaque ratio INF/NI et de déterminer pour chaque protéine et de déterminer quelles sont celles ayant été enrichies significativement. Il est intéressant de noter que sur 381 protéines totales seules 4 ne sont pas communes aux trois expériences.

Ce test nous a permis de dégager une liste de 17 protéines dont la concentration était significativement accrue dans les cellules infectées. Ces 17 protéines sont donc des partenaires potentiels de la protéine NS1 lors de l'infection par le virus Influenza A 977 (Tableau 8). Parmi ces protéines, nous avons pris en compte plusieurs critères afin de choisir celles pour lesquelles continuer l'étude :

- Existence d'un anticorps commercial dirigé contre la protéine de poulet (ou du moins prédit comme tel)

- Identification d'homologues interagissant avec NS1 en cellules humaines

- Identification d'homologues interagissant avec d'autres protéines virales (non-influenza A) en cellules humaines, mammifères ou aviaires.

Le premier critère retenu a entrainé une réduction drastique de la liste de candidates potentielles. Cependant, 5 protéines ont été retenues (Tableau 8). Quatre d'entre-elles possèdent des homologues ou sont de la même famille que des protéines cellulaires humaines interagissant avec NS1 :

La sous-unité p85β de la PI3K (phosphatidylinositide 3-kinase) également appelée PIK3R2 (*phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta*) est un partenaire cellulaire de NS1 en cellules humaines, impliquée de dans nombreux mécanismes de la survie cellulaire et de l'apoptose (Hale et al., 2006; Shin et al., 2007; Ylösmäki et al., 2016a).

La protéine PRPF19 est un homologue de la protéine PRP19 humaine. Celle-ci a été identifiée comme partenaire de NS1 en cellules humaines et joue une rôle important dans la réplication virale (Kuo et al., 2016).

En cellules humaines, la protéine *U2 small nuclear ribonucleoprotein A'* (U2 SNRP, codée par le gène SNRPA1), interagit spécifiquement avec la NS1. Le rôle de celle-ci est d'empêcher la formation de deux complexes d'épissage (U6-U2 et U6-U4 snRNA), bloquant ainsi l'épissage des ARNm cellulaires (Qiu et al., 1995).

Parmi les 4 protéines connues comme interactants de NS1, on retrouve la protéine EIF2S3 appartenant à la famille des protéines initiatrices de la traduction Or, NS1 est également un partenaire de la eIF4G (*Eukaryotic translation initiation factor 4 G*). Son rôle est de gêner la formation des complexes d'initiation de la traduction des ARNm cellulaires (Burgui et al., 2003).

Enfin la protéine CTCF, est une candidate intéressante. Décrite comme interagissant avec d'autres protéines virales (Papillomavirus Humain, West Nile), CTCF est généralement impliquée dans le contrôle et la régulation de l'expression des gènes viraux ainsi que dans les mécanismes d'apoptose (Paris et al., 2015; Pentland and Parish, 2015; Smith et al., 2012).

Tableau 8: Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse

		Concentrations en protéine							
	Numéro d'accession	NI exp 1	NI exp 2	NI exp 3	INF exp 1	INF exp 2	INF exp 3	Ratio [INF]/[NI] (moyenne)	T-Test
Transcriptional repressor - CTCF	CTCF	1,4E+04	2,0E+05	6,9E+04	6,1E+04	1,5E+06	5,6E+05	6,6	0,006
Serine/threonine-protein kinase - VRK1	F1NDK1	2,3E+05	4,4E+04	2,9E+04	9,7E+06	7,5E+05	3,0E+05	23,4	0,010
Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta - PIK3R2 (PI3K)	E1C2C5	1,4E+04	4,4E+04	1,1E+04	6,1E+04	4,2E+05	1,1E+05	8,1	0,010
Protein LYRIC (MTDH : metadherin gene in human)	F1NBN0	6,5E+04	2,0E+05	1,3E+05	8,5E+05	1,1E+06	6,0E+05	7,8	0,013
Ras GTPase-activating-like protein - IQGAP1	F1NY82	1,6E+06	1,0E+06	3,5E+05	1,8E+07	4,0E+06	1,8E+06	6,6	0,014
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 - EIF2S3	F1NPF0	2,6E+05	1,7E+05	1,4E+05	3,6E+06	9,0E+05	5,7E+05	7,7	0,019
Aggrecan promoter binding protein	Q45KQ2	2,6E+06	4,5E+05	2,9E+04	1,4E+07	1,6E+06	3,9E+05	7,4	0,022
Guanine nucleotide-binding protein-like 3 isoform X1 - GNL3	F1NLK0	1,4E+04	4,4E+04	1,9E+04	6,1E+04	2,3E+05	3,2E+05	8,7	0,022
U2 small nuclear ribonucleoprotein A' - SNRPA1	F1NAC8	3,7E+04	2,8E+05	8,5E+04	1,2E+06	9,9E+05	8,0E+05	15,0	0,034
Histone H2A-IV	H2A4	1,4E+06	1,5E+06	1,0E+06	7,5E+06	2,7E+06	3,3E+06	3,4	0,035
DNA topoisomerase 1 - TOP1	F1NPT1	5,8E+05	1,4E+06	5,3E+05	6,4E+06	3,3E+06	1,8E+06	5,6	0,042
Cell division cycle 5-like protein - CDC5L	E1C6A9	3,4E+04	3,0E+05	1,9E+05	1,1E+06	1,5E+06	7,1E+05	13,8	0,045
Leucine zipper protein - PTRF	Q90838	6,7E+05	8,1E+05	1,8E+04	3,1E+06	1,3E+06	1,2E+05	4,4	0,051
ADP/ATP translocase 3	Q5ZLG7	1,5E+06	6,4E+05	4,8E+04	1,0E+07	9,6E+05	3,4E+05	5,1	0,054
Histone H1.11R - HIST1H111R	F1NME1	1,0E+06	5,7E+06	2,6E+06	3,3E+07	1,5E+07	1,5E+07	13,6	0,054
Pre-mRNA-processing factor 19 - PRPF19	PRP19	1,3E+05	4,7E+05	5,0E+05	2,4E+06	2,3E+06	1,0E+06	8,5	0,055
Heterochromatin protein 1-binding protein 3- HP1BP3	F1N8H6	2,6E+05	6,6E+05	3,6E+05	3,6E+06	1,2E+06	1,5E+06	6,7	0,057

17 protéines détectées significativement dans les éluats (IP) de co-immunoprécipitation NS1, NI vs INF avec une *p-value* ≤ 0,05. Le test statistique choisi est un

T-test de Student apparié unilatéral des ratios. En bleu : les 5 protéines candidates choisies.

3 Confirmation des interactions par immunoprécipitation

3.1 Tests infructueux d'anticorps

Peu d'anticorps dirigés contre les protéines de poulet existent. Des anticorps dirigés contre les protéines EIF2S3, PIK3R2, SNRPA1 et PRPF19 de souris et prédits comme fonctionnel sur leurs homologues de poulet ont été testés. Afin de vérifier l'affinité des anticorps pour chaque protéine, des lysats totaux de cellules non infectées murines (3T3, décrites comme lignées contrôle dans les fiches techniques des fabricants) ainsi qu'aviaires (CDF1) ont été réalisés. Les lysats ont ensuite été analysés et révélés par western blot. Trois expériences indépendantes ont été réalisées sans résultat : aucun de ces anticorps ne reconnaissant la protéine aviaire.

En revanche, les mêmes tests ont été réalisés avec un anticorps dirigé contre la protéine CTCF. L'affinité de l'anticorps a bien été validée en western blot mais avec un signal très faible. Néanmoins, les essais d'utilisation de l'anticorps en immunoprécipitation s'étant révélés infructueux, une autre stratégie expérimentale a été établie afin de confirmer les interactions de NS1. (La liste des anticorps testés est présentée en annexe 5)

3.2 Etablissement des lignées surexprimant les protéines fusionnées à

un FLAG-Tag

N'ayant pas d'anticorps spécifique des protéines choisies, la stratégie adoptée a été de coupler chaque protéine à un FLAG-Tag permettant la révélation ou l'immunoprécipitation des protéines avec un anticorps anti-FLAG. Les plasmides permettant la fusion des protéines EIF2S3, PRPF19, SNRPA1 et CTCF ont donc été acquis auprès de la société Genscript[®]. Les CDF1 ont été transfectées et sélectionnées comme décrit précédemment. Chaque lignée a ensuite été vérifiée par RT-qPCR (Figure 23) et les lignées B ont été amplifiées et conservées à l'azote.

En parallèle les lignées ont été vérifiées en western blot. Seules les lignées exprimant CTCF et SNRPA1 ont permis la détection des protéines (Figure 24). Malgré un taux relatif d'ARNm trois fois supérieure au taux basal, les protéines EIF2S3 et PRPF19 n'ont pas été détectées spécifiquement et les lignées ont donc été abandonnées.



Figure 23: Taux relatif d'ARNm des différentes protéines surexprimées dans les cellules CDF1 Après extraction des ARN totaux, les quantités d'ARNm ont été évaluées par RT-qPCR et la méthode 2^{-(ΔΔCt)}, avec l'ARNm de GAPDH en référence. Les quantités d'ARNm ont été relativisées par celle dans les cellules CDF1 sauvages (Wt).



Figure 24: Western Blot de vérification des lignées

NB : Le FLAG augmente la taille de la protéine de 7kDa donc SNRPA1 est attendue à 35kDa (au lieu de 28kDa). La protéine CTCF native a une taille de 83kDa mais est détectée à environ 140kDa en WB (Zhang et al., 2017) soit environ 150kDa lorsqu'elle est fusionnée au FLAG . *Mw : Marqueur de poids moléculaire BIO-RAD*

3.3 Confirmation des interactions avec NS1 par IP

3.3.1 Précipitation avec l'anticorps Anti-NS1 IA7

Dans un premier temps, il était indispensable de confirmer l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF en les co-immunoprécipitant de la même manière que pour la spectrométrie de masse. Cette étape étant cruciale pour la confirmation des interactions, de nombreux paramètres ont été testé afin d'atteindre cet objectif :

Tout d'abord, la réalisation d'une lyse totale par sonication des cellules a été utilisée afin d'atteindre les protéines nucléaires (SNRPA1 et CTCF ainsi que NS1 sont en partie localisées dans le noyau). Un problème récurrent est cependant apparu : la présence d'une bande spécifique des protéines couplées au FLAG dans le surnageant d'IP NI (Figure 25). Cette bande s'explique par la fixation non spécifique aux billes de la protéine FLAG en l'absence de NS1. Des tests d'augmentation de la stringence des lavages (±NP-40 à 0,05% ou ± SDS à 0,01%) ainsi que le changement de billes (billes couplées à des protéines L) ont donc été réalisés, sans succès (perte totale des protéines couplée au FLAG ou persistance de la bande non spécifique).



Figure 25: IP anti-NS1 avec les lignées CDF1-SNRPA1 et CDF1-CTCF

A) L'IP est réalisée sur des lysats totaux de cellules CDF1 SNRPA1 avec l'anticorps anti-NS1 IA7. Le western blot est révélé avec l'anticorps anti-Flag (Lapin). La flèche rouge indique la bande non spécifique dans le puits contenant l'IP sur CDF1-SNRPA1 NI. **B)** L'IP est réalisée sur des lysats totaux de cellules CDF1-CTCF avec l'anticorps anti-NS1 IA7. Le western blot est révélé avec l'anticorps anti-Flag (Lapin). La flèche rouge indique la bande non spécifique dans le puits contenant l'IP sur CDF1-SNRPA1 NI. **B)** L'IP est réalisée sur des lysats totaux de cellules CDF1-CTCF avec l'anticorps anti-NS1 IA7. Le western blot est révélé avec l'anticorps anti-Flag (Lapin). La flèche rouge indique la bande non spécifique dans le puits contenant l'IP sur CDF1-CTCF NI. *Mw : Marqueur de poids moléculaire BIO-RAD.*

Cette étape de validation est considérée comme indispensable pour valider l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et/ou CTCF mais malgré les nombreux tests réalisés, nous n'avons pu la mettre en évidence. Il a donc fallu trouver des alternatives.

3.3.2 Précipitation avec les billes FLAG

La stratégie de confirmation des interactions de NS1 avec CTCF et SNRPA1 par IP a donc été envisagée en n'utilisant non plus NS1 comme appat d'interaction mais les protéines cibles surexprimées et fusionnées au FLAG. Nous avons donc utilisé des billes pré-couplées à un anticorps anti-FLAG. Cette technique a également dû être optimisée mais cette fois avec succès (Figure 26). En effet, l'adjonction de SDS à 0,01% dans le tampon de lavage des billes en fin d'IP a permis d'éliminer la quasi-totalité du signal non spécifique dans les CDF1-Wt Infectées (NS1 s'accrochant de façon non spécifique sur les billes, une bande apparaissait en absence de protéine FLAG dans le lysat).



Figure 26: IP anti-FLAG avec les lignées CDF1-SNRPA1 et CDF1-CTCF

A) L'IP est réalisée sur des lysats totaux de cellules CDF1 SNRPA1 avec les billes FLAG. Le western Blot est révélé avec l'anticorps anti-NS1 « Tours » (Lapin). *Mw : Marqueur de poids moléculaire BIO-RAD.*B) Quantification du western blot. Le volume et l'intensité de chaque bande est relevée (logiciel Image Lab BIO-RAD). Chaque valeur d'IP est normalisée par rapport au lysat total correspondant (NI ou INF). Le ratio de la valeur obtenue pour chaque IP Ni vs INF est présentée ici.

Il convient de préciser que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Bien que prometteurs ces résultats sont préliminaires (n=1) et sont à confirmer avec deux autres expériences indépendantes. Il faut de plus ajouter qu'il manque ici un contrôle. En effet, afin de démontrer que la précipitation de NS1 par la protéine est bien due à celle-ci et non au FLAG, il faudrait établir une lignée stable exprimant une protéine non relevante fusionnée à un FLAG-tag et réaliser les IP en parallèle sur cette lignée.

4 Confirmation des interactions par PLA

Les résultats des expériences d'IP ayant été peu concluants, nous avons développé une technologie permettant à terme de démontrer que deux protéines sont extrêmement proches par PLA (*Proximity Ligation Assay*).

4.1 Mise en évidence de l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF en transfection transitoire

Dans un premier temps nous avons réalisé une expérience de PLA sur les lignées et les CDF1 transfectées transitoirement. Nous avons ainsi pu ajouter en contrôle un plasmide exprimant la protéine non-relevante TRAF6 (*TNF receptor associated factor*, n'interagissant pas, *a priori*, avec NS1) fusionnée au FLAG-Tag. L'expression des protéines et l'infection des cellules a été validée en Immunofluorescence en parallèle de la PLA (Figure 27). Cela nous a permis d'observer une efficacité de transfection ne dépassant pas les 20%.

Pour chaque condition, marquée en PLA, une image représentative est présentée en Figure 28 (A et B). Les points de fluorescence correspondant aux foyers de PLA ont été quantifiés avec le logiciel FIJI (Image J) et les données de quantifications sont présentées en Figure 28 (C).

Les résultats de cette première expérience ont permis de mettre en évidence une interaction spécifique de SNRPA1 et CTCF avec NS1, mais serait cependant à confirmer par 2 expériences supplémentaires.

Page **| 83**



Figure 27: Vérification de l'efficacité d'infection et de transfection (transitoire) des CDF1 en IF

Les CDF1 Wt, ensemencées sur lamelles, sont transfectées (ou non) à 24h puis infectées à 48h (MOI 3) durant 10h. Après fixation elles sont marquées en IF (Anticorps primaires anti-Flag de souris et anti-NS1 « tours » de lapin, révélés respectivement en rouge et vert). L'acquisition est réalisée en microscopie confocale (SP8 - LEICA) puis analysée avec le logiciel FIJI (ImageJ). L'efficacité de transfection observée est comprise entre 10 et 20% tandis que 100% des cellules sont infectées. *Barre d'échelle : 20µm*.



.



Figure 28 : Analyse par PLA des interactions de NS1 avec SNRPA1 et CTCF dans les CDF1 transfectées transitoirement et infectées

Les CDF1 Wt, ensemencées sur lamelles, sont transfectées (ou non) à 24h puis infectées à 48h (MOI 3) durant 10h. Après fixation elles sont marquées en PLA (Anticorps primaires anti-Flag de souris et anti-NS1 « tours » de lapin, anticorps couplés aux sondes spécifiques, ligation, et amplification). L'acquisition est réalisée en microscopie confocale (SP8 - LEICA) puis analysée avec le logiciel FIJI (ImageJ). Pour chaque image, le nombre de points (foyers de PLA) est dénombré ainsi que les cellules.

A) Champs larges pour chaque condition B) Cellule CDF1-CTCF infectée (zoom 2x). C) résultats de la quantification avec le logiciel FIJI (Image J). Au total 10 images par contrôle et 5 images par essai ont été quantifiées pour chaque interaction. Le nombre de points (foyer de PLA) par image a été normalisé par le nombre de cellules dans le même champ. Les tests statistiques (T-test de Student non appariés) ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism[®] 7. Sur le graphique * indique une p-value \leq 0,05 et ** une p-value \leq 0.01. Cette figure permet de mettre en évidence que SNRPA1 et CTCF semblent interagir avec NS1 contrairement à TRAF6. Les données sur les cellules CDF1-Wt non transfectées ne sont pas présentées ici. *Barre d'échelle : 20µm*

4.1 Mise en évidence de l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF dans les lignées stables

L'utilisation des CDF1 en transfection transitoire représente une limitation à la technique. En effet, bien que la totalité des cellules soient infectées, le faible taux de transfection des cellules réduit la proportion de foyers de PLA sur les lamelles. Nous avons donc réalisé la même expérience avec les lignées stables surexprimant SNRPA1 et CTCF. Les IF ont également été réalisées en parallèles permettant de mettre en évidence une surexpression des protéines FLAG dans 90à 100% des cellules.

Pour chaque condition, marquée en PLA, une image représentative est présentée en Figure 28 (A). Les points de fluorescence correspondant aux foyers de PLA ont été quantifiés avec le logiciel FIJI (Image J) et les données de quantifications sont présentées en Figure 28 (B et C).

Ces résultats affichent la même tendance que ceux obtenus en transfection transitoire. Cependant, ici encore, deux expériences indépendantes supplémentaires seraient nécessaires.





Figure 29: Analyse par PLA des interactions de NS1 avec SNRPA1 et CTCF dans les lignées stables.

Les CDF1 (Wt et lignées surexprimant SNRPA1-FLAG ou CTCF-FLAG) ensemencées sur lamelles, infectées à 24h (MOI 3) durant 10h. Après fixation elles sont marquées en PLA (Anticorps primaires anti-Flag de souris et anti-NS1 « tours » de lapin, anticorps couplés aux sondes spécifiques, ligation, et amplification). L'acquisition est réalisée en microscopie confocale (SP8 - LEICA) puis analysée avec le logiciel FIJI (ImageJ). Pour chaque image, le nombre de points (foyers de PLA) est dénombré ainsi que les cellules. *Barre d'échelle : 20µm*

A) Champs larges pour chaque condition B) Cellule CDF1-CTCF infectée (zoom 2.5x). C) résultats de la quantification avec le logiciel FIJI (Image J). Au total 10 images par contrôle et 5 images par essai ont été quantifiées pour chaque interaction. Le nombre de points (foyer de PLA) par image a été normalisé par le nombre de cellules dans le même champ. Les tests statistiques (T-test de Student non appariés) ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism[®] 7. * indique une p-value \leq 0.05, ** une p-value \leq 0.01 et *** une p-value \leq 0.001. Cette figure permet de mettre en évidence que SNRPA1 et CTCF semblent interagir avec NS1. *Barre d'échelle : 20µm*

5 Impact de la surexpression de CTCF et SNRPA1 sur la réplication du virus

Pour commencer à caractériser l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF, la cinétique en cycle multiple (MOI 0,001 durant 80h) du virus 977 été réalisée sur les lignées surexprimant ces deux protéines en parallèle de la lignée CDF1-Wt (Figure 30).



Figure 30: Cinétiques d'infection du virus 977 dans les lignées CDF1 surexprimant SNRPA1 ou CTCF (Cycles multiples)

Chaque lignée a été infectée avec le virus 977 avec une MOI de 0,001 et incubée durant 80h. Les prélèvements ont été réalisés à 1, 24, 48, 72 et 80h puis titrés en TCID50. Chaque point représente la moyenne (et déviation standard) des triplicats de chacune des 3 expériences indépendantes réalisées.

Les cinétiques en cycles multiples ne permettent pas de déterminer une action significative de SNRPA1 ou CTCF sur la cinétique de réplication du virus.

DISCUSSION

L'objectif de ce projet est de comprendre quels sont les mécanismes contribuant à l'adaptabilité des VIA à leurs hôtes, médiés par NS1. Cela implique de découvrir quels sont les partenaires de NS1 en cellules aviaires, comment ces interactions sont régies et quelle influence elles ont sur le cycle viral ou le cycle cellulaire. Contrairement aux mammifères, l'interactome de NS1 n'avait encore jamais été étudié chez les oiseaux. Cette étude préliminaire nous a permis d'obtenir une première vision d'ensemble de quelques partenaires potentiels du VIA 977 (H7N1) chez le poulet (Gallus gallus). Travailler en cellules de poulet représente donc un atout puisque cette étude de spectrométrie de masse est certainement la première et que nous avons pu la réaliser sans a priori. En revanche, il est évident que les outils disponibles pour l'étude des cellules aviaires sont bien moins développés que pour les cellules de mammifères, à commencer par les banques de peptide et les lignées cellulaires. En effet il existe peu de lignées cellulaires permissives aux VIA aviaires disponibles. Nous avions le choix entre une lignée de cellules de caille (QT6) et la lignée de cellules épithéliales de poulet CDF1. Notre choix s'est porté sur les CDF1 puisqu'il n'existe pas de banque de peptides Coturnix coturnix japonica. D'autres lignées de cellules épithéliales ont été développées et caractérisées récemment : les cellules CLEC213 représentatives d'un épithélium pulmonaire de poulet et les cellules chAEC, des cellules endothéliales d'aorte de poulet (Lion, 2017). Il serait particulièrement intéressant de réaliser la même étude avec ces cellules.

Notre étude de spectrométrie de masse nous a permis d'établir une liste de 17 partenaires cellulaires potentiels de NS1 chez le poulet. Parmi ces protéines plusieurs ont été identifiées comme homologues ou proches de protéines précédemment identifiées en cellules humaines comme par exemple la sous unité p85β de la PI3 kinase. Egalement appelée PIK3R2 celle-ci a été identifiée comme partenaire de NS1 du virus PR8 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) en cellules humaines. Leur interaction entraine l'activation de la voie PI3K/Akt, responsable de l'activation d'autres voies de signalisation associées à la survie cellulaire, la prolifération, la migration, la différentiation et à l'apoptose. Dans le cas de l'infection par un virus Influenza, cette activation permet au virus de recruter une partie de la machinerie cellulaire au profit de la réplication virale. Cette interaction a été très étudiée (Ayllon et al., 2012; Hale et al., 2006, 2009; Ylösmäki et al., 2015, 2016b) et identifier une similitude en cellules aviaires présente un intérêt important concernant le mécanisme d'adaptation des VIA à l'hôte.

PIK3R2 est un exemple dans la liste de protéines que nous avons identifiées ce qui nous conforte dans l'idée que ces résultats sont cohérents avec la littérature.

L'étape suivante a donc été de chercher à valider certaines de ces interactions. Nous nous sommes là encore heurtés aux limites techniques de l'utilisation du modèle aviaire. En effet, peu d'outils biochimiques et moléculaires sont commercialisés à commencer par les anticorps. Nous avons ainsi cherché les anticorps disponibles contre les protéines de poulet de notre liste. Seuls cinq anticorps se sont avérés disponibles, dirigés contre EIF2S3, SNRPA1, PIK3R2, PRPF19 et CTCF humaines ou murines mais uniquement « prédits » comme spécifiques de la protéine aviaire (non testés par le fabricant). Ces anticorps ont été testés en WB sur des lysats totaux de cellules humaines, murines et aviaires sans succès. Cependant il pourrait être intéressant de les tester sur des surnageant de co-IP obtenus avec les lignées surexprimant les protéines (en effet, la protéine est alors enrichie et pourrait alors être détectée).

Afin de nous adapter à ces contraintes techniques, nous avons choisi la stratégie de l'utilisation de protéines fusionnées à un FLAG-Tag. Les CDF1 sont des cellules se transfectant difficilement (10 à 20% d'efficacité) nous avons donc pris le parti d'établir des lignées stables. Quatre protéines ont été sélectionnées selon la disponibilité des vecteurs d'expression et deux lignées cellulaires ont été établies pour CTCF et SNRPA1. Nous avons donc continué à valider nos outils avec ces deux lignées. Une perspective du projet est de reprendre les expériences pour les deux autres protéines (PRPF19 et EIF2S3).

A partir de ces lignées nous avons entrepris de confirmer l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et/ou CTCF. La première étape était de valider cette interaction dans les même conditions que celles utilisées pour la spectrométrie de masse : précipiter les complexes NS1 /SNRPA1 et NS1/CTCF avec l'anticorps NS1-IA7. Nous nous sommes heurtés à un problème récurrent pour lequel aucune solution n'a été trouvée : La présence d'une bande non spécifique de protéine FLAG dans les surnageants d'IP Non infectés. Les pistes classiques de lavages plus stringents ont été testées entrainant la perte totale du signal (spécifique ou non). L'hypothèse d'une fixation trop faible de l'anticorps sur les billes a également été émise et nous avons essayé de travailler avec des billes couplées à des protéines L plutôt que A/G, permettant une fixation plus spécifique des immunoglobulines. Cette solution est restée sans succès également. D'autres pistes sont à envisager notamment l'utilisation d'un autre anticorps anti-NS1 : il

serait intéressant de réaliser la précipitation de NS1 avec l'anticorps anti-NS1 « Tours » par exemple. Il convient également de préciser que les conditions utilisées en IP ne sont pas les mêmes que pour l'IP préparative pour la spectrométrie de masse. En effet, ici les cellules surexpriment la protéine d'intérêt tandis que seules les protéines endogènes totales étaient précipitées dans l'IP préparative. Or si SNRPA1 et CTCF ne sont pas des partenaires forts et privilégiés de NS1, l'interaction avec celles-ci peut être noyée dans le bruit de fond non spécifique.

En l'absence de résultats avec la technique classique d'IP, il a fallu mettre au point d'autres techniques afin de mettre en évidence l'interaction de NS1 avec CTCF et SNRPA1. Il apparait nécessaire de multiplier ces techniques alternatives afin de s'assurer de l'interaction.

Dans un premier temps, l'IP inverse a été développée (Précipitation des protéines FLAG avec des billes spécifiques et détection de NS1 avec l'anticorps anti-NS1 « Tours »). L'optimisation des lavages nous a permis de réaliser une expérience concluante. Néanmoins, il faut noter qu'il manque un contrôle essentiel dans cette expérience. En effet, une protéine non-relevante (n'interagissant pas avec NS1) serait à inclure. Le développement d'une lignée stable exprimant la protéine TRAF6 est donc à prévoir pour confirmer ces résultats préliminaires.

En parallèle de ces techniques d'IP nous avons envisagé la mise en évidence de l'interaction des protéines d'intérêt avec NS1 par des approches de microscopie confocale. Les techniques de colocalisation réalisées en IF sont intéressantes mais insuffisamment résolutives. En effet, la limite de résolution d'un microscope confocal est de l'ordre de 100 nm tandis que la distance maximale séparant deux protéines interagissant est de l'ordre de 1 à 10 Å (0,1 à 1 nm). La technologie DUOLINK[®] *in situ Fluorescence* nous a donc semblé être un excellent compromis. Associant biochimie et biologie moléculaire *in situ*, cette technologie basée sur le principe de la PLA[®] ou ligation de proximité s'impose depuis quelques années comme l'une des techniques de mise en évidence et d'étude des interactions les plus simples et les plus spécifiques (Schlingemann et al., 2010; Söderberg et al., 2006; Wensman et al., 2016). De plus, grâce à l'amplification du signal la PLA permet de détecter des évènements rares ce qui semble être le cas pour les interactions que nous étudions. En effet, Les résultats de PLA obtenus permettent de mettre en évidence une interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF. Il convient de préciser que l'étude a une fois de plus été réalisée sur des CDF1 surexprimant

SNRPA1 ou CTCF et que les interactions observées sont de l'ordre de 1 à 2 évènements par cellule en transfection transitoire et de 4 à 5 en lignée stable. Bien qu'une seule expérience ait été réalisée, il semble que ces chiffres soit significatifs (notamment par rapport au contrôle TRAF6 qui a pu être intégré dans cette expérience) et que l'interaction de NS1 avec ses partenaires ne soit assez rare ou du moins transitoire dans les conditions dans lesquelles nous nous sommes placés (Cycle unique, MOI 3, fixation à 10h post-infection). En effet, il serait intéressant de réaliser l'étude en PLA de l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF à plusieurs temps post-infection (par exemple à 2, 4 et 8h) ainsi qu'en cycle multiple (MOI 0,001 durant 72h).

En parallèle, il nous semblait important d'étudier l'impact de la surexpression des protéines SNRPA 1 et CTCF sur la réplication virale. Les expériences en cycles multiples et cycle unique (données non présentées) ont mis en évidence une absence d'effet de cette surexpression sur la cinétique d'infection du virus 977. Cela semble être un résultat normal si l'on considère que l'interaction de NS1 avec SNRPA1 et CTCF serait assez rare et transitoire, la quantité basale de protéines endogènes serait nécessaire mais suffisante pour agir sur la réplication virale. En revanche, une perspective de travail est de réaliser une déplétion des protéines d'intérêt dans les CDF1 (par siRNA ou par la technique de CRISPR-Cas9). Dans le cas d'une interaction, même faible et/ou transitoire, un effet, qu'il soit négatif ou positif, serait à attendre.

Les perspectives ouvertes par ce travail préliminaire sont importantes. En effet, la confirmation des interactions de NS1 avec CTCF et SNRPA1 par IP reste encore à préciser. Les résultats de PLA supplémentaires sont également à enrichir. D'autres perspectives techniques pour confirmer les interactions sont également envisagées notamment avec la technique de double hybride. Le principe de cette technique est d'utiliser une protéine test dont une des extrémités peut se fixer à une séquence activatrice, et l'autre peut activer la transcription d'un gène rapporteur mis sous contrôle de cette séquence. Par clonage moléculaire, deux protéines hybrides seraient synthétisées : l'une constituée d'une extrémité de la protéine test fusionnée avec (NS1), l'autre formée de l'autre extrémité fusionnée à l'une des protéines interagissent physiquement, les deux hybrides interagissent et permettent la transcription du gène rapporteur. Cette technique, quoique lourde à développer permettrait d'étudier on seulement l'interaction de SNRPA1 et CTCF avec NS1

mais aussi d'envisager d'étudier les autres candidates de la liste obtenue en spectrométrie de masse.

En effet, la recherche d'outils spécifiques des protéines de poulet nous a contraints à restreindre drastiquement notre champ d'étude, néanmoins, cette liste présente plusieurs autres candidates potentielles. Les histones par exemple sont une cible intéressante. En effet, NS1 présente une partie de sa séquence protéique lui permettant de mimer les histones. Il a été montré que la NS1 du virus H3N2 avait ainsi la capacité de séquestrer 17 à 24% des histones nucléaires ce qui lui permet de réguler sélectivement l'expression de certains gènes notamment impliqués dans la réponse antivirale (Marazzi et al., 2012; Qin et al., 2014). D'autres protéines comme la protéine LYRIC (MTDH : activateur du facteur de transcription de NF-κB) ou IQGAPI (protéine ubiquitaire de la structure cellulaire impliquée dans de nombreuses cascades de signalisation) ne sont pas décrites comme partenaires de NS1 en cellules humaines mais sont impliquées dans les processus de réponse anti-virale ou antibactérienne (Gladue et al., 2011; Leung et al., 2006; Noch and Khalili, 2013). Il faut en outre ajouter que les cellules de poulet ne possèdent pas la protéine RIG-I, acteur essentiel de la réponse antivirale et partenaire important de NS1 en cellules humaines (Pichlmair et al., 2006). Les protéines aviaires impliquées dans la réponse anti-virale sont donc des cibles privilégiées pour la compréhension de l'adaptation à l'espèce des VIA.

Outre l'analyse des autres interactions possibles avec NS1 dans un contexte aviaire, les perspectives à plus long terme de ce projet sont également de caractériser ces interactions du point de vue du virus lui-même. Le criblage d'une banque de virus aviaires et humains est ainsi une piste à explorer pour caractériser les interactions entre NS1 et ses partenaires cellulaires. En effet, il est probable que certains partenaires cellulaires de NS1 soient conservés mais que d'autres varient d'un virus à l'autre. Ce criblage permettrait de mettre en évidence des séquences de NS1 communes aux virus pour lesquels les interactions sont maintenues. La réalisation de mutants de NS1 par mutagénèse dirigée au niveau de ces séquences permettrait alors de déterminer le site d'interaction entre NS1 et sa (ses) protéine(s) partenaire(s). L'analyse des interactions serait alors à nouveau réalisée sur les CDF1 (Wt ou lignées) infectées par un virus recombinant (la NS1 sauvage étant ici remplacée par sa version mutée par génétique inverse).

En conclusion, les résultats obtenus, quoique préliminaires, ouvrent de nombreuses perspectives. L'émergence d'un nouveau VIA pandémique demeure un sujet de préoccupation important en terme de santé publique et économique. Etablir une cartographie des partenaires de NS1 en cellules aviaires et l'identification de marqueurs moléculaires de franchissement de la barrière de l'espèce des nouvelles souches de VIA émergentes pourrait permettre d'orienter la veille sanitaire sur des souches plus « à risque pandémique », éventuellement de vérifier que les médicaments actuellement disponibles seraient efficaces contre ces souches, et surtout de gagner un temps précieux en cas d'émergence d'une pandémie.

BIBLIOGRAPHIE

Abed, Y., Hardy, I., Li, Y., and Boivin, G. (2002). Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A:H3N2 viruses isolated in Canada. J. Med. Virol. *67*, 589–595.

Alexander, D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. 11.

Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J., and Nieto, A. (2000). Eukaryotic Translation Initiation Factor 4GI Is a Cellular Target for NS1 Protein, a Translational Activator of Influenza Virus. Molecular and Cellular Biology *20*, 6259–6268.

Ayllon, J., Hale, B.G., and Garcia-Sastre, A. (2012). Strain-Specific Contribution of NS1-Activated Phosphoinositide 3-Kinase Signaling to Influenza A Virus Replication and Virulence. Journal of Virology *86*, 5366–5370.

Blancou, J. (2000). Histoire de la surveillance et du contrôle des maladies animales transmissibles (Paris: Office International des Épizooties).

Bornholdt, Z.A., and Prasad, B.V.V. (2006). X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. Nature Structural & Molecular Biology *13*, 559–560.

Brown, I.H. (2010). Summary of Avian Influenza Activity in Europe, Asia, and Africa, 2006-2009. Avian Diseases 54, 187–193.

Bui, C., Bethmont, A., Chughtai, A.A., Gardner, L., Sarkar, S., Hassan, S., Seale, H., and MacIntyre, C.R. (2016). A Systematic Review of the Comparative Epidemiology of Avian and Human Influenza A H5N1 and H7N9 – Lessons and Unanswered Questions. Transboundary and Emerging Diseases *63*, 602–620.

Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J., and Nieto, A. (2003). PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. Journal of General Virology *84*, 3263–3274.

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D.V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. Nature *383*, 443–446.

Carrat, F., and Flahault, A. (2007). Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. Vaccine *25*, 6852–6862.

Castellan, D.M., Hinrichs, J., Fusheng, G., Sawitri, E., Dung, D.H., Martin, V., McGrane, J., Bandyopadhayay, S., Inui, K., Yamage, M., et al. (2014). Development and Application of a Vaccination Planning Tool for Avian Influenza. Avian Diseases *58*, 437–452.

Chen, R., and Holmes, E.C. (2006). Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. Mol. Biol. Evol. *23*, 2336–2341.

Chen, L.-M., Blixt, O., Stevens, J., Lipatov, A.S., Davis, C.T., Collins, B.E., Cox, N.J., Paulson, J.C., and Donis, R.O. (2012). In vitro evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity. Virology *422*, 105–113.

Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., et al. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nature Medicine *7*, 1306–1312.

Chen, Z., Li, Y., and Krug, R.M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3J-end processing machinery. 11.

Cheung, T.K.W., and Poon, L.L.M. (2007). Biology of Influenza A Virus. Annals of the New York Academy of Sciences *1102*, 1–25.

Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R., and Paulson, J.C. (1994). Receptor Specificity in Human, Avian, and Equine H2 and H3 Influenza Virus Isolates. Virology *205*, 17–23.

Darapaneni, V., Prabhaker, V.K., and Kukol, A. (2009). Large-scale analysis of influenza A virus sequences reveals potential drug target sites of non-structural proteins. Journal of General Virology *90*, 2124–2133.

Delmas, L. (1896). Revue des Deux Mondes tome 133, 1896. 35.

Dugan, V.G., Chen, R., Spiro, D.J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., Ghedin, E., Nolting, J., Swayne, D.E., Runstadler, J.A., Happ, G.M., et al. (2008). The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. PLoS Pathogens *4*, e1000076.

Falcon, A.M., Fortes, P., Marion, R.M., Beloso, A., and Ortin, J. (1999). Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. Nucleic Acids Research *27*, 2241–2247.

Figueroa, T., Boumart, I., Coupeau, D., and Rasschaert, D. (2016). Hyperediting by ADAR1 of a new herpesvirus lncRNA during the lytic phase of the oncogenic Marek's disease virus. Journal of General Virology *97*, 2973–2988.

Gladue, D.P., Holinka, L.G., Fernandez-Sainz, I.J., Prarat, M.V., O'Donnell, V., Vepkhvadze, N.G., Lu, Z., Risatti, G.R., and Borca, M.V. (2011). Interaction between Core protein of classical swine fever virus with cellular IQGAP1 protein appears essential for virulence in swine. Virology *412*, 68–74.

Grund, C., Abdelwhab, E.-S.M., Arafa, A.-S., Ziller, M., Hassan, M.K., Aly, M.M., Hafez, H.M., Harder, T.C., and Beer, M. (2011). Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 from Egypt escapes vaccine-induced immunity but confers clinical protection against a heterologous clade 2.2.1 Egyptian isolate. Vaccine *29*, 5567–5573.

Hale, B.G., Jackson, D., Chen, Y.-H., Lamb, R.A., and Randall, R.E. (2006). Influenza A virus NS1 protein binds p85th and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. 6.

Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J., and Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. Journal of General Virology *89*, 2359–2376.

Hale, B.G., Kerry, P.S., Jackson, D., Precious, B.L., Gray, A., Killip, M.J., Randall, R.E., and Russell, R.J. (2009). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase activation by the influenza A virus NS1 protein. 6.

Hause, B.M., Collin, E.A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., Wang, D., Nelson, E.A., and Li, F. (2014). Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. MBio *5*.

Herfst, S., Schrauwen, E.J.A., Linster, M., Chutinimitkul, S., Wit, E. de, Munster, V.J., Sorrell, E.M., Bestebroer, T.M., Burke, D.F., Smith, D.J., et al. (2012). Airborne Transmission of Influenza A/H5N1 Virus Between Ferrets. Science *336*, 1534–1541.

Herz, C., Stavnezer, E., Krug, R.M., and Gurney, T. (1981). Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. Cell *26*, 391–400.

Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. Nature Reviews Microbiology *3*, 591–600.

Hutchinson, E.C., Charles, P.D., Hester, S.S., Thomas, B., Trudgian, D., Martínez-Alonso, M., and Fodor, E. (2014). Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. Nature Communications *5*.

Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S.C., Ozawa, M., Shinya, K., Zhong, G., Hanson, A., Katsura, H., Watanabe, S., et al. (2012). Experimental adaptation of an influenza H5 haemagglutinin (HA) confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. Nature *486*, 420–428.

Ito, T., Okazaki, K., Kawaoka, Y., Takada, A., Webster, R.G., and Kida, H. (1995). Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. Archives of Virology *140*, 1163–1172.

Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.-A., Wills, N.M., Xiao, Y.-L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., et al. (2012). An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. Science *337*, 199–204.

Joseph, U., Su, Y.C.F., Vijaykrishna, D., and Smith, G.J.D. (2017). The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. Influenza and Other Respiratory Viruses *11*, 74–84.

Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). Fields Virology.

Krauss, S., Walker, D., Pryor, S.P., Niles, L., Chenghong, L., Hinshaw, V.S., and Webster, D.R.G. (2004). Influenza A Viruses of Migrating Wild Aquatic Birds in North America. 13.

Kuo, R.-L., and Krug, R.M. (2009). Influenza a virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells. J. Virol. *83*, 1611–1616.

Kuo, R.-L., Li, Z.-H., Li, L.-H., Lee, K.-M., Tam, E.-H., Liu, H.M., Liu, H.-P., Shih, S.-R., and Wu, C.-C. (2016). Interactome Analysis of the NS1 Protein Encoded by Influenza A H1N1 Virus Reveals a Positive Regulatory Role of Host Protein PRP19 in Viral Replication. Journal of Proteome Research *15*, 1639–1648.

Kuo, R.-L., Chen, C.-J., Tam, E.-H., Huang, C.-G., Li, L.-H., Li, Z.-H., Su, P.-C., Liu, H.-P., and Wu, C.-C. (2018). Interactome Analysis of NS1 Protein Encoded by Influenza A H7N9 Virus Reveals an Inhibitory Role of NS1 in Host mRNA Maturation. Journal of Proteome Research *17*, 1474–1484.
Leung, J., Yueh, A., Appah, F.S.K., Yuan, B., de los Santos, K., and Goff, S.P. (2006). Interaction of Moloney murine leukemia virus matrix protein with IQGAP. The EMBO Journal *25*, 2155–2166.

Li, O.T.W., Chan, M.C.W., Leung, C.S.W., Chan, R.W.Y., Guan, Y., Nicholls, J.M., and Poon, L.L.M. (2009). Full Factorial Analysis of Mammalian and Avian Influenza Polymerase Subunits Suggests a Role of an Efficient Polymerase for Virus Adaptation. PLoS ONE *4*, e5658.

Lin, L., Li, Y., Pyo, H.-M., Lu, X., Raman, S.N.T., Liu, Q., Brown, E.G., and Zhou, Y. (2012). Identification of RNA Helicase A as a Cellular Factor That Interacts with Influenza A Virus NS1 Protein and Its Role in the Virus Life Cycle. J Virol *86*, 1942–1954.

Lion, A. (2017). Etude de la réponse immunitaire innée induite par les virus de la grippe aviaire dans les cellules épithéliales pulmonaires et les cellules endothéliales de poulets.

Liu, H., Golebiewski, L., Dow, E.C., Krug, R.M., Javier, R.T., and Rice, A.P. (2010). The ESEV PDZbinding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. J. Virol. *84*, 11164–11174.

Lupiani, B., and Reddy, S.M. (2009). The history of avian influenza. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases *32*, 311–323.

Ma, W., Kahn, R.E., and Richt, J.A. (2009). The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. Journal of Molecular and Genetic Medicine *03*.

Mänz, B., Schwemmle, M., and Brunotte, L. (2013). Adaptation of Avian Influenza A Virus Polymerase in Mammals To Overcome the Host Species Barrier. J Virol *87*, 7200–7209.

Marazzi, I., Ho, J.S.Y., Kim, J., Manicassamy, B., Dewell, S., Albrecht, R.A., Seibert, C.W., Schaefer, U., Jeffrey, K.L., Prinjha, R.K., et al. (2012). Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic. Nature *483*, 428–433.

Marc, D. (2012). NS1 des virus influenza : une protéine très « influente ». Virologie 16, 12.

Marcelin, G., Ducatez, M., Fabrizio, T., and Webby, R. (2011). Influenza Pandemic: An Overview. Pandemic Influenza Viruses: Science, Surveillance and Public Health. The Pennsylvania Academy of Science 11.

Marion, R.M., Aragon, T., Beloso, A., Nieto, A., and Ortin, J. (1997). The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. Nucleic Acids Research *25*, 4271–4277.

Martin, P.M.V., and Martin-Granel, E. (2006). 2,500-year Evolution of the Term Epidemic. Emerging Infectious Diseases *12*, 976–980.

Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M.R., Donatelli, I., and Kawaoka, Y. (2000). Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals. Journal of Virology *74*, 8502–8512.

Medina, R.A., and García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. Nature Reviews Microbiology *9*, 590–603.

Monne, I., Fusaro, A., Nelson, M.I., Bonfanti, L., Mulatti, P., Hughes, J., Murcia, P.R., Schivo, A., Valastro, V., Moreno, A., et al. (2014). Emergence of a highly pathogenic avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor. J. Virol. *88*, 4375–4388.

Munir, M., Zohari, S., Metreveli, G., Baule, C., Belak, S., and Berg, M. (2011). Alleles A and B of non-structural protein 1 of avian influenza A viruses differentially inhibit beta interferon production in human and mink lung cells. Journal of General Virology *92*, 2111–2121.

Munster, V.J., and Fouchier, R.A.M. (2009). Avian influenza virus: Of virus and bird ecology. Vaccine 27, 6340–6344.

Murayama, R., Harada, Y., Shibata, T., Kuroda, K., Hayakawa, S., Shimizu, K., and Tanaka, T. (2007). Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. Biochemical and Biophysical Research Communications *362*, 880–885.

Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Ainai, A., Hasegawa, H., et al. (2010). Short Communication The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection in Japan: Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination. Japanese Journal of Infectious Diseases *63*, 67–71.

Nazir, J., Haumacher, R., Ike, A.C., and Marschang, R.E. (2011). Persistence of Avian Influenza Viruses in Lake Sediment, Duck Feces, and Duck Meat. Applied and Environmental Microbiology 77, 4981–4985.

Nemeroff, M.E., Barabino, S.M.L., Li, Y., Keller, W., and Krug, R.M. (1998). Influenza Virus NS1 Protein Interacts with the Cellular 30 kDa Subunit of CPSF and Inhibits 3' End Formation of Cellular Pre-mRNAs. Molecular Cell *1*, 991–1000.

Nicholls, H. (2006). Pandemic Influenza: The Inside Story. PLoS Biology 4, e50.

Nicholls, J.M., Chan, M.C.W., Chan, W.Y., Wong, H.K., Cheung, C.Y., Kwong, D.L.W., Wong, M.P., Chui, W.H., Poon, L.L.M., Tsao, S.W., et al. (2007). Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. Nature Medicine *13*, 147–149.

Noch, E.K., and Khalili, K. (2013). The Role of AEG-1/MTDH/LYRIC in the Pathogenesis of Central Nervous System Disease. In Advances in Cancer Research, (Elsevier), pp. 159–192.

Nourry, C., Grant, S.G.N., and Borg, J.-P. (2003). PDZ Domain Proteins: Plug and Play! Science Signaling *2003*, re7–re7.

Obenauer, J.C. (2006). Large-Scale Sequence Analysis of Avian Influenza Isolates. Science *311*, 1576–1580.

Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A.D.M.E., and Fouchier, R.A.M. (2006). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. Science *312*, 384–388.

Palese, P. (1977). The genes of influenza virus. Cell 10, 1–10.

Pantin-Jackwook, M.J., and Swayne, D.E. (2009). Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds: -EN- Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds -FR- Pathogénie et pathobiologie de l'infection des oiseaux par le virus de l'influenza aviaire -ES- Patogénesis y patobiología de la infeccíon por virus de la influenza aviar en las aves. Revue Scientifique et Technique de l'OIE *28*, 113–136.

Paris, C., Pentland, I., Groves, I., Roberts, D.C., Powis, S.J., Coleman, N., Roberts, S., and Parish, J.L. (2015). CCCTC-Binding Factor Recruitment to the Early Region of the Human Papillomavirus 18 Genome Regulates Viral Oncogene Expression. Journal of Virology *89*, 4770–4785.

Parvin, J.D., Moscona, A., Pan, W.T., Leider, J.M., and PALESEI, P. Measurement of the Mutation Rates of Animal Viruses: Influenza A Virus and Poliovirus Type. J. VIROL. 7.

Pentland, I., and Parish, J. (2015). Targeting CTCF to Control Virus Gene Expression: A Common Theme amongst Diverse DNA Viruses. Viruses 7, 3574–3585.

Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates. Science *314*, 997–1001.

Qin, S., Liu, Y., Tempel, W., Eram, M.S., Bian, C., Liu, K., Senisterra, G., Crombet, L., Vedadi, M., and Min, J. (2014). Structural basis for histone mimicry and hijacking of host proteins by influenza virus protein NS1. Nature Communications *5*.

Qiu, Y., Nemeroff, M., and Krug, R.M. (1995). The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. RNA *1*, 304–316.

Reed, L.J., and Muench, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS I'2. 5.

Robb, N.C., Chase, G., Bier, K., Vreede, F.T., Shaw, P.-C., Naffakh, N., Schwemmle, M., and Fodor, E. (2011). The Influenza A Virus NS1 Protein Interacts with the Nucleoprotein of Viral Ribonucleoprotein Complexes. Journal of Virology *85*, 5228–5231.

Rossman, J.S., and Lamb, R.A. (2011). Influenza Virus Assembly and Budding. Virology 411, 229–236.

Russell, R.J., Kerry, P.S., Stevens, D.J., Steinhauer, D.A., Martin, S.R., Gamblin, S.J., and Skehel, J.J. (2008). Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 17736–17741.

Samji, T. (2009). Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. Yale J Biol Med 82, 153–159.

Satterly, N., Tsai, P.-L., van Deursen, J., Nussenzveig, D.R., Wang, Y., Faria, P.A., Levay, A., Levy, D.E., and Fontoura, B.M.A. (2007). Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. Proceedings of the National Academy of Sciences *104*, 1853–1858.

Schlingemann, J., Leijon, M., Yacoub, A., Schlingemann, H., Zohari, S., Matyi-Tóth, A., Kiss, I., Holmquist, G., Nordengrahn, A., Landegren, U., et al. (2010). Novel means of viral antigen identification: Improved detection of avian influenza viruses by proximity ligation. Journal of Virological Methods *163*, 116–122.

Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J.C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F.S., Michallet, M.-C., Besch, R., Hopfner, K.-P., et al. (2009). 5'-triphosphate RNA requires basepaired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 12067–12072.

Shaw, M.L., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Gulcicek, E.E., and Palese, P. (2008). Cellular Proteins in Influenza Virus Particles. PLoS Pathogens *4*, e1000085.

Shin, Y.-K., Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A., and Zhou, Y. (2007). Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. Journal of General Virology *88*, 13–18.

Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N., and Kawaoka, Y. (2006). Influenza virus receptors in the human airway: Avian flu. Nature *440*, 435–436.

Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghwani, J., Bhatt, S., et al. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature *459*, 1122–1125.

Smith, J.L., Grey, F.E., Uhrlaub, J.L., Nikolich-Zugich, J., and Hirsch, A.J. (2012). Induction of the Cellular MicroRNA, Hs_154, by West Nile Virus Contributes to Virus-Mediated Apoptosis through Repression of Antiapoptotic Factors. Journal of Virology *86*, 5278–5287.

Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nature Methods *3*, 995–1000.

Soubies, S.M., Volmer, C., Croville, G., Loupias, J., Peralta, B., Costes, P., Lacroux, C., Guerin, J.-L., and Volmer, R. (2010a). Species-Specific Contribution of the Four C-Terminal Amino Acids of Influenza A Virus NS1 Protein to Virulence. Journal of Virology *84*, 6733–6747.

Soubies, S.M., Volmer, C., Guérin, J.-L., and Volmer, R. (2010b). Truncation of the NS1 protein converts a low pathogenic avian influenza virus into a strong interferon inducer in duck cells. Avian Dis. *54*, 527–531.

Steel, J., Lowen, A.C., Mubareka, S., and Palese, P. (2009). Transmission of Influenza Virus in a Mammalian Host Is Increased by PB2 Amino Acids 627K or 627E/701N. PLoS Pathogens *5*, e1000252.

Subbarao, E.K., London, W., and Murphy, B.R. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. J. Virol. *67*, 1761–1764.

Taubenberger, J.K., and Morens, D.M. (2006). 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. Emerging Infectious Diseases *12*, 8.

Taubenberger, J.K., and Morens, D.M. (2010). Influenza: The Once and Future Pandemic. Public Health Reports *125*, 15–26.

Taubenberger, J.K., Baltimore, D., Doherty, P.C., Markel, H., Morens, D.M., Webster, R.G., and Wilson, I.A. (2012). Reconstruction of the 1918 Influenza Virus: Unexpected Rewards from the Past. MBio *3*, e00201-12-e00201-12.

Tawaratsumida, K., Phan, V., Hrincius, E.R., High, A.A., Webby, R., Redecke, V., and Hacker, H. (2014). Quantitative Proteomic Analysis of the Influenza A Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 during Natural Cell Infection Identifies PACT as an NS1 Target Protein and Antiviral Host Factor. Journal of Virology *88*, 9038–9048.

Tong, S., Li, Y., Rivailler, P., Conrardy, C., Castillo, D.A.A., Chen, L.-M., Recuenco, S., Ellison, J.A., Davis, C.T., York, I.A., et al. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. Proceedings of the National Academy of Sciences *109*, 4269–4274.

Treanor, J.J., Snyder, M.H., London, W.T., and Murphy, B.R. (1989). The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza a virus for squirrel monkeys. Virology 171, 1–9.

Turnbull, M.L., Wise, H.M., Nicol, M.Q., Smith, N., Dunfee, R.L., Beard, P.M., Jagger, B.W., Ligertwood, Y., Hardisty, G.R., Xiao, H., et al. (2016). Role of the B Allele of Influenza A Virus Segment 8 in Setting Mammalian Host Range and Pathogenicity. J Virol *90*, 9263–9284.

Ungchusak, K., Kitphati, R., Boonnak, K., Pittayawonganon, C., Thawatsupha, P., and Simmerman, J.M. (2005). Probable Person-to-Person Transmission of Avian Influenza A (H5N1). The New England Journal of Medicine 8.

Vey, M., Orlich, M., Adler, S., Klenk, H.-D., Rott, R., and Garten, W. (1992). Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. Virology *188*, 408–413.

Volmer, R., Mazel-Sanchez, B., Volmer, C., Soubies, S.M., and Guérin, J.-L. (2010). Nucleolar localization of influenza A NS1: striking differences between mammalian and avian cells. Virology Journal 7, 63.

Wan, X.-F., Dong, L., Lan, Y., Long, L.-P., Xu, C., Zou, S., Li, Z., Wen, L., Cai, Z., Wang, W., et al. (2011). Indications that Live Poultry Markets Are a Major Source of Human H5N1 Influenza Virus Infection in China. Journal of Virology *85*, 13432–13438.

Wang, H., Feng, Z., Shu, Y., Yu, H., Zhou, L., Zu, R., Huai, Y., Dong, J., Wen, L., Wang, H., et al. (2008). Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *371*, 8.

Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Suzuki, Y., and Ikuta, K. (2012). The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). Trends in Microbiology *20*, 11–20.

Wensman, J.J., Leuchowius, K., Yan, J., Berg, A., Bode, L., Ludwig, H., Belák, S., Landegren, U., and Söderberg (2016). Visualization of Borna Disease Virus Protein Interactions with Host Proteins using in situ Proximity Ligation Assay. British Journal of Virology *3*, 11–23.

Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., and Gao, G.F. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. Trends in Microbiology *22*, 183–191.

Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., and Ishihama, A. (1993). Molecular Assembly of Influenza Virus: Association of the NS2 Protein with Virion Matrix. Virology *196*, 249–255.

Ylösmäki, L., Schmotz, C., Ylösmäki, E., and Saksela, K. (2015). Reorganization of the host cell Crk(L)–PI3 kinase signaling complex by the influenza A virus NS1 protein. Virology *484*, 146–152.

Ylösmäki, L., Fagerlund, R., Kuisma, I., Julkunen, I., and Saksela, K. (2016a). Nuclear Translocation of Crk Adaptor Proteins by the Influenza A Virus NS1 Protein. Viruses *8*, 101.

Ylösmäki, L., Fagerlund, R., Kuisma, I., Julkunen, I., and Saksela, K. (2016b). Nuclear Translocation of Crk Adaptor Proteins by the Influenza A Virus NS1 Protein. Viruses *8*, 101.

Zhang, B., Zhang, Y., Zou, X., Chan, A.W., Zhang, R., Lee, T.K.-W., Liu, H., Lau, E.Y.-T., Ho, N.P.-Y., Lai, P.B., et al. (2017). The CCCTC-binding factor (CTCF)-forkhead box protein M1 axis regulates tumour growth and metastasis in hepatocellular carcinoma: CTCF regulates growth and metastasis of hepatocellular carcinoma. The Journal of Pathology *243*, 418–430.

Zielecki, F., Semmler, I., Kalthoff, D., Voss, D., Mauel, S., Gruber, A.D., Beer, M., and Wolff, T. (2010). Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. J. Virol. *84*, 10708–10718.



Annexe 1 : Liste brute des 381 protéines identifiées en spectrométrie de masse

Accession	Description	protein_set_sc	o abundance_NF1	1 abundance_NF2	abundance_NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	e raw_abundance	raw_abundance
F1NAC8_CHICK	tr F1NAC8 F1NAC8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SNRPA1 PE=4 SV=1 ;	200,597	3,72E+04	8,52E+04	9,10E+04	1,45E+05	5,70E+05	6,98E+05	3,72E+04	2,80E+05	8,53E+04	1,19E+06	9,92E+05	8,04E+05
F1NBN0_CHICK	tr F1NBN0 F1NBN0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=2 ; UniProtKB -	318,875	6,50E+04	5,98E+04	1,38E+05	1,03E+05	6,40E+05	5,24E+05	6,50E+04	1,97E+05	1,30E+05	8,49E+05	1,11E+06	6,04E+05
E1C6A9_CHICK	Tr E1C6A9 E1C6A9_E1C6A9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=CDC5L PE=4 SV=2 ; cell	412,03	3,39E+04	9,05E+04	2,04E+05	1,35E+05	8,35E+05	6,18E+05	3,39E+04	2,98E+05	1,91E+05	1,11E+06	1,45E+06	7,13E+05
F2Z4K6_CHICK	tr F224K6 F224K6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL26L1 PE=3 SV=1 ;	332,254	1,21E+06	2,35E+06	4,90E+06	1,83E+06	8,26E+06	9,67E+06	1,21E+06	7,75E+06	4,60E+06	1,51E+07	1,44E+07	1,12E+07
E1C8F7_CHICK	bus mousting protein L26 tr E1C8F7 E1C8F7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL24 PE=4 SV=2 ; it is used to 124	250,64	1,89E+06	4,11E+06	7,54E+06	2,75E+06	1,30E+07	1,69E+07	1,89E+06	1,35E+07	7,07E+06	2,26E+07	2,25E+07	1,94E+07
E1BTS4_CHICK	Trioosomai protein L24 tr [E1BTS4]E1BTS4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=BCAS2 PE=4 SV=2 ; pre-	136,45	2,16E+04	1,07E+05	1,93E+05	1,25E+05	5,02E+05	4,88E+05	2,16E+04	3,51E+05	1,81E+05	1,03E+06	8,73E+05	5,62E+05
Q5F346_CHICK	tr Q5F346 [Q5F346_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_34p20 PE=2	224,484	1,47E+06	2,04E+06	3,77E+06	1,79E+06	7,31E+06	7,92E+06	1,47E+06	6,72E+06	3,53E+06	1,48E+07	1,27E+07	9,14E+06
PRP19_CHICK	SV=1 ffff sp[Q5ZMA2 PRP19_CHICK Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Gallus gallus GN=PRPF19 PE=1	201,643	1,29E+05	1,43E+05	5,29E+05	2,91E+05	1,30E+06	9,08E+05	1,29E+05	4,69E+05	4,96E+05	2,40E+06	2,25E+06	1,05E+06
Q98TH5_CHICK	SV=1 tr Q98TH5 Q98TH5_CHICK Ribosomal protein S11 OS=Gallus gallus GN=cRPS11 PE=3 SV=1	297,173	2,81E+06	4,06E+06	7,53E+06	4,30E+06	1,72E+07	1,60E+07	2,81E+06	1,33E+07	7,07E+06	3,54E+07	2,99E+07	1,85E+07
E1C0J4 CHICK	tr E1C0J4 E1C0J4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=UPF1 PE=4 SV=2 ; UPF1,	443,533	7,00E+05	3,97E+05	1,30E+06	6,69E+04	7,98E+04	1,56E+05	7,00E+05	1,31E+06	1,22E+06	5,50E+05	1,39E+05	1,80E+05
F1NYC0 CHICK	RNA helicase and ATPase tr F1NYC0 F1NYC0 CHICK 60S ribosomal protein L35 OS=Gallus gallus GN=RPL35 PE=3 SV=2	152,688	1,93E+06	3,63E+06	4,93E+06	2,59E+06	9,36E+06	1,24E+07	1,93E+06	1,19E+07	4,63E+06	2,13E+07	1,63E+07	1,43E+07
о52нм7 сніск	tr Q5ZHN7 Q5ZHN7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_35b4 PE=2	105,744	3,94E+04	1,02E+05	1,58E+05	8,50E+04	3,41E+05	3,26E+05	3,94E+04	3,36E+05	1,48E+05	7,00E+05	5,93E+05	3,76E+05
	SV=1; ???? tr F1NME1 F1NME1 CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HIST1H111R PE=3												-	
F1NME1_CHICK	SV=1 sp[P08287]H11L_CHICK Histone H1.11L OS=Gallus gallus PE=1 SV=2 sp[P08284]H101_CHICK Histone H1.01 OS=Gallus gallus PE=1 SV=2 sp[P08288]H11R_CHICK Histone H1.11R OS=Gallus gallus PE=3 SV=2	329,137	1,03E+06	1,74E+06	2,73E+06	4,04E+06	8,54E+06	1,31E+07	1,03E+06	5,73E+06	2,56E+06	3,33E+07	1,49E+07	1,51E+07
	sp P08286 H110_CHICK Histone H1.10 OS=Gallus gallus PE=1 SV=3													
F1NF89_CHICK	tr F1NF89 F1NF89_CHICK 40S ribosomal protein S24 OS=Gallus gallus GN=RPS24 PE=3 SV=2	279,202	1,53E+06	1,41E+06	3,17E+06	1,60E+06	4,81E+06	5,55E+06	1,53E+06	4,66E+06	2,97E+06	1,31E+07	8,36E+06	6,40E+06
E1BVB1_CHICK	tr E1BVB1 E1BVB1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL32 PE=4 SV=2	263,11	2,56E+05	4,84E+05	1,11E+06	6,39E+05	1,62E+06	2,24E+06	2,56E+05	1,59E+06	1,04E+06	5,26E+06	2,81E+06	2,58E+06
Q5XNV3_CHICK	tr [QSXNV3]QSXNV3_CHICK Cytoplasmic activation-proliferation-associated protein 1 US=Gallus gallus GN=CAPRIN1 PE=2 SV=1	710,532	3,49E+06	4,86E+06	8,57E+06	5,29E+06	1,55E+07	1,75E+07	3,49E+06	1,60E+07	8,04E+06	4,36E+07	2,70E+07	2,01E+07
F1NPD3_CHICK	tr F1NPD3 F1NPD3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL18A PE=3 SV=2	231,262	9,97E+05	8,21E+05	4,32E+05	1,10E+06	2,86E+06	3,31E+06	9,97E+05	2,70E+06	4,05E+05	9,05E+06	4,98E+06	3,82E+06
F1NIX0_CHICK	tr F1NIX0 F1NIX0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL8 PE=3 SV=2	419,791	2,57E+06	3,46E+06	5,30E+06	2,49E+06	9,50E+06	9,84E+06	2,57E+06	1,14E+07	4,97E+06	2,05E+07	1,65E+07	1,14E+07
R4GIQ2_CHICK	tr R4GIQ2 R4GIQ2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL21 PE=4 SV=1	414,135	4,58E+05	1,82E+06	3,86E+06	8,21E+05	6,56E+06	7,34E+06	4,58E+05	5,99E+06	3,62E+06	6,76E+06	1,14E+07	8,47E+06
E1BS06_CHICK	tr E1BS06 E1BS06_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL23A PE=3 SV=2	374,544	2,04E+06	4,27E+06	6,46E+06	5,51E+06	1,39E+07	1,72E+07	2,04E+06	1,41E+07	6,06E+06	4,53E+07	2,42E+07	1,98E+07
Q5ZMN1_CHICK	tr Q5ZMN1 Q5ZMN1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=G3BP1 PE=2 SV=1	971,177	2,85E+06	3,14E+06	7,20E+06	3,95E+06	1,14E+07	1,19E+07	2,85E+06	1,03E+07	6,75E+06	3,25E+07	1,97E+07	1,37E+07
RS12_CHICK	sp P84175 RS12_CHICK 40S ribosomal protein S12 OS=Gallus gallus GN=RPS12 PE=1 SV=2	279,298	7,08E+05	2,80E+06	2,22E+06	2,02E+06	7,27E+06	7,90E+06	7,08E+05	9,21E+06	2,09E+06	1,67E+07	1,26E+07	9,11E+06
Q5ZM66_CHICK	tr Q5ZM66 Q5ZM66_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_2p17 PE=2 SV=1	87,684	7,05E+05	1,40E+06	1,88E+06	1,14E+06	4,18E+06	3,84E+06	7,05E+05	4,62E+06	1,76E+06	9,39E+06	7,27E+06	4,43E+06
F1NU56_CHICK	tr F1NU56 F1NU56_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS25 PE=4 SV=2	205,019	2,14E+06	5,03E+06	6,28E+06	3,20E+06	1,27E+07	1,38E+07	2,14E+06	1,65E+07	5,89E+06	2,63E+07	2,21E+07	1,59E+07
E1BZR1_CHICK	tr E1BZR1 E1BZR1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HNRNPR PE=4 SV=2	453,409	6,97E+05	1,08E+06	1,44E+06	1,30E+06	4,80E+06	2,96E+06	6,97E+05	3,54E+06	1,35E+06	1,07E+07	8,35E+06	3,41E+06
F1NZU2_CHICK	tr F1NZU2 F1NZU2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SYNCRIP PE=4 SV=2	540,855	1,34E+06	2,04E+06	2,51E+06	2,57E+06	9,40E+06	5,63E+06	1,34E+06	6,72E+06	2,35E+06	2,11E+07	1,63E+07	6,50E+06
F1NLK0_CHICK	tr F1NLK0 F1NLK0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=GNL3 PE=4 SV=2	194,532			2,03E+04		1,30E+05	2,77E+05	1,44E+04	4,38E+04	1,91E+04	6,10E+04	2,26E+05	3,19E+05
Е1С769_СНІСК	tr E1C769 E1C769_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.48669 PE=4 SV=2	548,503	5,76E+05	1,80E+06	3,31E+06	1,50E+06	5,54E+06	4,66E+06	5,76E+05	5,93E+06	3,10E+06	1,24E+07	9,64E+06	5,37E+06
F1NDC2_CHICK	tr F1NDC2 F1NDC2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS23 PE=3 SV=2	236,501	1,02E+06	1,81E+06	1,69E+06	1,02E+06	3,74E+06	5,00E+06	1,02E+06	5,96E+06	1,58E+06	8,37E+06	6,50E+06	5,77E+06
F1N8H6_CHICK	tr F1N8H6 F1N8H6_CHICK Heterochromatin protein 1-binding protein 3 OS=Gallus gallus GN=HP1BP3 PE=4 SV=1	290,678	2,55E+05	2,01E+05	3,83E+05	4,32E+05	7,13E+05	1,34E+06	2,55E+05	6,63E+05	3,59E+05	3,55E+06	1,24E+06	1,55E+06
F6R1X6_CHICK	tr F6R1X6 F6R1X6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SSB PE=4 SV=1	455,617	2,26E+05	5,47E+05	4,64E+05	8,75E+05	2,38E+06	1,74E+06	2,26E+05	1,80E+06	4,35E+05	7,20E+06	4,14E+06	2,01E+06
F1NB02_CHICK	tr F1NB02 F1NB02_CHICK 40S ribosomal protein S8 OS=Gallus gallus GN=RPS8 PE=3 SV=2	434,406	2,94E+06	1,90E+06	3,20E+06	2,98E+06	6,92E+06	7,74E+06	2,94E+06	6,25E+06	3,00E+06	2,46E+07	1,20E+07	8,93E+06
Q5ZHW8_CHICK	tr Q5ZHW8 Q5ZHW8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS14 PE=2 SV=1	356,574	3,52E+06	3,66E+06	5,11E+06	3,30E+06	1,11E+07	9,27E+06	3,52E+06	1,21E+07	4,79E+06	2,72E+07	1,93E+07	1,07E+07
F2Z4K7_CHICK	tr F2Z4K7 F2Z4K7_CHICK 40S ribosomal protein S3a OS=Gallus gallus GN=RPS3A PE=3 SV=1	1190,041	4,71E+06	1,63E+07	1,54E+07	9,83E+06	4,22E+07	3,68E+07	4,71E+06	5,35E+07	1,44E+07	8,09E+07	7,34E+07	4,24E+07
F1NPT1_CHICK	tr F1NPT1 F1NPT1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TOP1 PE=4 SV=1	473,268	5,82E+05	4,23E+05	5,67E+05	7,77E+05	1,90E+06	1,55E+06	5,82E+05	1,39E+06	5,32E+05	6,39E+06	3,31E+06	1,79E+06

Accession	Description	protein_set_sco	abundance_NF1	abundance_NF2	abundance_NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
E1BY89_CHICK	tr E1BY89 E1BY89_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL23 PE=3 SV=2	609,649	2,45E+06	4,68E+06	5,43E+06	2,22E+06	1,12E+07	1,15E+07	2,45E+06	1,54E+07	5,10E+06	1,83E+07	1,95E+07	1,33E+07
CO1A1_CHICK	sp P02457 C01A1_CHICK Collagen alpha-1(I) chain OS=Gallus gallus GN=COL1A1 PE=1 SV=3	202,146	4,03E+05	6,23E+04	1,11E+05	1,18E+04			4,03E+05	2,05E+05	1,04E+05	9,74E+04	1,39E+04	1,08E+04
E1BQF9_CHICK	tr E1BQF9 E1BQF9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=CSDE1 PE=4 SV=2	286,446	1,80E+05	2,09E+05	3,94E+05	2,41E+05	7,40E+05	5,44E+05	1,80E+05	6,88E+05	3,69E+05	1,99E+06	1,29E+06	6,27E+05
F7BYQ2_CHICK	tr F7BYQ2 F7BYQ2_CHICK 40S ribosomal protein S6 OS=Gallus gallus GN=RPS6 PE=4 SV=1	637,357	3,35E+06	3,14E+06	5,62E+06	5,37E+06	1,31E+07	1,08E+07	3,35E+06	1,03E+07	5,27E+06	4,42E+07	2,27E+07	1,25E+07
H2A4_CHICK	sp P02263 H2A4_CHICK Histone H2A-IV OS=Gallus gallus PE=1 SV=2	174,986	1,43E+06	4,64E+05	1,09E+06	9,05E+05	1,53E+06	2,88E+06	1,43E+06	1,53E+06	1,03E+06	7,45E+06	2,67E+06	3,33E+06
F1NS91_CHICK	tr F1NS91 F1NS91_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL9 PE=4 SV=2	489,478	2,60E+06	2,19E+06	3,77E+06	2,50E+06	6,46E+06	6,43E+06	2,60E+06	7,19E+06	3,53E+06	2,06E+07	1,12E+07	7,42E+06
RL10_CHICK	sp Q08200 RL10_CHICK 60S ribosomal protein L10 (Fragment) OS=Gallus gallus GN=RPL10 PE=2 SV=1	612,768	2,32E+06	4,51E+06	6,89E+06	1,71E+06	1,40E+07	1,35E+07	2,32E+06	1,48E+07	6,46E+06	1,41E+07	2,44E+07	1,56E+07
E1C4M0_CHICK	tr E1C4M0 E1C4M0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS2 PE=3 SV=1	898,273	6,38E+06	1,03E+07	1,34E+07	1,02E+07	3,01E+07	2,49E+07	6,38E+06	3,40E+07	1,26E+07	8,35E+07	5,22E+07	2,87E+07
F2Z4M7_CHICK	tr F2Z4M7 F2Z4M7_CHICK 60S ribosomal protein L37a OS=Gallus gallus GN=RPL37A PE=3 SV=1	204,569	3,52E+04	4,69E+05	7,40E+05	2,42E+05	8,72E+05	1,39E+06	3,52E+04	1,54E+06	6,94E+05	2,00E+06	1,52E+06	1,60E+06
F6R347_CHICK	tr F6R347 F6R347_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL14 PE=4 SV=1	248,607	2,47E+06	2,28E+06	4,41E+06	2,23E+06	5,64E+06	6,79E+06	2,47E+06	7,51E+06	4,13E+06	1,84E+07	9,81E+06	7,83E+06
Q5ZJZ2_CHICK	tr Q5ZJZ2 Q5ZJZ2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL3 PE=2 SV=1	528,902	2,52E+06	1,77E+06	1,11E+06	1,92E+06	4,79E+06	4,97E+06	2,52E+06	5,81E+06	1,04E+06	1,58E+07	8,32E+06	5,73E+06
RL13_CHICK	sp P41125 RL13_CHICK 60S ribosomal protein L13 OS=Gallus gallus GN=RPL13 PE=2 SV=2	352,171	4,19E+06	4,78E+06	7,22E+06	4,49E+06	1,15E+07	1,30E+07	4,19E+06	1,57E+07	6,77E+06	3,69E+07	2,00E+07	1,50E+07
RL30_CHICK	sp P67883 RL30_CHICK 60S ribosomal protein L30 OS=Gallus gallus GN=RPL30 PE=3 SV=2	349,941	1,40E+06	1,58E+06	3,27E+06	2,16E+06	5,10E+06	4,89E+06	1,40E+06	5,19E+06	3,07E+06	1,78E+07	8,87E+06	5,64E+06
Q5F481_CHICK	tr/Q5F481/Q5F481_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_2g2 PE=2 SV=1	161,809	2,09E+04	6,53E+04	1,36E+05	3,25E+04	1,09E+05	2,42E+05	2,09E+04	2,15E+05	1,28E+05	2,68E+05	1,90E+05	2,79E+05
F6RW83_CHICK	tr F6RW83 F6RW83_CHICK Ribosomal protein L19 OS=Gallus gallus GN=RPL19 PE=3 SV=1	300,818	2,11E+06	6,35E+06	8,65E+06	2,05E+06	2,05E+07	2,11E+07	2,11E+06	2,09E+07	8,11E+06	1,69E+07	3,56E+07	2,43E+07
F1NBX4_CHICK	tr F1NBX4 F1NBX4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL27A PE=3 SV=2	197,505	1,44E+06	7,01E+05	2,40E+06	1,99E+06	3,23E+06	4,41E+06	1,44E+06	2,31E+06	2,25E+06	1,64E+07	5,62E+06	5,08E+06
E1C6T8_CHICK	tr E1C678 E1C678_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Gallus gallus GN=EIF3I PE=3 SV=1	234,448	3,05E+04	2,75E+05	8,00E+05		2,20E+04	6,74E+04	3,05E+04	9,06E+05	7,50E+05	6,10E+04	3,82E+04	7,77E+04
E1C598_CHICK	tr E1C598 E1C598_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=MRPL48 PE=4 SV=2	142,159		1,06E+05	3,42E+04	1,05E+05	4,29E+05	1,24E+05	1,44E+04	3,47E+05	3,21E+04	8,60E+05	7,45E+05	1,43E+05
F1P4V6_CHICK	tr F1P4V6 F1P4V6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL31 PE=4 SV=2	169,68	3,33E+06	6,30E+06	7,96E+06	3,09E+06	1,12E+07	1,53E+07	3,33E+06	2,07E+07	7,47E+06	2,55E+07	1,95E+07	1,76E+07
ІЗVQH4_СНІСК	tr I3VQH4 I3VQH4_CHICK Interleukin enhancer binding factor 3-like protein OS=Gallus gallus GN=ILF3 PE=2 SV=1	492,845	2,61E+05	2,39E+05	4,12E+05	6,47E+05	1,35E+06	7,64E+05	2,61E+05	7,86E+05	3,87E+05	5,32E+06	2,35E+06	8,81E+05
F1NG53_CHICK	tr F1NG53 F1NG53_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL17 PE=3 SV=2	380,848	2,43E+06	6,94E+06	7,34E+06	3,58E+06	1,50E+07	1,37E+07	2,43E+06	2,28E+07	6,88E+06	2,94E+07	2,60E+07	1,58E+07
F1N9J4_CHICK	tr F1N9J4 F1N9J4_CHICK 60S ribosomal protein L22 OS=Gallus gallus GN=RPL22 PE=4 SV=1	287,953	2,00E+06	2,46E+06	3,54E+06	2,59E+06	5,60E+06	6,22E+06	2,00E+06	8,09E+06	3,32E+06	2,14E+07	9,73E+06	7,18E+06
F1NN16_CHICK	tr F1NN16 F1NN16_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS7 PE=4 SV=2	572,057	4,72E+06	2,98E+06	6,47E+06	3,66E+06	8,72E+06	7,56E+06	4,72E+06	9,81E+06	6,07E+06	3,01E+07	1,52E+07	8,72E+06
F1NYL7_CHICK	tr F1NYL7 F1NYL7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TCEB3 PE=4 SV=2	347,381	6,82E+05	2,81E+06	3,69E+06	9,03E+05	6,76E+06	7,52E+06	6,82E+05	9,25E+06	3,46E+06	7,43E+06	1,18E+07	8,67E+06
F1NSP8_CHICK	tr F1NSP8 F1NSP8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HNRNPU PE=4 SV=2	303,105	4,79E+05	4,05E+05	6,56E+05	1,48E+06	2,19E+06	1,93E+06	4,79E+05	1,33E+06	6,15E+05	1,22E+07	3,82E+06	2,23E+06
STRAP_CHICK	splQ5ZL33 STRAP_CHICK Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Gallus gallus GN=STRAP PE=2 SV=2	223,542	3,39E+04	1,53E+05	1,96E+05	2,26E+05	5,91E+05	2,25E+05	3,39E+04	5,02E+05	1,84E+05	1,86E+06	1,03E+06	2,59E+05
R4GGJ0_CHICK	tr R4GGJ0 R4GGJ0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS16 PE=3 SV=1	305,833	3,95E+06	7,89E+06	9,34E+06	5,96E+06	1,61E+07	1,55E+07	3,95E+06	2,60E+07	8,76E+06	4,91E+07	2,80E+07	1,79E+07
нэкzт7_сніск	tr H9KZT7 H9KZT7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ILF2 PE=4 SV=1	175,384	3,71E+04	2,16E+05	2,94E+05	2,16E+05	5,52E+05	3,84E+05	3,71E+04	7,12E+05	2,76E+05	1,78E+06	9,60E+05	4,43E+05
F1NPA9_CHICK	tr F1NPA9 F1NPA9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS3 PE=3 SV=2	526,839	3,44E+06	1,21E+06	3,06E+06	3,70E+06	5,59E+06	5,94E+06	3,44E+06	3,99E+06	2,87E+06	3,05E+07	9,72E+06	6,85E+06
Q5ZII1_CHICK	tr Q5ZII1 Q5ZII1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL4 PE=2 SV=1	699,538	3,92E+06	3,57E+06	3,05E+06	6,46E+06	1,05E+07	1,02E+07	3,92E+06	1,17E+07	2,86E+06	5,31E+07	1,82E+07	1,18E+07
RL36_CHICK	sp Q98TF6 RL36_CHICK 60S ribosomal protein L36 OS=Gallus gallus GN=RPL36 PE=3 SV=1	260,433	1,03E+06	1,68E+06	2,20E+06	1,54E+06	3,15E+06	4,05E+06	1,03E+06	5,54E+06	2,06E+06	1,27E+07	5,49E+06	4,67E+06
Е1С519_СНІСК	tr E1C5I9 E1C5I9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SRPK1 PE=3 SV=2	79,45	1,32E+05	5,94E+04	2,49E+05	1,40E+05	1,97E+05	3,25E+05	1,32E+05	1,95E+05	2,33E+05	1,15E+06	3,43E+05	3,74E+05
F1NVA4_CHICK	tr F1NVA4 F1NVA4_CHICK Nucleophosmin OS=Gallus gallus GN=NPM1 PE=4 SV=2	681,781	1,25E+06	4,02E+06	5,51E+06	1,88E+06	5,73E+06	1,14E+07	1,25E+06	1,32E+07	5,17E+06	1,55E+07	9,96E+06	1,32E+07
F1N8V1_CHICK	ווואדאס_בדוובא major vauit protein US=Gallus gallus GN=MVP PE=4 SV=2 tr F1N8V1 F1N8V1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RSL1D1 PE=4 SV=2	2188,113	3,79E+07 4,01E+04	4,02E+07 8,67E+03	1,36E+07 9,22E+04	1,49E+05 7,04E+04	1,43E+06 4,46E+04	8,88E+05	3,79E+07 4,01E+04	1,32E+08 2,85E+04	1,27E+07 8,65E+04	1,23E+06 5,79E+05	2,49E+06 7,75E+04	1,02E+06 2,25E+05
E1C347_CHICK	tr E1C347 E1C347_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=GNAO1 PE=4 SV=2	140,655	2,78E+05	7,39E+04		1,03E+04			2,78E+05	2,43E+05	1,08E+04	8,50E+04	1,39E+04	1,08E+04
Q5ZJQ9_CHICK	tr Q5ZJQ9 Q5ZJQ9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_16f17 PE=2	488,915	2,00E+05	4,13E+05	3,77E+05	5,06E+05	9,85E+05	8,43E+05	2,00E+05	1,36E+06	3,54E+05	4,16E+06	1,71E+06	9,72E+05
F1NDZ0_CHICK	tr F1NDZ0 F1NDZ0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=2	298,781	1,30E+05	3,37E+05	2,07E+05	2,63E+05	7,51E+05	5,23E+05	1,30E+05	1,11E+06	1,94E+05	2,17E+06	1,31E+06	6,03E+05

Accession	Description	protein_set_sco	abundance_NF1	abundance_NF2	abundance_NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	e raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
F1NU40_CHICK	tr F1NU40 F1NU40_CHICK Nucleolin OS=Gallus gallus GN=NCL PE=4 SV=2	re 1482,112	8,19E+06	1,74E+07	1,30E+07	1 1,28E+07	2 3,47E+07	3 3,04E+07	_NF1 8,19E+06	_NF2 5,72E+07	_NF3 1,22E+07	_INF1 1,05E+08	_INF2 6,04E+07	_INF3 3,50E+07
F2Z4K4_CHICK	tr F2Z4K4 F2Z4K4_CHICK 60S ribosomal protein L5 OS=Gallus gallus GN=RPL5 PE=3 SV=1	311,158	3,34E+05	2,23E+05	2,89E+05	5,01E+05	6,32E+05	8,82E+05	3,34E+05	7,35E+05	2,71E+05	4,12E+06	1,10E+06	1,02E+06
F1NZ25_CHICK	tr F1NZ25 F1NZ25_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Gallus gallus GN=EIF3B PE=3 SV=2	441,357	1,32E+05	6,37E+05	3,36E+06	5,76E+04	1,96E+05	3,29E+05	1,32E+05	2,10E+06	3,15E+06	4,74E+05	3,41E+05	3,79E+05
F1NPF0_CHICK	tr F1NPF0 F1NPF0_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS=Gallus gallus GN=EIF2S3 PE=4 SV=1	287,847	2,59E+05	5,30E+04	1,49E+05	4,36E+05	5,15E+05	4,91E+05	2,59E+05	1,74E+05	1,40E+05	3,59E+06	8,96E+05	5,66E+05
F1NG89_CHICK	tr F1NG89 F1NG89_CHICK Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 OS=Gallus gallus GN=USP10 PE=4 SV=2	241,966	2,23E+05	2,28E+05	5,86E+05	4,02E+05	6,30E+05	7,33E+05	2,23E+05	7,50E+05	5,50E+05	3,31E+06	1,09E+06	8,46E+05
E1C2C5_CHICK	tr E1C2C5 E1C2C5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=PIK3R2 PE=4 SV=2	85,845					2,41E+05	9,74E+04	1,44E+04	4,38E+04	1,08E+04	6,10E+04	4,19E+05	1,12E+05
E1BT82_CHICK	tr E1BT82 E1BT82_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=EIF2S2 PE=4 SV=1	415,289	6,40E+05	3,88E+05	4,56E+05	6,65E+05	1,44E+06	7,06E+05	6,40E+05	1,28E+06	4,28E+05	5,47E+06	2,50E+06	8,14E+05
RLA0_CHICK	sp P47826 RLA0_CHICK 60S acidic ribosomal protein P0 OS=Gallus gallus GN=RPLP0 PE=2 SV=1	559,047	5,64E+06	1,12E+07	8,90E+06	5,33E+06	2,30E+07	1,95E+07	5,64E+06	3,69E+07	8,35E+06	4,39E+07	3,99E+07	2,24E+07
E1BTG1_CHICK	tr E1BTG1 E1BTG1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL12 PE=3 SV=2	361,302	1,82E+06	2,97E+06	2,09E+06	3,23E+06	6,92E+06	5,06E+06	1,82E+06	9,77E+06	1,96E+06	2,66E+07	1,20E+07	5,84E+06
E1BUZ5_CHICK	tr E1BUZ5 E1BUZ5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPLP2 PE=3 SV=2	537,575	5,06E+05	2,32E+06	1,45E+06	1,77E+06	4,05E+06	3,88E+06	5,06E+05	7,63E+06	1,36E+06	1,46E+07	7,04E+06	4,48E+06
E1C889_CHICK	tr E1C889 E1C889_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.48506 PE=3 SV=2	100,693	4,73E+04	1,67E+05	2,86E+05	1,28E+04	3,31E+04	5,23E+04	4,73E+04	5,50E+05	2,69E+05	1,06E+05	5,75E+04	6,03E+04
F1NGU3_CHICK	tr F1NGU3 F1NGU3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LRPPRC PE=4 SV=2	343,849	2,06E+05	2,97E+05	4,50E+04	4,85E+05	8,55E+05	4,25E+05	2,06E+05	9,78E+05	4,22E+04	3,99E+06	1,49E+06	4,91E+05
E1C2L5_CHICK	tr E1C2L5 E1C2L5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ALYREF PE=4 SV=2	310,858	8,73E+05	2,38E+05	9,50E+05	6,18E+05	9,67E+05	1,01E+06	8,73E+05	7,84E+05	8,91E+05	5,08E+06	1,68E+06	1,16E+06
EIF3M_CHICK	sp Q5ZJ64 EIF3M_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Gallus gallus GN=EIF3M PE=2 SV=1	163,856		1,96E+05	6,91E+05		6,55E+04	1,73E+05	1,44E+04	6,45E+05	6,48E+05	6,10E+04	1,14E+05	1,99E+05
E1BYA6_CHICK	tr E1BYA6 E1BYA6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=2	256,639	9,29E+04	2,00E+05	1,75E+05	1,28E+05	3,41E+05	3,46E+05	9,29E+04	6,58E+05	1,64E+05	1,06E+06	5,94E+05	3,99E+05
СТСF_СНІСК	sp Q08705 CTCF_CHICK Transcriptional repressor CTCF OS=Gallus gallus GN=CTCF PE=1 SV=1	283,434		6,05E+04	7,35E+04		8,73E+05	4,81E+05	1,44E+04	1,99E+05	6,90E+04	6,10E+04	1,52E+06	5,55E+05
Q9YHD2_CHICK	tr Q9YHD2 Q9YHD2_CHICK Nuclear calmodulin-binding protein (Fragment) OS=Gallus gallus GN=URP PE=2 SV=1	346,376	1,30E+05	9,22E+05	5,76E+05	6,92E+05	1,71E+06	1,34E+06	1,30E+05	3,03E+06	5,41E+05	5,70E+06	2,98E+06	1,54E+06
RL27_CHICK	sp P61355 RL27_CHICK 60S ribosomal protein L27 OS=Gallus gallus GN=RPL27 PE=2 SV=2	162,678	1,48E+06	8,52E+05	2,00E+06	2,50E+06	2,71E+06	3,50E+06	1,48E+06	2,80E+06	1,88E+06	2,05E+07	4,70E+06	4,03E+06
Q6EE60_CHICK	tr Q6EE60 Q6EE60_CHICK Ribosomal protein L18 (Fragment) OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	312,966	2,62E+06	1,76E+06	3,22E+06	4,65E+06	5,59E+06	5,76E+06	2,62E+06	5,78E+06	3,02E+06	3,83E+07	9,71E+06	6,64E+06
F1NZM1_CHICK	tr F1NZM1 F1NZM1_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Gallus gallus GN=EIF3E PE=3 SV=1	436,873	9,00E+04	3,94E+05	3,41E+06	3,11E+04	9,10E+04	3,18E+05	9,00E+04	1,30E+06	3,20E+06	2,56E+05	1,58E+05	3,66E+05
Н9КZC8_СНІСК	tr H9KZC8 H9KZC8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=PA2G4 PE=4 SV=2	192,917	1,02E+05	2,36E+05	2,48E+05	3,40E+05	5,13E+05	4,40E+05	1,02E+05	7,75E+05	2,32E+05	2,80E+06	8,91E+05	5,08E+05
E1BZV7_CHICK	tr E1BZV7 E1BZV7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.49134 PE=4 SV=2	164,907		5,60E+03	2,53E+04	2,00E+04	3,27E+04	1,60E+04	1,44E+04	1,84E+04	2,37E+04	1,64E+05	5,68E+04	1,84E+04
F1P339_CHICK	tr F1P339 F1P339_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LARP1 PE=4 SV=2	183,628	1,71E+05	3,81E+05	6,76E+05	2,04E+05	7,19E+05	6,98E+05	1,71E+05	1,25E+06	6,34E+05	1,68E+06	1,25E+06	8,05E+05
Q5ZJH1_CHICK	tr Q5ZJH1 Q5ZJH1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=GEMIN2 PE=2 SV=1	282,407		5,58E+05	6,78E+05		5,62E+04	9,30E+04	1,44E+04	1,83E+06	6,35E+05	6,10E+04	9,77E+04	1,07E+05
F1NY82_CHICK	tr F1NY82 F1NY82_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=IQGAP1 PE=4 SV=2	1279,365	1,63E+06	3,15E+05	3,70E+05	2,13E+06	2,29E+06	1,55E+06	1,63E+06	1,04E+06	3,47E+05	1,75E+07	3,99E+06	1,78E+06
F1NQG5_CHICK	tr F1NQG5 F1NQG5_CHICK Ribosomal protein L15 OS=Gallus gallus GN=RPL15 PE=3 SV=2	230,984	1,09E+06	8,67E+05	5,52E+05	1,99E+06	2,08E+06	2,35E+06	1,09E+06	2,85E+06	5,18E+05	1,64E+07	3,62E+06	2,71E+06
RS17_CHICK	sp P08636 RS17_CHICK 40S ribosomal protein S17 OS=Gallus gallus GN=RPS17 PE=2 SV=3	534,228	1,15E+06	4,96E+06	4,86E+06	1,83E+06	8,17E+06	1,02E+07	1,15E+06	1,63E+07	4,56E+06	1,51E+07	1,42E+07	1,17E+07
IF2B1_CHICK	sp O42254 IF2B1_CHICK Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Gallus gallus GN=IGF2BP1 PE=1 SV=1	744,792	9,95E+05	2,74E+06	4,30E+06	1,33E+06	5,30E+06	4,62E+06	9,95E+05	9,02E+06	4,03E+06	1,10E+07	9,22E+06	5,33E+06
Q8UWG7_CHICK	tr Q8UWG7 Q8UWG7_CHICK 60S ribosomal protein L6 OS=Gallus gallus GN=RPL6 PE=2 SV=1	399,832	2,37E+06	1,72E+06	1,09E+06	3,98E+06	4,02E+06	4,24E+06	2,37E+06	5,65E+06	1,02E+06	3,28E+07	6,98E+06	4,88E+06
IF2A_CHICK	sp Q5ZLX2 IF2A_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Gallus gallus GN=EIF2S1 PE=2 SV=2	365,069	1,67E+05	6,86E+04	1,55E+05	3,29E+05	3,40E+05	2,19E+05	1,67E+05	2,26E+05	1,45E+05	2,70E+06	5,91E+05	2,53E+05
F1P269_CHICK	tr F1P269 F1P269_CHICK ATP-citrate synthase OS=Gallus gallus GN=ACLY PE=3 SV=2	243,607	5,52E+05		1,23E+05				5,52E+05	4,38E+04	1,16E+05	6,10E+04	1,39E+04	1,08E+04
Q5F4A4_CHICK	tr Q5F4A4 Q5F4A4_CHICK Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_1j11 PE=2 SV=1	121,256		3,89E+05	3,13E+05				1,44E+04	1,28E+06	2,94E+05	6,10E+04	1,39E+04	1,08E+04
Q8UWC5_CHICK	tr Q8UWC5 Q8UWC5_CHICK Nuclear protein matrin 3 OS=Gallus gallus GN=MATR3 PE=2 SV=1	392,94	1,86E+05	1,12E+05	2,12E+05	3,64E+05	4,08E+05	2,67E+05	1,86E+05	3,69E+05	1,99E+05	2,99E+06	7,10E+05	3,08E+05
F1N9I5_CHICK	tr F1N9I5 F1N9I5_CHICK ELAV-like protein OS=Gallus gallus GN=ELAVL1 PE=3 SV=1	292,883	3,53E+05	9,97E+05	1,45E+06	7,60E+04	2,87E+05	4,76E+05	3,53E+05	3,28E+06	1,36E+06	6,26E+05	4,98E+05	5,49E+05
F1NIB4_CHICK	tr F1NIB4 F1NIB4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HNRNPAB PE=4 SV=2	283,496	3,45E+05	1,84E+05	7,52E+04	9,36E+05	9,65E+05	2,95E+05	3,45E+05	6,06E+05	7,05E+04	7,70E+06	1,68E+06	3,41E+05
R4GLV4_CHICK	tr R4GLV4 R4GLV4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.51531 PE=4 SV=1	246,204	1,93E+04	9,29E+03	1,40E+05	3,63E+04		1,90E+05	1,93E+04	3,06E+04	1,31E+05	2,99E+05	1,39E+04	2,19E+05
F1NV49_CHICK	tr F1NV49 F1NV49_CHICK ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Gallus gallus GN=DDX1 PE=4 SV=2	1023,457	2,45E+06	2,31E+06	3,80E+06	1,68E+06	4,67E+06	3,47E+06	2,45E+06	7,61E+06	3,56E+06	1,38E+07	8,12E+06	4,00E+06

Accession	Description	protein_set_sco	abundance_NF1	abundance_NF2	abundance_NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
F1NY52_CHICK	tr F1NY52 F1NY52_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=2	2056,75	1,03E+07	2,64E+06	9,45E+05	1 7,43E+05	2 1,17E+05	3 3,37E+05	_NF1 1,03E+07	_NF2 8,69E+06	_NF3 8,86E+05	_INF1 6,11E+06	_INF2 2,03E+05	_INF3 3,88E+05
E1BSS3_CHICK	tr E1BSS3 E1BSS3_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Gallus gallus GN=FIF3A PF=3 SV=1	887,457	2,38E+05	4,97E+05	4,42E+06	1,25E+05	8,48E+04	3,84E+05	2,38E+05	1,64E+06	4,15E+06	1,03E+06	1,47E+05	4,43E+05
F1NCE1_CHICK	tr F1NCE1 F1NCE1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=EIF3D PE=3 SV=2	149,069	7,88E+04	7,13E+04	1,27E+06	1,65E+04	1,09E+04	4,10E+04	7,88E+04	2,35E+05	1,19E+06	1,36E+05	1,90E+04	4,73E+04
Q5F3D2_CHICK	tr Q5F3D2 Q5F3D2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HNRNPH3 PE=2 SV=1	577,91	5,11E+05	2,49E+06	1,86E+06	4,43E+04	5,27E+05	2,18E+05	5,11E+05	8,20E+06	1,74E+06	3,64E+05	9,17E+05	2,51E+05
R4GGF3_CHICK	tr R4GGF3 R4GGF3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=GLIPR2 PE=3 SV=1	314,691	4,33E+06	2,79E+06	4,99E+05	3,84E+05	4,39E+05	2,01E+05	4,33E+06	9,16E+06	4,68E+05	3,16E+06	7,64E+05	2,32E+05
Е1С050_СНІСК	tr E1C050 E1C050_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Gallus gallus GN=EIF3F PE=3 SV=1	235,715	5,30E+04	2,11E+05	1,95E+06	4,87E+04	2,67E+04	1,74E+05	5,30E+04	6,95E+05	1,82E+06	4,01E+05	4,65E+04	2,01E+05
F1NFC6_CHICK	tr F1NFC6 F1NFC6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS4X PE=3 SV=2	690,515	5,02E+06	3,37E+06	4,16E+06	7,15E+06	6,97E+06	7,31E+06	5,02E+06	1,11E+07	3,90E+06	5,88E+07	1,21E+07	8,43E+06
RS13_CHICK	sp Q6ITC7 RS13_CHICK 40S ribosomal protein S13 OS=Gallus gallus GN=RPS13 PE=2 SV=3	353,263	2,86E+06	8,84E+06	9,23E+06	4,59E+06	1,23E+07	1,55E+07	2,86E+06	2,91E+07	8,66E+06	3,77E+07	2,13E+07	1,79E+07
F1P4X5_CHICK	tr F1P4X5 F1P4X5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=CCAR1 PE=4 SV=2	301,538	8,11E+04	1,60E+06	1,01E+06	2,08E+04	7,93E+04	1,75E+05	8,11E+04	5,27E+06	9,44E+05	1,71E+05	1,38E+05	2,01E+05
н9кz27_сніск	tr H9KZ27 H9KZ27_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=KRT6A PE=3 SV=1	111,497	2,01E+06	1,78E+06	2,36E+06	2,63E+05	1,11E+06	1,22E+06	2,01E+06	5,86E+06	2,21E+06	2,17E+06	1,93E+06	1,41E+06
RS27A_CHICK	sp P79781 RS27A_CHICK Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Gallus gallus GN=RPS27A PE=2 SV=3	341,715	1,83E+06	1,29E+06	1,24E+06	2,13E+06	2,09E+06	2,78E+06	1,83E+06	4,24E+06	1,16E+06	1,75E+07	3,63E+06	3,21E+06
Е1С6М6_СНІСК	tr E1C6M6 E1C6M6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC423693 PE=4 SV=2	136,934	6,63E+04	1,50E+05	1,77E+05	2,97E+05	2,91E+05	2,28E+05	6,63E+04	4,93E+05	1,66E+05	2,45E+06	5,06E+05	2,63E+05
E1C3L7_CHICK	tr E1C3L7 E1C3L7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=2	257,796	8,66E+04	7,89E+04	6,53E+04	2,33E+05	2,19E+05	9,36E+04	8,66E+04	2,60E+05	6,12E+04	1,92E+06	3,81E+05	1,08E+05
F1NEX8_CHICK	tr F1NEX8 F1NEX8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RBM45 PE=4 SV=1	349,622	1,14E+05	9,95E+05	6,86E+05	2,42E+04	1,62E+05	8,73E+04	1,14E+05	3,27E+06	6,43E+05	1,99E+05	2,81E+05	1,01E+05
F1P2P4_CHICK	tr F1P2P4 F1P2P4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=CARKD PE=3 SV=2	1165,938	5,23E+06	2,96E+07	1,49E+07	6,68E+04	3,57E+06	5,65E+06	5,23E+06	9,75E+07	1,40E+07	5,49E+05	6,20E+06	6,52E+06
093560_СНІСК	tr O93560 O93560_CHICK Calcium/calmodulin-dependent kinase type II beta subunit OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	623,359	1,25E+07	2,68E+07	1,05E+07	6,17E+03	8,59E+06	3,73E+06	1,25E+07	8,81E+07	9,87E+06	5,08E+04	1,49E+07	4,30E+06
Q5ZL53_CHICK	tr Q5ZL53 Q5ZL53_CHICK Polyadenylate-binding protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_7l20 PE=2 SV=1	1589,72	8,32E+06	1,32E+07	2,04E+07	6,98E+06	2,45E+07	1,88E+07	8,32E+06	4,33E+07	1,92E+07	5,75E+07	4,25E+07	2,16E+07
F1NQ35_CHICK	tr F1NQ35 F1NQ35_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPL35A PE=4 SV=2	72,894	4,58E+05	1,37E+05	3,00E+05	9,60E+05	5,58E+05	4,96E+05	4,58E+05	4,51E+05	2,81E+05	7,90E+06	9,70E+05	5,72E+05
F2Z4L5_CHICK	tr F2Z4L5 F2Z4L5_CHICK 60S ribosomal protein L7a OS=Gallus gallus GN=RPL7A PE=4 SV=1	352,911	2,81E+06	2,38E+06	4,27E+06	5,22E+06	3,83E+06	6,06E+06	2,81E+06	7,84E+06	4,00E+06	4,30E+07	6,65E+06	6,99E+06
E1C207_CHICK	tr E1C207 E1C207_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SH3PXD2A PE=4 SV=2	150,07	6,25E+04	4,13E+04	7,95E+04	6,72E+04	8,65E+04	7,03E+04	6,25E+04	1,36E+05	7,46E+04	5,53E+05	1,50E+05	8,10E+04
Q5F3L2_CHICK	tr Q5F3L2 Q5F3L2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_14f6 PE=2 SV=1	722,368	2,84E+06	1,71E+06	2,45E+06	2,14E+06	3,04E+06	3,02E+06	2,84E+06	5,63E+06	2,30E+06	1,76E+07	5,28E+06	3,49E+06
F1P011_CHICK	tr F1P011 F1P011_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=CAMK2A PE=3 SV=2	577,314	7,20E+06	1,65E+07	7,44E+06	2,32E+04	6,00E+06	2,58E+06	7,20E+06	5,42E+07	6,97E+06	1,91E+05	1,04E+07	2,97E+06
E1BZ86_CHICK	tr E1BZ86 E1BZ86_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=CAMK2G PE=4 SV=2	967,168	1,61E+07	3,37E+07	1,40E+07	8,35E+04	1,21E+07	5,75E+06	1,61E+07	1,11E+08	1,31E+07	6,87E+05	2,11E+07	6,63E+06
F1NDK1_CHICK	tr F1NDK1 F1NDK1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=VRK1 PE=4 SV=1	500,674	2,28E+05		3,07E+04	1,18E+06	4,31E+05	2,56E+05	2,28E+05	4,38E+04	2,88E+04	9,75E+06	7,49E+05	2,95E+05
LSM12_CHICK	sp Q5ZML5 LSM12_CHICK Protein LSM12 homolog OS=Gallus gallus GN=LSM12 PE=2 SV=1	144,273	3,56E+04	5,02E+05	5,95E+05	2,80E+04	1,35E+05	1,36E+05	3,56E+04	1,65E+06	5,58E+05	2,31E+05	2,34E+05	1,57E+05
O42403_CHICK	tr O42403 O42403_CHICK Attachment region binding protein (Fragment) OS=Gallus gallus GN=ARBP PE=1 SV=1	276,662	1,37E+05	2,42E+05	2,78E+04	5,81E+05	5,12E+05	1,80E+05	1,37E+05	7,97E+05	2,60E+04	4,78E+06	8,91E+05	2,07E+05
F1NCI6_CHICK	tr F1NCI6 F1NCI6_CHICK 60S ribosomal protein L7 OS=Gallus gallus GN=RPL7 PE=3 SV=1	396,756	3,21E+06	2,41E+06	1,10E+06	7,83E+06	4,70E+06	4,67E+06	3,21E+06	7,94E+06	1,03E+06	6,44E+07	8,18E+06	5,38E+06
F1NWP3_CHICK	tr F1NWP3 F1NWP3_CHICK Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Gallus gallus GN=HSPA8 PE=3 SV=1	944,617	3,29E+06	3,35E+06	2,18E+06	3,45E+06	5,51E+06	4,03E+06	3,29E+06	1,10E+07	2,05E+06	2,84E+07	9,58E+06	4,65E+06
R4GMJ4_CHICK	tr R4GMJ4 R4GMJ4_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K OS=Gallus GN=EIF3K PE=3 SV=1	201,141	5,51E+04	2,49E+05	1,73E+06	4,22E+04	5,94E+04	4,11E+05	5,51E+04	8,21E+05	1,62E+06	3,47E+05	1,03E+05	4,73E+05
KCC2D_CHICK	sp Q5ZKI0 KCC2D_CHICK Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain QS=Gallus gallus GN=CAMK2D PE=2 SV=1	1359,832	2,58E+07	6,39E+07	2,55E+07	7,84E+03	2,14E+07	9,63E+06	2,58E+07	2,10E+08	2,39E+07	6,46E+04	3,72E+07	1,11E+07
EIF3H_CHICK	sp Q5ZLE6 EIF3H_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H OS=Gallus gallus GN=EIF3H PE=2 SV=1	213,871	3,66E+04	1,30E+05	1,44E+06	3,20E+04	5,04E+04	1,22E+05	3,66E+04	4,27E+05	1,35E+06	2,63E+05	8,77E+04	1,41E+05
Q98TQ8_CHICK	tr Q98TQ8 Q98TQ8_CHICK Connective tissue growth factor OS=Gallus gallus GN=CTGF PE=2 SV=1	557,468	1,55E+06	3,55E+06	4,25E+05	4,79E+04	5,51E+05	2,81E+05	1,55E+06	1,17E+07	3,99E+05	3,94E+05	9,58E+05	3,24E+05
F1NDN6_CHICK	tr F1NDN6 F1NDN6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=KRT12 PE=3 SV=2	104,976	1,55E+06	5,71E+06	4,93E+06	2,84E+05	1,55E+06	2,03E+06	1,55E+06	1,88E+07	4,63E+06	2,33E+06	2,70E+06	2,34E+06
Q90838_СНІСК	tr Q90838 Q90838_CHICK Leucine zipper protein OS=Gallus gallus GN=PTRF PE=2 SV=1	285,848	6,67E+05	2,47E+05	1,87E+04	3,79E+05	7,21E+05	1,06E+05	6,67E+05	8,11E+05	1,76E+04	3,12E+06	1,25E+06	1,22E+05
АТРВ_СНІСК	sp QSZLCS ATPB_CHICK ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Gallus gallus GN=ATP5B PE=1 SV=1	118,941	7,09E+04	9,32E+04	5,21E+04	1,87E+05	2,16E+05	2,80E+04	7,09E+04	3,07E+05	4,88E+04	1,54E+06	3,76E+05	3,23E+04
E1BW84_CHICK	tr E1BW84 E1BW84_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.55651 PE=4 SV=2	348,453	5,44E+05	1,90E+05	4,42E+05	7,81E+05	5,05E+05	4,54E+05	5,44E+05	6,26E+05	4,14E+05	6,43E+06	8,78E+05	5,24E+05
F1NVW3_CHICK	tr F1NVW3 F1NVW3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=IGF2BP2 PE=4 SV=2	246,946	9,57E+04	1,99E+05	3,83E+05	9,91E+04	6,31E+05	1,77E+05	9,57E+04	6,55E+05	3,59E+05	8,15E+05	1,10E+06	2,04E+05

Acce	sion Description	protein_set_sc	o abundance_NF1	abundance_NF2	abundance_NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
IF2B3_CHICK	sp Q5ZLP8 IF2B3_CHICK Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Gallus gallus	545,291	3,16E+05	8,30E+05	1,05E+06	3,56E+05	1,72E+06	9,93E+05	3,16E+05	2,73E+06	9,84E+05	2,93E+06	2,99E+06	1,14E+06
H9KZD5_CHICK	tr H9KZD5 H9KZD5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LARP4 PE=4 SV=2	278,622	7,17E+04	3,63E+05	4,49E+05	4,93E+06	3,94E+05	1,81E+06	7,17E+04	1,19E+06	4,21E+05	4,06E+07	6,84E+05	2,08E+06
Q7SX63_CHICK	tr Q7SX63 Q7SX63_CHICK Heat shock protein 70 OS=Gallus gallus GN=HSP70 PE=3 SV=1	688,924	1,72E+06	2,50E+06	1,25E+06	2,28E+06	3,90E+06	2,23E+06	1,72E+06	8,21E+06	1,18E+06	1,88E+07	6,77E+06	2,57E+06
Z4YJB8 CHICK	tr Z4YJB8 Z4YJB8 CHICK Destrin OS=Gallus gallus GN=DSTN PE=3 SV=1	213,643	4,34E+05	1,63E+05	3,53E+05	5,37E+05	2,85E+05	4,55E+05	4,34E+05	5,36E+05	3,31E+05	4,42E+06	4,95E+05	5,25E+05
F1N9S3_CHICK	tr F1N9S3 F1N9S3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=FAM98A PE=4 SV=1	457,137	6,99E+05	8,99E+05	1,36E+06	4,27E+05	1,72E+06	1,19E+06	6,99E+05	2,96E+06	1,28E+06	3,52E+06	2,99E+06	1,38E+06
H9L107_CHICK	tr H9L107 H9L107_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=KRT4 PE=3 SV=2	136,173	1,48E+06	1,48E+06	1,33E+06	1,83E+05	8,52E+05	7,52E+05	1,48E+06	4,86E+06	1,25E+06	1,50E+06	1,48E+06	8,67E+05
Q9I9D1_CHICK	tr Q9I9D1 Q9I9D1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=VDAC2 PE=2 SV=1	289,873	4,76E+05	1,71E+05	1,61E+05	3,66E+05	4,27E+05	1,52E+05	4,76E+05	5,61E+05	1,51E+05	3,02E+06	7,43E+05	1,75E+05
PRDX1_CHICK	sp P0CB50 PRDX1_CHICK Peroxiredoxin-1 OS=Gallus gallus GN=PRDX1 PE=1 SV=1	233,046	1,02E+06	7,17E+05	1,57E+06	9,56E+05	9,48E+05	1,58E+06	1,02E+06	2,36E+06	1,48E+06	7,86E+06	1,65E+06	1,82E+06
E1BW15_CHICK	tr E1BW15 E1BW15_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=DDX50 PE=4 SV=1	84,112	4,61E+04	2,09E+04	4,34E+04	2,25E+05	3,77E+04	6,75E+04	4,61E+04	6,88E+04	4,07E+04	1,85E+06	6,56E+04	7,79E+04
Н9КZР2_СНІСК	tr H9KZP2 H9KZP2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=KRT8 PE=3 SV=2	104,102	2,49E+06	1,79E+07	5,28E+06	3,16E+05	2,02E+06	2,85E+06	2,49E+06	5,91E+07	4,95E+06	2,60E+06	3,51E+06	3,28E+06
LEG4_CHICK	sp P07583 LEG4_CHICK Beta-galactoside-binding lectin OS=Gallus gallus PE=1 SV=2	357,747	3,82E+06	2,39E+06	7,01E+05	1,88E+07	2,32E+06	5,79E+06	3,82E+06	7,87E+06	6,57E+05	1,55E+08	4,04E+06	6,68E+06
E1BY12_CHICK	tr [E1BY12 E1BY12 _ CHICK AP complex subunit beta OS=Gallus gallus GN=AP2B1 PE=3 SV=1	222,191	2,14E+05	8,23E+04	1,52E+05	1,60E+05	2,06E+05	8,41E+04	2,14E+05	2,71E+05	1,43E+05	1,31E+06	3,58E+05	9,70E+04
F1NH40_CHICK	tr F1NH40 F1NH40_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SYNPO2 PE=4 SV=2	210,111	8,61E+04		4,21E+04	3,19E+05	3,16E+04	7,65E+04	8,61E+04	4,38E+04	3,95E+04	2,63E+06	5,49E+04	8,83E+04
E1C8Y9_CHICK	tr E1C8Y9 E1C8Y9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SRSF3 PE=4 SV=1	164,259	6,20E+05	6,71E+05	1,34E+06	3,09E+05	1,23E+06	1,07E+06	6,20E+05	2,21E+06	1,25E+06	2,54E+06	2,13E+06	1,23E+06
к2со_сніск	sp 093532 K2CO_CHICK Keratin, type II cytoskeletal cochleal OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	143,955	2,10E+06	1,64E+07	3,09E+06	2,31E+05	1,82E+06	1,57E+06	2,10E+06	5,39E+07	2,90E+06	1,90E+06	3,16E+06	1,81E+06
R4GFD4_CHICK	tr R4GFD4 R4GFD4_CHICK Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase OS=Gallus gallus GN=NMNAT1 PE=3 SV=1	165,229	5,26E+04	4,74E+05	1,98E+05	1,84E+05	1,11E+06	3,30E+05	5,26E+04	1,56E+06	1,85E+05	1,51E+06	1,93E+06	3,81E+05
E1BVU7_CHICK	tr E1BVU7 E1BVU7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SPECC1 PE=4 SV=2	211,979	1,39E+05	4,31E+04	1,57E+04	3,89E+05	2,97E+04	1,44E+05	1,39E+05	1,42E+05	1,47E+04	3,20E+06	5,16E+04	1,67E+05
Q98906_CHICK	tr Q98906 Q98906_CHICK Microtubule-associated protein (Fragment) OS=Gallus gallus GN=MAP4 PE=2 SV=1	192,59	2,08E+05	1,40E+05	8,77E+04	1,91E+05	1,73E+05	2,06E+05	2,08E+05	4,62E+05	8,23E+04	1,57E+06	3,01E+05	2,38E+05
E1C2B6_CHICK	tr E1C2B6 E1C2B6_CHICK Coronin OS=Gallus gallus GN=CORO2B PE=3 SV=2	241,53	3,80E+04	2,20E+04		4,47E+05	4,20E+04	9,80E+03	3,80E+04	7,24E+04	1,08E+04	3,68E+06	7,30E+04	1,13E+04
E1BTT4_CHICK	tr E1BTT4 E1BTT4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HADHB PE=3 SV=1	121,472	1,02E+05	2,18E+04		1,19E+05	6,59E+04	1,12E+04	1,02E+05	7,16E+04	1,08E+04	9,76E+05	1,15E+05	1,29E+04
CAD13_CHICK	sp P33150 CAD13_CHICK Cadherin-13 OS=Gallus gallus GN=CDH13 PE=1 SV=1	385,748	4,94E+06	8,28E+05	1,61E+05	3,33E+05	2,55E+04	9,41E+04	4,94E+06	2,73E+06	1,51E+05	2,74E+06	4,43E+04	1,09E+05
F1NDN9_CHICK	tr F1NDN9 F1NDN9_CHICK Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Gallus gallus GN=KRT19 PE=3 SV=1	127,856	1,05E+06	2,71E+06	2,04E+06	9,38E+03	1,84E+06	5,60E+05	1,05E+06	8,93E+06	1,92E+06	7,72E+04	3,21E+06	6,46E+05
Q5ZI60_CHICK	tr Q5ZI60 Q5ZI60_CHICK Coronin OS=Gallus gallus GN=CORO1C PE=2 SV=1	146,922	1,87E+05		1,35E+04	6,23E+05	1,39E+04	9,64E+04	1,87E+05	4,38E+04	1,26E+04	5,13E+06	2,42E+04	1,11E+05
Q6PVZ5_CHICK	tr Q6PVZ5 Q6PVZ5_CHICK Type II alpha-keratin IIA OS=Gallus gallus GN=KRT5 PE=2 SV=1	129,772	1,15E+06	1,57E+07	1,69E+06	1,62E+05	1,27E+06	8,47E+05	1,15E+06	5,16E+07	1,58E+06	1,33E+06	2,21E+06	9,77E+05
Е1С6Ј9_СНІСК	tr [E1C6J9]E1C6J9_CHICK Thy-1 membrane glycoprotein OS=Gallus gallus GN=THY1 PE=4 SV=2	244,531	2,47E+06	5,37E+05	2,58E+05	1,67E+05	2,89E+05	3,90E+05	2,47E+06	1,77E+06	2,42E+05	1,38E+06	5,02E+05	4,50E+05
R4GFH1_CHICK	tr R4GFH1 R4GFH1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SDPR PE=4 SV=1	126,692	3,17E+05	1,37E+05		1,59E+05	2,85E+05	8,58E+04	3,17E+05	4,50E+05	1,08E+04	1,31E+06	4,95E+05	9,90E+04
DREB_CHICK	sp P18302 DREB_CHICK Drebrin OS=Gallus gallus GN=DBN1 PE=2 SV=4	605,044	1,69E+06	4,18E+05	1,11E+05	5,92E+06	3,24E+05	9,16E+05	1,69E+06	1,38E+06	1,04E+05	4,87E+07	5,64E+05	1,06E+06
E1BR04_CHICK	tr E1BR04 E1BR04_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.50931 PE=4 SV=2	823,265	7,12E+05	2,31E+05	5,11E+04	3,22E+06	2,02E+05	2,83E+05	7,12E+05	7,60E+05	4,79E+04	2,65E+07	3,51E+05	3,26E+05
R4GI80_CHICK	tr R4GI80 R4GI80_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=1	142,152	5,96E+04	1,63E+04		2,27E+05	2,02E+04		5,96E+04	5,36E+04	1,08E+04	1,87E+06	3,52E+04	1,08E+04
PP1B_CHICK	sp1P62207 PP1B_CHICK Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit OS=Gallus gallus GN=PPP1CB PE=1 SV=3	430,666	2,61E+05	2,70E+05	1,01E+05	1,63E+06	1,43E+05	2,76E+05	2,61E+05	8,88E+05	9,43E+04	1,34E+07	2,49E+05	3,18E+05
Q45KQ2_CHICK	tr Q45KQ2 Q45KQ2_CHICK Aggrecan promoter binding protein OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	224,173	2,64E+06	1,37E+05	3,12E+04	1,65E+06	9,16E+05	3,42E+05	2,64E+06	4,52E+05	2,93E+04	1,35E+07	1,59E+06	3,94E+05
Н9КZD7_СНІСК	tr H9KZD7 H9KZD7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LIMA1 PE=4 SV=2	600,615	4,74E+05	3,02E+05		2,04E+06	1,39E+05	3,44E+05	4,74E+05	9,95E+05	1,08E+04	1,68E+07	2,42E+05	3,97E+05
Q5ZLG7_CHICK	tr Q5ZLG7 Q5ZLG7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_6e4 PE=2 SV=1	229,99	1,52E+06	1,94E+05	5,10E+04	1,25E+06	5,54E+05	2,97E+05	1,52E+06	6,39E+05	4,78E+04	1,03E+07	9,64E+05	3,42E+05
E1C8N4_CHICK	tr [E1C8N4]E1C8N4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SVIL PE=4 SV=2	1005,165	4,80E+05	5,16E+04	4,96E+03	1,49E+06		1,11E+05	4,80E+05	1,70E+05	4,65E+03	1,23E+07	1,39E+04	1,28E+05
Q5ZI99_CHICK	tr Q5ZI99 Q5ZI99_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ARPC1B PE=2 SV=1	252,97	2,74E+05	2,37E+04		9,15E+05		2,64E+04	2,74E+05	7,78E+04	1,08E+04	7,53E+06	1,39E+04	3,04E+04

Accession	Description	protein_set_sco	abundance_NF1	abundance_NF2	abundance_NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
E1BY27_CHICK	tr E1BY27 E1BY27_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=MYO18A PE=3 SV=2	3172,179	2,25E+06	1,29E+06	1,68E+06	1,46E+07	4,11E+05	1,24E+06	2,25E+06	4,23E+06	1,57E+06	1,20E+08	7,15E+05	1,43E+06
F1NG46_CHICK	tr F1NG46 F1NG46_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TFAM PE=4 SV=1	313,098	1,59E+05	8,51E+05	8,46E+04	1,08E+06	1,04E+06	3,07E+05	1,59E+05	2,80E+06	7,94E+04	8,85E+06	1,81E+06	3,54E+05
F2Z4M3_CHICK	tr F2Z4M3 F2Z4M3_CHICK 40S ribosomal protein S15 OS=Gallus gallus GN=RPS15 PE=3 SV=1	673,234	1,08E+06	2,93E+06	2,77E+06	1,46E+06	3,58E+06	4,24E+06	1,08E+06	9,63E+06	2,60E+06	1,21E+07	6,23E+06	4,89E+06
МУО5А_СНІСК	sp Q02440 MYO5A_CHICK Unconventional myosin-Va OS=Gallus gallus GN=MYO5A PE=1 SV=1	1517,345	2,46E+06	1,47E+05	1,05E+05	5,95E+06	6,54E+04	4,77E+05	2,46E+06	4,82E+05	9,82E+04	4,90E+07	1,14E+05	5,50E+05
F1NA71 CHICK	tr F1NA71 F1NA71 CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=2	1418.953	1.73E+06	6.62E+05	8.54E+04	4.73E+06	2.83E+05	9.57E+05	1.73E+06	2.18E+06	8.01E+04	3.89E+07	4.91E+05	1.10E+06
F1NZS9_CHICK	tr F1NZS9 F1NZS9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TMPO PE=4 SV=1	174,33	1,33E+05	7,85E+04	2,46E+04	3,23E+05	7,23E+04	6,96E+04	1,33E+05	2,58E+05	2,30E+04	2,66E+06	1,26E+05	8,02E+04
E1C9I0_CHICK	tr [E1C9I0]E1C9I0_CHICK Unconventional myosin-Ig OS=Gallus gallus GN=MYO1G PE=3 SV=2	146,85	5,72E+05			7,53E+05		2,09E+05	5,72E+05	4,38E+04	1,08E+04	6,20E+06	1,39E+04	2,41E+05
F1NVY5_CHICK	tr F1NVY5 F1NVY5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=DNAJB11 PE=4 SV=1	230,553	3,34E+04	8,14E+05	4,78E+05	2,00E+04	1,48E+05	3,32E+05	3,34E+04	2,68E+06	4,49E+05	1,64E+05	2,58E+05	3,82E+05
EIF3L_CHICK	sp Q5F428 EIF3L_CHICK Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L OS=Gallus gallus GN=EIF3L PE=2 SV=1	407,844	4,40E+04	2,50E+04	1,27E+06	4,68E+03	1,65E+04	1,45E+05	4,40E+04	8,24E+04	1,19E+06	3,85E+04	2,88E+04	1,68E+05
E1C6H2_CHICK	tr E1C6H2 E1C6H2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=FLII PE=4 SV=2	423,627	1,75E+05		3,14E+04	5,42E+05			1,75E+05	4,38E+04	2,95E+04	4,46E+06	1,39E+04	1,08E+04
A0A140T8H5_CHICK	tr A0A140T8H5 A0A140T8H5_CHICK Cytospin-A OS=Gallus gallus GN=SPECC1L PE=4 SV=1	1069,66	1,17E+06	3,76E+05	2,37E+05	4,97E+06	4,69E+04	3,25E+05	1,17E+06	1,24E+06	2,22E+05	4,09E+07	8,16E+04	3,75E+05
Q6WNG8_CHICK	tr Q6WNG8 Q6WNG8_CHICK Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1-like protein OS=Gallus eallus PE=2 SV=1	628,801	1,33E+06	4,12E+06	6,41E+06	5,86E+05	1,74E+06	2,39E+06	1,33E+06	1,36E+07	6,01E+06	4,82E+06	3,02E+06	2,75E+06
E1C6N5_CHICK	tr E1C6N5 E1C6N5_CHICK Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Gallus gallus GN=DLAT PE=3 SV=1	266,181	3,63E+04	4,06E+05		1,62E+06	2,44E+05	7,01E+04	3,63E+04	1,34E+06	1,08E+04	1,33E+07	4,24E+05	8,09E+04
F1NCG5_CHICK	tr F1NCG5 F1NCG5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.55418 PE=4 SV=2	297,29	4,10E+05	5,47E+04	1,47E+04	9,44E+05	4,59E+04	4,50E+04	4,10E+05	1,80E+05	1,37E+04	7,77E+06	7,99E+04	5,19E+04
F1P1K3_CHICK	tr F1P1K3 F1P1K3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ARPC2 PE=4 SV=2	468,371	2,13E+06	1,28E+05	6,59E+04	3,56E+06	1,56E+05	4,10E+05	2,13E+06	4,22E+05	6,18E+04	2,93E+07	2,71E+05	4,73E+05
н9L011_СНІСК	tr H9L011 H9L011_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC426023 PE=4 SV=2	277,26	5,39E+05	1,42E+06	1,71E+06	2,43E+05	3,57E+05	3,44E+05	5,39E+05	4,67E+06	1,60E+06	2,00E+06	6,21E+05	3,96E+05
Q5ZJI7_CHICK	tr Q5ZJI7 Q5ZJI7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ARPC1A PE=2 SV=1	199,084	3,96E+05			6,06E+05		8,59E+04	3,96E+05	4,38E+04	1,08E+04	4,99E+06	1,39E+04	9,91E+04
H9L0H3_CHICK	tr H9L0H3 H9L0H3_CHICK Alpha-actinin-4 OS=Gallus gallus GN=ACTN4 PE=4 SV=2	557,402	5,70E+05	1,25E+05		1,85E+06	9,17E+03	3,33E+04	5,70E+05	4,12E+05	1,08E+04	1,52E+07	1,59E+04	3,84E+04
E1C5P5_CHICK	tr E1C5P5 E1C5P5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LRRFIP2 PE=4 SV=2	194,202	7,51E+04	1,68E+05	4,19E+04	7,04E+05	7,43E+04	7,71E+04	7,51E+04	5,51E+05	3,93E+04	5,79E+06	1,29E+05	8,90E+04
МУО1А_СНІСК	sp P47807 MYO1A_CHICK Unconventional myosin-la OS=Gallus gallus GN=MYO1A PE=1 SV=2	118,734	9,68E+05	3,15E+04	3,39E+04	1,60E+06	2,24E+04	1,41E+05	9,68E+05	1,04E+05	3,18E+04	1,31E+07	3,89E+04	1,63E+05
F1NAZ3_CHICK	tr F1NAZ3 F1NAZ3_CHICK Kinesin-like protein OS=Gallus gallus GN=KIF2A PE=3 SV=2	151,487	1,44E+04	1,02E+05	7,06E+04	6,80E+04	2,18E+05		1,44E+04	3,37E+05	6,62E+04	5,60E+05	3,80E+05	1,08E+04
E1C459_CHICK	tr E1C459 E1C459_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=MYO1D PE=3 SV=2	1980,206	9,59E+06	6,21E+05	1,35E+05	1,19E+07	9,14E+04	3,19E+06	9,59E+06	2,04E+06	1,27E+05	9,79E+07	1,59E+05	3,68E+06
F1N8D4_CHICK	tr F1N8D4 F1N8D4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=FLNB PE=4 SV=2	95,778	7,11E+03	5,23E+04		1,49E+03	1,04E+04	6,48E+03	7,11E+03	1,72E+05	1,08E+04	1,23E+04	1,81E+04	7,47E+03
CALM_CHICK	sp P62149 CALM_CHICK Calmodulin OS=Gallus gallus GN=CALM PE=1 SV=2	668,98	5,20E+06	1,50E+06	5,14E+05	5,32E+06	1,04E+06	3,07E+06	5,20E+06	4,93E+06	4,82E+05	4,38E+07	1,81E+06	3,54E+06
E1C4N0_CHICK	tr E1C4N0 E1C4N0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS10 PE=4 SV=2	185,116	7,78E+05	3,19E+05	1,55E+05	8,21E+05	3,93E+05	3,21E+05	7,78E+05	1,05E+06	1,45E+05	6,76E+06	6,84E+05	3,71E+05
F1NU55_CHICK	tr F1NU55 F1NU55_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=CTTN PE=4 SV=2	557,345	1,58E+06	4,36E+05	5,88E+04	2,83E+06	2,31E+05	4,69E+05	1,58E+06	1,43E+06	5,52E+04	2,33E+07	4,02E+05	5,41E+05
E1BRY8_CHICK	tr E1BRY8 E1BRY8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ATAD3A PE=4 SV=2	716,373	4,04E+06	6,23E+05	1,85E+05	4,29E+06	9,42E+05	8,02E+05	4,04E+06	2,05E+06	1,74E+05	3,53E+07	1,64E+06	9,25E+05
F1NI29_CHICK	tr F1NI29 F1NI29_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HADHA PE=3 SV=2	206,285	1,71E+05			2,74E+05	1,45E+04		1,71E+05	4,38E+04	1,08E+04	2,26E+06	2,52E+04	1,08E+04
F1NTJ5_CHICK	tr F1NTJ5 F1NTJ5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=MYO1B PE=3 SV=2	1538,571	6,30E+06	1,98E+05	2,77E+05	6,85E+06	4,59E+04	1,67E+06	6,30E+06	6,51E+05	2,60E+05	5,64E+07	7,99E+04	1,92E+06
E1C8C8_CHICK	tr E1C8C8 E1C8C8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ANLN PE=4 SV=1	344,081	3,82E+05		6,27E+04	1,25E+05	9,75E+04	1,21E+05	3,82E+05	4,38E+04	5,88E+04	1,03E+06	1,70E+05	1,39E+05
ARP2_CHICK	sp P53488 ARP2_CHICK Actin-related protein 2 OS=Gallus gallus GN=ACTR2 PE=2 SV=1	606,348	2,09E+06	7,79E+05	9,24E+04	3,45E+06	3,53E+05	8,20E+05	2,09E+06	2,56E+06	8,66E+04	2,84E+07	6,13E+05	9,45E+05
DPYL2_CHICK	sp Q90635 DPYL2_CHICK Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Gallus gallus GN=DPYSL2 PE=2 SV=1	82,512	4,25E+04	2,82E+06	2,50E+04	9,35E+04	5,87E+04	3,91E+04	4,25E+04	9,30E+06	2,35E+04	7,69E+05	1,02E+05	4,51E+04
F1NWJ9_CHICK	tr F1NWJ9 F1NWJ9_CHICK Unconventional myosin-VI OS=Gallus gallus GN=MYO6 PE=4 SV=1	2277,091	1,55E+07	6,33E+05	2,96E+05	2,15E+07	1,59E+05	8,26E+05	1,55E+07	2,08E+06	2,78E+05	1,77E+08	2,77E+05	9,53E+05
ACTN4_CHICK	sp Q90734 ACTN4_CHICK Alpha-actinin-4 OS=Gallus gallus GN=ACTN4 PE=1 SV=1	707,495	1,12E+06	3,96E+05	5,63E+04	2,40E+06	6,00E+04	2,90E+05	1,12E+06	1,30E+06	5,28E+04	1,97E+07	1,04E+05	3,35E+05
F1NH87_CHICK	tr F1NH8/ F1NH8/_CHICK Giyceraidenyde-3-phosphate denydrogenase US=Gallus gallus GN=GAPDH PE=3 SV=1	566,253	2,99E+06	6,54E+05	3,28E+05	2,88E+06	9,76E+05	4,27E+05	2,99E+06	2,15E+06	3,07E+05	2,37E+07	1,70E+06	4,93E+05
EF1A_CHICK	sp Q90835 EF1A_CHICK Elongation factor 1-alpha 1 OS=Gallus gallus GN=EEF1A PE=2 SV=1	454,789	5,91E+06	7,78E+05	3,19E+05	5,38E+06	9,17E+05	1,21E+06	5,91E+06	2,56E+06	2,99E+05	4,43E+07	1,59E+06	1,40E+06
F1NG39_CHICK	tr F1NG39 F1NG39_CHICK Unconventional myosin-Ic OS=Gallus gallus GN=MYO1C PE=3 SV=1	2465,316	3,84E+07	2,49E+06	4,20E+05	3,43E+07	6,04E+05	9,47E+06	3,84E+07	8,19E+06	3,94E+05	2,82E+08	1,05E+06	1,09E+07
Q49B65_CHICK	tr Q49B65 Q49B65_CHICK EF hand-containing protein 1 OS=Gallus gallus GN=EFHD1 PE=2 SV=1	479,257	1,65E+06	1,44E+06	3,81E+04	3,90E+06	8,60E+05	5,35E+05	1,65E+06	4,74E+06	3,57E+04	3,21E+07	1,50E+06	6,17E+05
EF2_CHICK	sp1Q907051EF2_CHICK Elongation factor 2 OS=Gallus gallus GN=EEF2 PE=1 SV=3	546,49	1,04E+06	3,36E+05	4,37E+05	4,83E+05	5,49E+05	4,80E+05	1,04E+06	1,10E+06	4,10E+05	3,97E+06	9,55E+05	5,53E+05
F1P199_CHICK	tr F1P199 F1P199_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=PPFIBP1 PE=4 SV=1	737,641	6,96E+05	4,57E+00 1,57E+05	1,34E+06	7,48E+05	2,23E+05	7,55E+05	6,96E+05	5,17E+05	1,26E+06	6,15E+07	3,88E+05	8,71E+05
R4GJT7_CHICK	tr R4GJT7 R4GJT7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=1	99,439	3,41E+05	1,12E+05		5,38E+05	5,66E+04	3,44E+04	3,41E+05	3,68E+05	1,08E+04	4,42E+06	9,84E+04	3,97E+04

	Accession	Description	protein_set_sco	abundance NF1	abundance NF2	abundance NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
ACTN1 CHICK		sp/P05094/ACTN1_CHICK_Alpha-actinin-1_OS=Gallus gallus GN=ACTN1_PE=1_SV=3	re 1466.633	1.90E+06	5.47E+05	2 66F+05	1 3 19E+06	2 7.49E+04	3 3.48F+05	_NF1 1 90F+06	_NF2 1.80E+06	_NF3 2.49F+05	_INF1 2.62E±07		_INF3 4.02E+05
HNRDL_CHICK		sp105051721HNRDL_CHICK Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Gallus gallus GN=HNRPDI PE=2 SV=1	102,492	2,79E+04	3,67E+05	1,44E+05	1,96E+05	4,75E+05	2,83E+05	2,79E+04	1,21E+06	1,35E+05	1,61E+06	8,26E+05	3,27E+05
F1P5K0_CHICK		tr F1P5K0 F1P5K0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=PTBP1 PE=4 SV=2	392,314	9,33E+05	1,25E+06	2,10E+06	6,66E+05	2,12E+06	1,42E+06	9,33E+05	4,10E+06	1,97E+06	5,48E+06	3,68E+06	1,64E+06
ACTN2_CHICK		sp P20111 ACTN2_CHICK Alpha-actinin-2 OS=Gallus gallus GN=ACTN2 PE=2 SV=1	322,039	4,75E+05	7,93E+04	9,21E+03	6,21E+05	2,17E+04	3,40E+04	4,75E+05	2,61E+05	8,64E+03	5,11E+06	3,77E+04	3,92E+04
R9PXM6_CHICK		tr R9PXM6 R9PXM6_CHICK Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B' OS=Gallus gallus GN=SNRPB PE=4 SV=1	95,391	1,70E+04		6,46E+04	7,82E+04			1,70E+04	4,38E+04	6,06E+04	6,44E+05	1,39E+04	1,08E+04
E1C1C3_CHICK		tr E1C1C3 E1C1C3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=PPFIBP1 PE=4 SV=2	732,732	7,00E+05	1,57E+05	1,30E+06	6,88E+05	2,23E+05	7,00E+05	7,00E+05	5,17E+05	1,22E+06	5,67E+06	3,88E+05	8,07E+05
R4GJU4_CHICK		tr R4GJU4 R4GJU4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=DMTN PE=4 SV=1	130,537	1,44E+05		6,25E+04	1,57E+05		3,21E+04	1,44E+05	4,38E+04	5,86E+04	1,30E+06	1,39E+04	3,70E+04
F1NCS2_CHICK		tr F1NCS2 F1NCS2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=EWSR1 PE=4 SV=2	172,73	1,95E+05	1,53E+04	2,16E+04	1,79E+05		2,80E+04	1,95E+05	5,03E+04	2,02E+04	1,47E+06	1,39E+04	3,23E+04
R4GHN9_CHICK		tr R4GHN9 R4GHN9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LUZP1 PE=4 SV=1	253,013	1,59E+05		2,43E+04	9,88E+04	1,50E+04	5,03E+04	1,59E+05	4,38E+04	2,28E+04	8,13E+05	2,60E+04	5,80E+04
Q6EE30_CHICK		tr Q6EE30 Q6EE30_CHICK Eukaryotic translation elongation factor 1 OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	111,292	2,96E+05	6,56E+04		3,92E+05	2,49E+04		2,96E+05	2,16E+05	1,08E+04	3,22E+06	4,33E+04	1,08E+04
E1C218_CHICK		tr E1C218 E1C218_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=DOCK7 PE=4 SV=2	2729,247	1,07E+07	4,45E+05	2,05E+05	9,41E+06	2,79E+05	7,50E+05	1,07E+07	1,46E+06	1,92E+05	7,75E+07	4,85E+05	8,65E+05
F1NAU1_CHICK		tr F1NAU1 F1NAU1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=GPC4 PE=3 SV=2	505,917	1,64E+06	1,88E+05	7,95E+04	1,05E+05		7,74E+04	1,64E+06	6,18E+05	7,45E+04	8,60E+05	1,39E+04	8,93E+04
F1NJF0_CHICK		tr F1NJF0 F1NJF0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=C1QBP PE=4 SV=2	108,254	3,19E+05	1,09E+05	4,58E+04	3,99E+05	7,79E+04	4,37E+04	3,19E+05	3,60E+05	4,29E+04	3,28E+06	1,35E+05	5,04E+04
Q5ZME1_CHICK		tr Q5ZME1 Q5ZME1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HNRNPA2B1 PE=2 SV=1	536,06	2,79E+05	2,02E+06	1,45E+06	6,35E+04	1,13E+06	5,09E+05	2,79E+05	6,64E+06	1,36E+06	5,22E+05	1,97E+06	5,87E+05
H9L1A3_CHICK		tr H9L1A3 H9L1A3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC100859076 PE=4 SV=2	136,613	1,29E+05	2,27E+05	2,88E+05	1,35E+05	3,83E+05	1,72E+05	1,29E+05	7,47E+05	2,70E+05	1,11E+06	6,66E+05	1,99E+05
F1NJT3_CHICK		tr F1NJT3 F1NJT3_CHICK Fibronectin OS=Gallus gallus GN=FN1 PE=4 SV=1	1064,233	5,29E+06	8,00E+05	4,46E+05	3,88E+05	4,15E+05	6,28E+04	5,29E+06	2,63E+06	4,18E+05	3,19E+06	7,21E+05	7,25E+04
E1BSD9_CHICK		tr E1BSD9 E1BSD9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=PDHX PE=3 SV=2	161,22		1,14E+05		2,64E+05	3,47E+04		1,44E+04	3,74E+05	1,08E+04	2,18E+06	6,03E+04	1,08E+04
E1BRL9_CHICK		tr E1BRL9 E1BRL9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SRSF7 PE=4 SV=2	135,8	6,98E+05	1,60E+05	1,99E+05	2,66E+05	4,10E+05	1,00E+05	6,98E+05	5,26E+05	1,86E+05	2,19E+06	7,13E+05	1,16E+05
F1NY54_CHICK		tr F1NY54 F1NY54_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=THRAP3 PE=4 SV=2	244,009	2,61E+05	4,02E+05	5,36E+05	1,10E+05	6,94E+03	6,95E+04	2,61E+05	1,32E+06	5,03E+05	9,04E+05	1,21E+04	8,02E+04
E1C2M8_CHICK		tr E1C2M8 E1C2M8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=GULP1 PE=4 SV=2	106,386	1,42E+05	1,27E+05	1,10E+05	1,74E+05	1,04E+05	1,27E+05	1,42E+05	4,19E+05	1,03E+05	1,43E+06	1,81E+05	1,47E+05
F1P010_CHICK		tr F1P010 F1P010_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ARPC4 PE=4 SV=2	212,035	1,69E+06	7,08E+05	1,26E+05	2,00E+06	2,67E+05	5,39E+05	1,69E+06	2,33E+06	1,18E+05	1,64E+07	4,64E+05	6,21E+05
E1C866_CHICK		tr E1C866 E1C866_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.50010 PE=4 SV=2	281,067	4,22E+05	3,98E+05	4,94E+05	2,88E+05	5,30E+05	4,31E+05	4,22E+05	1,31E+06	4,64E+05	2,37E+06	9,22E+05	4,97E+05
GRP78_CHICK		sp Q90593 GRP78_CHICK 78 kDa glucose-regulated protein OS=Gallus gallus GN=HSPA5 PE=1 SV=1	841,57	1,97E+06	2,17E+06	1,40E+06	1,77E+06	2,73E+06	1,52E+06	1,97E+06	7,14E+06	1,31E+06	1,46E+07	4,75E+06	1,75E+06
E1BSG5_CHICK		tr E1BSG5 E1BSG5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.53757 PE=4 SV=2	199,09	1,30E+05	1,88E+05	2,85E+05	3,71E+04	8,32E+04	1,62E+05	1,30E+05	6,17E+05	2,67E+05	3,05E+05	1,45E+05	1,87E+05
Q8AWI4_CHICK		tr Q8AWI4 Q8AWI4_CHICK Alpha-tropomyosin 2 OS=Gallus gallus GN=TPM1 PE=2 SV=1	887,733	4,11E+07	1,59E+07	3,66E+06	4,15E+07	6,20E+06	1,50E+07	4,11E+07	5,23E+07	3,43E+06	3,41E+08	1,08E+07	1,73E+07
F1P4D9_CHICK		tr F1P4D9 F1P4D9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=MYO1E PE=3 SV=2	991,036	4,33E+06	2,78E+05	8,13E+04	3,40E+06	1,51E+05	1,67E+05	4,33E+06	9,14E+05	7,63E+04	2,80E+07	2,62E+05	1,93E+05
Q9I8J4_CHICK		tr Q9I8J4 Q9I8J4_CHICK Smoothelin-C OS=Gallus gallus GN=Smtn PE=2 SV=1	362,56	1,35E+06	1,97E+05	1,26E+05	1,11E+06	2,43E+04	3,04E+05	1,35E+06	6,48E+05	1,18E+05	9,15E+06	4,22E+04	3,50E+05
FINPSI_CHICK		tr FINP51 FINP51_CHICK Lamin-B2 OS=Gallus gallus GN=LMINB2 PE=3 SV=1	128,972	6,14E+07	9,93E+07	1,72E+08	3,24E+04	9,85E+07	1,29E+08	6,14E+07	3,27E+08	1,61E+08	2,66E+05	1,/1E+08	1,49E+08
CAZA1_CHICK		PE=1 SV=1	589,172	5,65E+06	2,72E+06	5,94E+05	6,79E+06	8,18E+05	1,67E+06	5,65E+06	8,94E+06	5,57E+05	5,59E+07	1,42E+06	1,93E+06
E1C6R7_CHICK		tr E1C6R7 E1C6R7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RAI14 PE=4 SV=2	669,502	2,39E+05	7,94E+06	1,27E+07	5,94E+06	7,44E+06	9,70E+06	2,39E+05	2,61E+07	1,19E+07	4,89E+07	1,29E+07	1,12E+07
Q91005_CHICK		SV=1 t=(2007201000720_CHICK Alpha tronomyosin O'crani OS-Gallus gallus GN=dIplid=11M PE=S t=(2007201000720_CHICK Alpha tronomyosin OC=Callus gallus BE=2 SV=1	770,197	4,57E+07	2,03E+07	4,66E+06	4,64E+07	7,80E+06	1,67E+07	4,57E+07	6,69E+07	4,37E+06	3,82E+08	1,36E+07	1,93E+07
490739_CHICK		tr 057117 057117 CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCIMR04 5x22 PE-2	004,703	4,052+07	1,000+07	5,450700	3,072707	3,041700	1,036107	4,052107	3,200707	3,246700	3,021700	1,020707	1,000-107
Q5ZLJ7_CHICK		SV=1	1031,911	5,50E+07	2,29E+07	4,29E+06	6,03E+07	7,43E+06	1,39E+07	5,50E+07	7,55E+07	4,02E+06	4,96E+08	1,29E+07	1,61E+07
F1P1P6_CHICK		tr F1P1P6 F1P1P6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SMTN PE=4 SV=2	469,509	1,44E+06	1,93E+05	1,11E+05	1,08E+06	1,58E+04	2,74E+05	1,44E+06	6,34E+05	1,04E+05	8,88E+06	2,74E+04	3,16E+05

Accession	Description	protein_set_sco	abundance_NF1	abundance_NF2	abundance_NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundanc	e raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
F1NGA2_CHICK	tr F1NGA2 F1NGA2_CHICK ATP synthase subunit alpha OS=Gallus gallus GN=ATP5A1W PE=3 SV=2	209,019	1,02E+05	1,63E+05	7,04E+04	1,28E+05	2,25E+05	4,38E+04	1,02E+05	5,36E+05	6,60E+04	1,05E+06	3,90E+05	5,05E+04
Q5ZLY3_CHICK	tr Q5ZLY3 Q5ZLY3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TMOD3 PE=2 SV=1	730,669	7,80E+06	4,00E+06	4,76E+05	9,25E+06	1,11E+06	2,25E+06	7,80E+06	1,32E+07	4,46E+05	7,61E+07	1,93E+06	2,60E+06
A0M8U0_CHICK	tr A0M8U0 A0M8U0_CHICK Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, alpha 2 OS=Gallus gallus GN=CAPZA2 PE=3 SV=1	346,917	5,68E+06	2,02E+06	7,10E+05	4,99E+06	1,03E+06	1,42E+06	5,68E+06	6,63E+06	6,66E+05	4,11E+07	1,79E+06	1,64E+06
F1P555_CHICK	tr F1P555 F1P555_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SFPQ PE=4 SV=2	547,441	7,88E+05	1,01E+06	1,04E+06	2,25E+05	2,99E+05	4,51E+05	7,88E+05	3,34E+06	9,78E+05	1,85E+06	5,20E+05	5,20E+05
Q90740_CHICK	tr Q90740 Q90740_CHICK Alpha-tropomyosin OS=Gallus gallus PE=3 SV=1	1417,214	6,40E+07	3,21E+07	9,94E+06	6,25E+07	1,26E+07	2,95E+07	6,40E+07	1,06E+08	9,32E+06	5,14E+08	2,18E+07	3,40E+07
CAPZB_CHICK	sp P14315 CAPZB_CHICK F-actin-capping protein subunit beta isoforms 1 and 2 OS=Gallus gallus GN=CAPZB PE=1 SV=3	963,801	6,32E+06	4,29E+06	6,90E+05	8,60E+06	1,30E+06	2,46E+06	6,32E+06	1,41E+07	6,47E+05	7,08E+07	2,26E+06	2,84E+06
Q9PSS9_CHICK	tr Q9PSS9 Q9PSS9_CHICK Gallus Gallus mRNA encoding a tropomyosin (probably non-muscle), homologous to a human heat stable cytoskeletal protein having an apparent molecular weight of 36000 Dalton (hscp 36) (Fragment) OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	168,912	4,42E+06	3,81E+05	3,16E+04	2,70E+06	2,88E+05	3,82E+05	4,42E+06	1,25E+06	2,96E+04	2,22E+07	5,01E+05	4,40E+05
F1NEM2_CHICK	tr F1NEM2 F1NEM2_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LSM14A PE=4 SV=1	135,719	2,29E+05	3,33E+05	2,93E+05	8,12E+04	6,57E+04		2,29E+05	1,10E+06	2,75E+05	6,68E+05	1,14E+05	1,08E+04
F1NFC0_CHICK	tr F1NFC0 F1NFC0_CHICK Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Gallus gallus GN=YBX1 PE=4 SV=2	727,469	7,37E+06	1,48E+07	2,67E+07	4,90E+06	2,44E+07	2,41E+07	7,37E+06	4,85E+07	2,50E+07	4,03E+07	4,24E+07	2,78E+07
E1C1Q1_CHICK	tr E1C1Q1 E1C1Q1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=NOLC1 PE=4 SV=2	291,734	3,07E+05	1,02E+05	2,31E+04	2,48E+05	5,92E+04	3,54E+04	3,07E+05	3,35E+05	2,16E+04	2,04E+06	1,03E+05	4,08E+04
F1NCD4_CHICK	tr F1NCD4 F1NCD4_CHICK Myosin-9 OS=Gallus gallus GN=MYH9 PE=3 SV=2	12342,666	1,65E+09	5,17E+08	1,00E+08	1,28E+09	1,65E+08	3,85E+08	1,65E+09	1,70E+09	9,38E+07	1,05E+10	2,88E+08	4,44E+08
Q789A6_CHICK	tr Q789A6 Q789A6_CHICK Nonmuscle myosin heavy chain OS=Gallus gallus GN=MYH10 PE=2 SV=1	9805,292	4,41E+08	1,66E+08	2,58E+07	3,75E+08	5,08E+07	1,04E+08	4,41E+08	5,46E+08	2,42E+07	3,08E+09	8,83E+07	1,20E+08
Q789A5_CHICK	tr Q789A5 Q789A5_CHICK Nonmuscle myosin heavy chain OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	9765,271	4,40E+08	1,65E+08	2,57E+07	3,72E+08	5,04E+07	1,04E+08	4,40E+08	5,43E+08	2,41E+07	3,06E+09	8,76E+07	1,20E+08
трм2_сніск	sp P19352 TPM2_CHICK Tropomyosin beta chain OS=Gallus gallus GN=TPM2 PE=1 SV=1	479,655	2,98E+07	1,31E+07	1,90E+06	2,51E+07	4,26E+06	1,01E+07	2,98E+07	4,33E+07	1,78E+06	2,07E+08	7,40E+06	1,16E+07
F1NW97_CHICK	tr F1NW97 F1NW97_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC100857858 PE=3 SV=2	511,001	2,93E+06	1,40E+06	9,93E+05	2,13E+06	1,25E+06	8,80E+05	2,93E+06	4,62E+06	9,31E+05	1,76E+07	2,17E+06	1,01E+06
1433Z_CHICK	sp Q5ZKC9 1433Z_CHICK 14-3-3 protein zeta OS=Gallus gallus GN=YWHAZ PE=2 SV=1	168,794	5,82E+05	1,79E+05	1,12E+05	3,15E+05	1,82E+05	1,44E+05	5,82E+05	5,90E+05	1,05E+05	2,59E+06	3,16E+05	1,66E+05
Q6J4Y8_CHICK	tr Q6J4Y8 Q6J4Y8_CHICK FUS/TLS OS=Gallus gallus PE=1 SV=1	327,315	2,41E+06	2,04E+05	1,54E+05	1,40E+06	1,37E+05	7,85E+04	2,41E+06	6,72E+05	1,44E+05	1,15E+07	2,38E+05	9,06E+04
D2Z1L9_CHICK	tr D2Z1L9 D2Z1L9_CHICK LIM and SH3 protein 1 OS=Gallus gallus GN=LASP1 PE=2 SV=1	152,603	1,43E+05	1,26E+05	1,48E+04	1,70E+05	4,81E+04	8,79E+04	1,43E+05	4,16E+05	1,39E+04	1,40E+06	8,37E+04	1,01E+05
MLRM_CHICK	sp P02612 MLRM_CHICK Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle major isoform OS=Gallus gallus PE=1 SV=2	1214,034	9,80E+07	5,20E+07	6,19E+06	7,92E+07	2,17E+07	4,19E+07	9,80E+07	1,71E+08	5,81E+06	6,52E+08	3,78E+07	4,83E+07
Q90650_СНІСК	tr Q90650 Q90650_CHICK Rous sarcoma virus transcription enhancer factor II OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	473,765	1,90E+06	5,41E+06	6,87E+06	2,35E+06	7,65E+06	5,86E+06	1,90E+06	1,78E+07	6,44E+06	1,94E+07	1,33E+07	6,76E+06
Q05705_CHICK	tr Q05705 Q05705_CHICK Beta-tropomyosin OS=Gallus gallus GN=BRT-2 PE=2 SV=1	767,346	3,33E+07	1,82E+07	2,91E+06	3,12E+07	5,59E+06	1,20E+07	3,33E+07	5,98E+07	2,73E+06	2,57E+08	9,72E+06	1,39E+07
SRSF1_CHICK	sp Q5ZML3 SRSF1_CHICK Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Gallus gallus GN=SRSF1 PE=1 SV=3	147,503	3,38E+05	8,24E+05	7,05E+05	8,80E+04	4,94E+05	4,00E+05	3,38E+05	2,71E+06	6,61E+05	7,24E+05	8,58E+05	4,62E+05
A0A0A0MQ64_CHICK	tr A0A0A0MQ64 A0A0A0MQ64_CHICK Histone H2B OS=Gallus gallus GN=HIST1H2B5L PE=3 SV=1	237,375	2,10E+06	3,36E+06	1,85E+06	1,83E+06	2,37E+06	5,02E+06	2,10E+06	1,10E+07	1,74E+06	1,51E+07	4,12E+06	5,79E+06
Q5ZMV5_CHICK	tr Q5ZMV5 Q5ZMV5_CHICK Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_1b5 PE=2 SV=1	326,651	6,70E+05	8,72E+05	4,05E+04	1,43E+06	1,19E+05	2,28E+05	6,70E+05	2,87E+06	3,80E+04	1,18E+07	2,08E+05	2,63E+05
GELS_CHICK	sp O93510 GELS_CHICK Gelsolin OS=Gallus gallus GN=GSN PE=2 SV=1	693,165	2,18E+06	3,66E+05	5,64E+04	1,06E+06	4,47E+05	1,33E+05	2,18E+06	1,20E+06	5,29E+04	8,71E+06	7,76E+05	1,54E+05
F1P2J5_CHICK	tr F1P2J5 F1P2J5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=GNB1 PE=4 SV=1	509,907	1,92E+06	3,60E+05	2,42E+05	1,81E+05	1,28E+05	1,65E+05	1,92E+06	1,19E+06	2,27E+05	1,49E+06	2,23E+05	1,91E+05
F1NCF1_CHICK	tr F1NCF1 F1NCF1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=STAU2 PE=4 SV=2	610,704	3,10E+05	2,47E+06	3,28E+06	2,90E+05	1,33E+06	1,56E+06	3,10E+05	8,12E+06	3,08E+06	2,39E+06	2,31E+06	1,80E+06
E1BUU3_CHICK	tr E1BUU3 E1BUU3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SAMD4A PE=4 SV=2	430,148	3,03E+05	1,12E+06	8,63E+05	1,23E+05	5,76E+05	3,94E+05	3,03E+05	3,68E+06	8,09E+05	1,02E+06	1,00E+06	4,55E+05
F1NXR6_CHICK	tr F1NXR6 F1NXR6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC100857858 PE=3 SV=2	661,535	3,22E+06	2,02E+06	1,35E+06	2,59E+06	1,67E+06	1,12E+06	3,22E+06	6,66E+06	1,27E+06	2,13E+07	2,91E+06	1,30E+06
МҮН11_СНІСК	sp P10587 MYH11_CHICK Myosin-11 OS=Gallus gallus GN=MYH11 PE=1 SV=4	1404,755	2,51E+08	6,84E+07	1,23E+07	1,63E+08	2,15E+07	4,94E+07	2,51E+08	2,25E+08	1,15E+07	1,34E+09	3,73E+07	5,70E+07
MARCS_CHICK	SP P15527 MARCS_CHICK Myristoyiated alanine-rich C-kinase substrate US=Galius galius GN=MARCKS PE=1 SV=2	339,046	2,11E+05			1,07E+05			2,11E+05	4,38E+04	1,08E+04	8,81E+05	1,39E+04	1,08E+04
E1C6R9_CHICK	tr E1C6R9 E1C6R9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC770011 PE=4 SV=2	1648,181	2,05E+08	1,06E+08	2,47E+07	1,44E+08	4,61E+07	1,03E+08	2,05E+08	3,49E+08	2,32E+07	1,19E+09	8,01E+07	1,18E+08
ANXA2_CHICK	sp P17785 ANXA2_CHICK Annexin A2 OS=Gallus gallus GN=ANXA2 PE=1 SV=2	418,793	1,85E+06	5,83E+05	1,17E+05	9,42E+05	5,92E+05	2,29E+05	1,85E+06	1,92E+06	1,09E+05	7,75E+06	1,03E+06	2,64E+05
		435,157	5,152+05	2,822+03	0,032+04	3,032+03	1,552+05	4,482+04	3,132+03	5,265-05	5,000-04	3,012+00	2,092+03	5,100+04
F1P026_CHICK	tr +1PU26 +1PU26_CHICK Uncharacterized protein US=Gallus gallus GN=UNC45A PE=4 SV=2	181,103	1,86E+05	3,83E+04		1,15E+05		9,58E+03	1,866+05	1,26E+05	1,08E+04	9,42E+05	1,39E+04	1,11E+04
K4GL23_CHICK	נד איז	230,641	1,05E+05	7,31E+05	5,19E+05	6,41E+04	3,22E+05	4,08E+05	1,05E+05	2,40E+06	4,86E+05	5,28E+05	5,59E+05	4,70E+05
GNAI2_CHICK	gallus GN-GNAI2 PE=2 SV=2	491,243	2,74E+06	5,66E+05	2,84E+04	2,83E+05	2,24E+04	6,10E+04	2,74E+06	1,86E+06	2,66E+04	2,33E+06	3,90E+04	7,03E+04
F1NK75 CHICK	tr F1NK75 F1NK75 CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus gN=2 SV=2	532,63	3,40E+U5 2,89E+07	2,22E+05 1,68E+07	2,21E+04 3,33E+06	2,85E+05 2,19E+07	5,57E+04 5,14E+06	1,51E+05 1,16E+07	3,46E+05 2,89E+07	7,29E+05 5,53E+07	2,07E+04 3,12E+06	2,35E+U6 1,80E+08	9,08E+04 8,93E+06	1,74E+05 1,34E+07
ARP3_CHICK	sp Q90WD0 ARP3_CHICK Actin-related protein 3 OS=Gallus gallus GN=ACTR3 PE=2 SV=1	827,245	5,95E+06	5,26E+06	2,56E+05	6,23E+06	1,50E+06	1,90E+06	5,95E+06	1,73E+07	2,40E+05	5,13E+07	2,61E+06	2,20E+06
F1NXW3_CHICK	tr F1NXW3 F1NXW3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RPS15A PE=3 SV=2	327,29	2,84E+06	1,12E+07	8,25E+06	2,98E+06	1,43E+07	1,63E+07	2,84E+06	3,69E+07	7,74E+06	2,45E+07	2,48E+07	1,88E+07
Q90576_CHICK	tr Q90576 Q90576_CHICK 450 kDa protein (Fragment) OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	226,762	1,41E+05	1,43E+05	2,35E+04	1,58E+05	8,12E+04	8,97E+03	1,41E+05	4,70E+05	2,20E+04	1,30E+06	1,41E+05	1,04E+04

Accession	Description	protein_set_sc	o abundance_NF1	abundance_NF2	abundance_NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
F1NBN9_CHICK	tr F1NBN9 F1NBN9_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=NAA50 PE=4 SV=1	150,614	1,33E+05	2,31E+05	1,82E+05	9,51E+04	3,95E+05	1,20E+05	1,33E+05	7,61E+05	1,70E+05	7,83E+05	6,87E+05	1,38E+05
TBA1_CHICK	sp P02552 TBA1_CHICK Tubulin alpha-1 chain (Fragment) OS=Gallus gallus PE=1 SV=1	716,02	4,77E+06	3,40E+06	1,90E+06	3,47E+06	2,40E+06	1,67E+06	4,77E+06	1,12E+07	1,78E+06	2,85E+07	4,17E+06	1,93E+06
MYL6_CHICK	sp P02607 MYL6_CHICK Myosin light polypeptide 6 OS=Gallus gallus GN=MYL6 PE=1 SV=3	769,358	1,48E+08	9,69E+07	2,64E+07	1,06E+08	3,33E+07	7,67E+07	1,48E+08	3,19E+08	2,47E+07	8,70E+08	5,79E+07	8,85E+07
F1N9J7_CHICK	tr F1N9J7 F1N9J7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC425049 PE=3 SV=1	653,902	4,37E+06	2,54E+06	1,51E+06	2,78E+06	1,98E+06	8,65E+05	4,37E+06	8,37E+06	1,42E+06	2,29E+07	3,44E+06	9,97E+05
F1NHE0_CHICK	tr F1NHE0 F1NHE0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=STAU1 PE=4 SV=2	1004,801	1,37E+06	3,45E+06	5,70E+06	1,45E+06	3,91E+06	4,88E+06	1,37E+06	1,13E+07	5,35E+06	1,19E+07	6,80E+06	5,62E+06
CYR61_CHICK	sp P19336 CYR61_CHICK Protein CYR61 OS=Gallus gallus GN=CYR61 PE=2 SV=1	627,106	1,57E+05	1,35E+06	1,31E+06	1,82E+05	2,96E+06	1,94E+06	1,57E+05	4,44E+06	1,23E+06	1,50E+06	5,14E+06	2,24E+06
F6SU35_CHICK	tr F6SU35 F6SU35_CHICK Ribosomal protein OS=Gallus gallus GN=RPL10A PE=3 SV=1	505,767	1,73E+06	3,68E+06	4,37E+06	1,71E+06	3,98E+06	3,92E+06	1,73E+06	1,21E+07	4,09E+06	1,41E+07	6,93E+06	4,53E+06
ACT5_CHICK	sp P53478 ACT5_CHICK Actin, cytoplasmic type 5 OS=Gallus gallus PE=3 SV=1	2633,964	3,66E+08	2,70E+08	8,33E+07	2,56E+08	9,79E+07	2,14E+08	3,66E+08	8,88E+08	7,81E+07	2,11E+09	1,70E+08	2,47E+08
F1NS33_CHICK	tr F1NS33 F1NS33_CHICK Actin, cytoplasmic 1 OS=Gallus gallus GN=AC1B PE=1 SV=1	2633,964 809,966	3,65E+08 5,67E+06	2,72E+08 2,18E+06	8,35E+07 3,21E+05	2,57E+08 3,47E+06	2,97E+05	2,15E+08 6,81E+05	3,65E+08 5,67E+06	8,94E+08 7,19E+06	7,84E+07 3,01E+05	2,11E+09 2,86E+07	1,70E+08 5,17E+05	2,47E+08 7,86E+05
Q5ZIZ5_CHICK	tr Q5ZIZ5 Q5ZIZ5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=NONO PE=2 SV=1	120,012	1,71E+05	2,28E+05	2,14E+05	6,58E+04	6,88E+04	3,13E+04	1,71E+05	7,49E+05	2,01E+05	5,41E+05	1,20E+05	3,61E+04
F1NEF2_CHICK	tr F1NEF2 F1NEF2_CHICK T-complex protein 1 subunit theta OS=Gallus gallus GN=CCT8 PE=3 SV=2	156,778	9,78E+04	1,02E+05	1,44E+05	1,15E+05	5,05E+04	4,80E+04	9,78E+04	3,36E+05	1,35E+05	9,46E+05	8,78E+04	5,54E+04
F1NW48_CHICK	tr F1NW48 F1NW48_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ACTR3B PE=3 SV=1	313,013	1,52E+06	1,79E+06	3,37E+04	1,75E+06	3,91E+05	3,79E+05	1,52E+06	5,90E+06	3,16E+04	1,44E+07	6,80E+05	4,37E+05
F1NHD1_CHICK	tr F1NHD1 F1NHD1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=STAU1 PE=4 SV=2	1019,434	1,33E+06	3,56E+06	5,77E+06	1,43E+06	3,91E+06	4,93E+06	1,33E+06	1,17E+07	5,41E+06	1,18E+07	6,80E+06	5,69E+06
F1P476_CHICK	tr F1P476 F1P476_CHICK Actin, aortic smooth muscle OS=Gallus gallus GN=ACTA2 PE=3 SV=2	1870,695	2,07E+08	1,90E+08	5,53E+07	1,59E+08	6,14E+07	1,41E+08	2,07E+08	6,24E+08	5,19E+07	1,31E+09	1,07E+08	1,63E+08
E1C0K5_CHICK	tr E1C0K5 E1C0K5_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=MFGE8 PE=4 SV=2	656,343	9,50E+06	7,21E+06	3,93E+05	2,09E+06	8,34E+05	7,75E+05	9,50E+06	2,37E+07	3,69E+05	1,72E+07	1,45E+06	8,94E+05
E1C7K1_CHICK	tr E1C7K1 E1C7K1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=FAM98B PE=4 SV=2	147,195	9,89E+04	4,42E+05	6,79E+05	1,20E+05	6,97E+05	5,81E+05	9,89E+04	1,45E+06	6,37E+05	9,91E+05	1,21E+06	6,70E+05
F1NMP3_CHICK	tr F1NMP3 F1NMP3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TUBA8 PE=3 SV=1	331,165	9,94E+05	1,27E+06	6,82E+05	8,60E+05	1,02E+06	5,31E+05	9,94E+05	4,19E+06	6,40E+05	7,08E+06	1,77E+06	6,12E+05
HS90A_CHICK	sp P11501 HS90A_CHICK Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Gallus gallus GN=HSP90AA1 PE=3 SV=3	147,456	3,12E+05	1,21E+05	7,87E+03	1,57E+05	4,93E+04	1,73E+04	3,12E+05	3,98E+05	7,38E+03	1,29E+06	8,58E+04	1,99E+04
1433T_CHICK	sp Q5ZMD1 1433T_CHICK 14-3-3 protein theta OS=Gallus gallus GN=YWHAQ PE=1 SV=1	401,254	1,11E+06	1,04E+06	4,57E+05	6,48E+05	8,21E+05	7,34E+05	1,11E+06	3,43E+06	4,29E+05	5,33E+06	1,43E+06	8,47E+05
F1NW64_CHICK	tr F1NW64 F1NW64_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TPX2 PE=4 SV=2	126,446	1,76E+05	4,22E+04	2,86E+05	7,25E+04	2,07E+04	1,78E+05	1,76E+05	1,39E+05	2,68E+05	5,97E+05	3,60E+04	2,06E+05
E1BXS2_CHICK	tr E1BXS2 E1BXS2_CHICK Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 OS=Gallus gallus GN=GNAl1 PE=4 SV=2	238,131	9,36E+05	3,17E+05		1,41E+05	2,24E+04	4,04E+04	9,36E+05	1,04E+06	1,08E+04	1,16E+06	3,90E+04	4,66E+04
E1C453_CHICK	tr E1C453 E1C453_CHICK Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Gallus gallus GN=HNRNPK PE=4 SV=1	777,416	1,37E+06	2,46E+06	2,75E+06	5,98E+05	1,38E+06	1,10E+06	1,37E+06	8,10E+06	2,58E+06	4,92E+06	2,40E+06	1,27E+06
E1C892_CHICK	tr E1C892 E1C892_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=MRPL46 PE=4 SV=2	209,251	1,43E+04	1,79E+05	8,23E+04	3,32E+04	3,80E+05	9,25E+04	1,43E+04	5,90E+05	7,71E+04	2,73E+05	6,60E+05	1,07E+05
АСТС_СНІСК	sp P68034 ACTC_CHICK Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Gallus gallus GN=ACTC1 PE=3 SV=1	1132,657	2,09E+08	1,99E+08	5,45E+07	1,50E+08	6,29E+07	1,42E+08	2,09E+08	6,56E+08	5,11E+07	1,23E+09	1,09E+08	1,64E+08
F1NWZ3_CHICK	tr F1NWZ3 F1NWZ3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=NUFIP2 PE=4 SV=2	356,57	5,15E+04	6,39E+05	4,70E+05	3,19E+04	4,83E+05	4,98E+05	5,15E+04	2,10E+06	4,41E+05	2,63E+05	8,39E+05	5,74E+05
F1NDA3_CHICK	tr F1NDA3 F1NDA3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=2	142,29	1,08E+04	2,63E+05	2,63E+05	1,43E+04	2,22E+05	2,14E+05	1,08E+04	8,66E+05	2,46E+05	1,17E+05	3,86E+05	2,47E+05
E1C8W6_CHICK	tr E1C8W6 E1C8W6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TCOF1 PE=4 SV=2	450,06	1,42E+06	1,31E+06	7,82E+04	1,02E+06	5,81E+05	3,47E+05	1,42E+06	4,30E+06	7,33E+04	8,37E+06	1,01E+06	4,00E+05
F1NMQ4_CHICK	tr F1NMQ4 F1NMQ4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TRMT10C PE=4 SV=2	161,321	1,61E+04	3,55E+05	4,55E+04	6,49E+04	5,67E+05	2,64E+05	1,61E+04	1,17E+06	4,27E+04	5,34E+05	9,86E+05	3,04E+05
E1BTE0_CHICK	tr E1BTE0 E1BTE0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SSBP1 PE=3 SV=2	404,649	7,48E+05	4,10E+06	1,12E+05	2,74E+06	1,54E+06	4,21E+05	7,48E+05	1,35E+07	1,05E+05	2,26E+07	2,68E+06	4,86E+05
F1NYI3_CHICK	tr F1NYI3 F1NYI3_CHICK tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Gallus gallus GN=C22ORF28 PE=3 SV=2	1218,858	2,34E+06	6,12E+06	4,75E+06	2,45E+06	6,47E+06	4,25E+06	2,34E+06	2,01E+07	4,45E+06	2,02E+07	1,13E+07	4,90E+06
GSTM2_CHICK	sp P20136 GSTM2_CHICK Glutathione S-transferase 2 OS=Gallus gallus GN=GSTM2 PE=1 SV=4	106,35	8,09E+04	1,21E+05	2,82E+04	3,26E+04	2,04E+04	1,46E+04	8,09E+04	3,98E+05	2,65E+04	2,69E+05	3,55E+04	1,68E+04
Q90846_CHICK	tr Q90846 Q90846_CHICK G protein OS=Gallus gallus GN=Galpa i3-o PE=2 SV=1	290,224	1,06E+06	3,17E+05		1,61E+05	2,24E+04	4,04E+04	1,06E+06	1,04E+06	1,08E+04	1,33E+06	3,90E+04	4,66E+04
Q5F3A3_CHICK	tr Q5F3A3 Q5F3A3_CHICK Putative uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_25f13 PE=2 SV=1	389,304	1,48E+06	1,36E+06	7,82E+04	9,88E+05	5,81E+05	3,47E+05	1,48E+06	4,47E+06	7,33E+04	8,13E+06	1,01E+06	4,00E+05
Е1С8ҮЗ_СНІСК	tr E1C8Y3 E1C8Y3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ARPC3 PE=4 SV=2	216,855	1,68E+06	1,34E+06	4,99E+04	1,03E+06	2,98E+05	6,78E+05	1,68E+06	4,42E+06	4,68E+04	8,48E+06	5,18E+05	7,82E+05
F1NZD3_CHICK	tr F1NZD3 F1NZD3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RBMX PE=4 SV=1	320,793	7,59E+04	8,03E+05	1,04E+06	1,10E+05	6,55E+05	6,53E+05	7,59E+04	2,64E+06	9,76E+05	9,01E+05	1,14E+06	7,53E+05
F1P360_CHICK	tr F1P360 F1P360_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=CKAP4 PE=4 SV=2	822,085	8,98E+05	2,34E+06	1,01E+06	9,71E+05	1,79E+06	1,62E+06	8,98E+05	7,70E+06	9,52E+05	7,99E+06	3,11E+06	1,86E+06
ТВВ5_СНІСК	sp P09653 TBB5_CHICK Tubulin beta-5 chain OS=Gallus gallus PE=3 SV=1	656,093	2,35E+06	3,74E+06	2,93E+06	2,19E+06	2,07E+06	2,27E+06	2,35E+06	1,23E+07	2,74E+06	1,80E+07	3,60E+06	2,62E+06
F1NN51_CHICK	tr F1NN51 F1NN51_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=FXR1 PE=4 SV=1	503,124	1,70E+06	1,48E+06	1,78E+06	4,71E+05	1,11E+06	7,66E+05	1,70E+06	4,87E+06	1,66E+06	3,88E+06	1,92E+06	8,84E+05
Q5ZL80_CHICK	tr Q5ZL80 Q5ZL80_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=HNRNPM PE=2 SV=1	703,559	6,46E+05	2,00E+06	1,41E+06	6,73E+05	2,06E+06	1,59E+06	6,46E+05	6,57E+06	1,33E+06	5,54E+06	3,58E+06	1,83E+06
E1C270_CHICK	tr E1C270 E1C270_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus PE=4 SV=1	225,895	2,16E+05	2,37E+06	1,46E+06	6,78E+05	2,51E+06	2,00E+06	2,16E+05	7,81E+06	1,37E+06	5,58E+06	4,36E+06	2,30E+06
E1C2C3_CHICK	tr E1C2C3 E1C2C3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SF3B1 PE=4 SV=1	110,506	8,20E+04	4,37E+04	1,51E+04	4,26E+04	6,00E+03	7,56E+03	8,20E+04	1,44E+05	1,41E+04	3,51E+05	1,04E+04	8,72E+03

Accession	Description	protein_set_sco	abundance NF1	abundance NF2	abundance NF3	abundance_INF	abundance_INF	abundance_INF	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance	raw_abundance
RAGETE CHICK	tr R4GET6 R4GET6 CHICK Lincharacterized protein OS=Gallus gallus RE=4 SV=1	re 250.017	6.64E+04	9 195+05	2 685+05	1 825+05	2	3	_NF1	_NF2	_NF3	_INF1	_INF2	_INF3
R4GJZ4_CHICK	tr R4GJZ4 R4GJZ4_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=PURA PE=4 SV=1	305,072	4,20E+05	4,29E+06	1,64E+06	1,02E+06	6,66E+06	1,45E+06	4,20E+05	1,41E+07	1,54E+06	8,39E+06	1,16E+07	1,67E+06
F1NLD3_CHICK	tr F1NLD3 F1NLD3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=Gga.53205 PE=4 SV=2	208,533	5,51E+04	3,40E+05	2,32E+05	3,89E+04	2,34E+05	2,76E+05	5,51E+04	1,12E+06	2,17E+05	3,20E+05	4,06E+05	3,18E+05
DDX6_CHICK	sp Q5ZKB9 DDX6_CHICK Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS=Gallus gallus GN=DDX6 PF=2 SV=1	159,118	4,94E+05	3,86E+05	5,61E+05	2,03E+05	4,64E+05	2,65E+05	4,94E+05	1,27E+06	5,26E+05	1,67E+06	8,07E+05	3,05E+05
твв7_сніск	sp P09244 TBB7_CHICK Tubulin beta-7 chain OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	1317,699	7,88E+06	9,77E+06	7,79E+06	5,85E+06	5,05E+06	5,64E+06	7,88E+06	3,22E+07	7,31E+06	4,81E+07	8,79E+06	6,51E+06
R4GFT7_CHICK	tr R4GFT7 R4GFT7_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=SPATS2 PE=4 SV=1	509,947	1,38E+05	9,54E+05	1,02E+06	2,42E+05	1,25E+06	9,12E+05	1,38E+05	3,14E+06	9,59E+05	1,99E+06	2,17E+06	1,05E+06
1433G_CHICK	sp Q5F3W6 1433G_CHICK 14-3-3 protein gamma OS=Gallus gallus GN=YWHAG PE=1 SV=1	103,747	2,85E+05	4,14E+05	1,88E+05	1,74E+05	3,05E+05	2,90E+05	2,85E+05	1,36E+06	1,77E+05	1,43E+06	5,30E+05	3,34E+05
твв2_сніск	sp P32882 TBB2_CHICK Tubulin beta-2 chain OS=Gallus gallus PE=1 SV=1	1254,63	6,28E+06	8,63E+06	6,91E+06	4,81E+06	4,54E+06	4,99E+06	6,28E+06	2,84E+07	6,48E+06	3,96E+07	7,90E+06	5,75E+06
F1NYB1_CHICK	tr F1NYB1 F1NYB1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=TUBB4B PE=3 SV=2	1248,964	6,24E+06	8,71E+06	6,93E+06	4,83E+06	4,53E+06	5,12E+06	6,24E+06	2,87E+07	6,50E+06	3,98E+07	7,88E+06	5,91E+06
G1K338_CHICK	tr G1K338 G1K338_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC768337 PE=3 SV=1	1257,785	6,34E+06	8,80E+06	7,00E+06	4,89E+06	4,64E+06	5,08E+06	6,34E+06	2,89E+07	6,56E+06	4,02E+07	8,07E+06	5,85E+06
E1BZE6_CHICK	tr E1BZE6 E1BZE6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC100859627 PE=4 SV=2	604,896	7,94E+05	2,46E+06	2,76E+06	5,62E+05	1,54E+06	1,78E+06	7,94E+05	8,09E+06	2,59E+06	4,62E+06	2,67E+06	2,06E+06
F1NZ86_CHICK	tr F1NZ86 F1NZ86_CHICK Stress-70 protein, mitochondrial OS=Gallus gallus GN=HSPA9 PE=3 SV=1	473,747	4,36E+05	1,51E+06	1,36E+06	4,30E+05	1,40E+06	1,74E+06	4,36E+05	4,96E+06	1,27E+06	3,53E+06	2,43E+06	2,01E+06
Q90706_CHICK	tr Q90706 Q90706_CHICK CLE7 OS=Gallus gallus GN=CLE7 PE=2 SV=1	703,774	9,56E+05	6,28E+06	4,53E+06	7,63E+05	4,76E+06	5,17E+06	9,56E+05	2,07E+07	4,25E+06	6,28E+06	8,28E+06	5,96E+06
H32 CHICK	sp P84229 H32 CHICK Histone H3.2 OS=Gallus gallus GN=H3-I PE=1 SV=2	193.762	4.70E+05	7.11E+05	8.92E+04	3.41E+05	2,03E+04	7.53E+05	4.70E+05	2.34E+06	8.36E+04	2.80E+06	3,53E+04	8.69E+05
E1BW98_CHICK	tr E1BW98 E1BW98_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=GNB4 PE=4 SV=2	189,849	1,14E+06	6,44E+04		1,19E+05			1,14E+06	2,12E+05	1,08E+04	9,80E+05	1,39E+04	1,08E+04
F1P179_CHICK	tr F1P179 F1P179_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=EPRS PE=3 SV=1	98,602	2,42E+07	5,37E+06	1,07E+06	7,02E+06	1,18E+04	3,53E+04	2,42E+07	1,77E+07	9,99E+05	5,78E+07	2,05E+04	4,07E+04
F1NJLO_CHICK	tr F1NJL0 F1NJL0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ATXN2 PE=4 SV=2	546,838	4,37E+05	1,32E+06	1,69E+06	2,73E+05	1,15E+06	1,11E+06	4,37E+05	4,34E+06	1,58E+06	2,25E+06	2,00E+06	1,28E+06
Q5F4B6_CHICK	tr Q5F4B6 Q5F4B6_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=POLDIP3 PE=2 SV=1	143,465	2,22E+04	1,20E+05	2,45E+05	6,77E+04	5,25E+04	1,10E+05	2,22E+04	3,95E+05	2,30E+05	5,57E+05	9,12E+04	1,27E+05
F1NL05_CHICK	tr F1NL05 F1NL05_CHICK Poly [ADP-ribose] polymerase OS=Gallus gallus GN=PARP1 PE=4 SV=2	697,899	2,44E+05	1,81E+06	1,15E+05	9,58E+05	1,41E+05	2,92E+05	2,44E+05	5,96E+06	1,07E+05	7,89E+06	2,45E+05	3,36E+05
F1NZG0_CHICK	tr F1NZG0 F1NZG0_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=MYL1 PE=4 SV=2	248,237	7,78E+06	1,26E+07	3,43E+06	5,87E+06	3,29E+06	9,14E+06	7,78E+06	4,15E+07	3,22E+06	4,83E+07	5,72E+06	1,05E+07
сн60_сніск	sp Q5ZL72 CH60_CHICK 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Gallus gallus GN=HSPD1 PE=1 SV=1	273,929	2,73E+05	3,98E+05	3,54E+04	9,08E+04	2,52E+05	1,38E+05	2,73E+05	1,31E+06	3,32E+04	7,47E+05	4,37E+05	1,60E+05
Q2MCJ7_CHICK	tr Q2MCJ7 Q2MCJ7_CHICK Aquaporin-1 OS=Gallus gallus GN=AQP1 PE=2 SV=1	217,343	9,89E+05	6,86E+04	4,41E+04	1,88E+05	8,62E+03	4,23E+04	9,89E+05	2,26E+05	4,14E+04	1,55E+06	1,50E+04	4,88E+04
F1NZ78_CHICK	tr F1NZ78 F1NZ78_CHICK Alpha-enolase OS=Gallus gallus GN=ENO1 PE=3 SV=2	163,215	1 27E±05	2,39E+05	6,99E+04	5,94E+04	7,09E+04	7,71E+04	1,44E+04	7,85E+05	6,56E+04	4,89E+05	1,23E+05	8,89E+04
Q6W8X3_CHICK	tr Q6W8X3 Q6W8X3_CHICK High mobility group A1b OS=Gallus gallus GN=HMGA1 PE=2 SV=1	123,52	4,87E+04	3,85E+05	1,03E+05	7,99E+04	4,71E+05	1,47E+05	4,87E+04	1,27E+06	9,66E+04	6,58E+05	8,20E+05	1,69E+05
O57613_CHICK	tr 057613 057613_CHICK Paranemin OS=Gallus gallus PE=2 SV=2	78,8	4,29E+04	1,71E+05		9,05E+04	6,85E+03		4,29E+04	5,61E+05	1,08E+04	7,45E+05	1,19E+04	1,08E+04
Q5F491_CHICK	tr Q5F491 Q5F491_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_2a4 PE=2 SV=1	1482,851	7,31E+06	1,21E+07	1,31E+07	3,58E+06	8,50E+06	8,33E+06	7,31E+06	3,97E+07	1,23E+07	2,95E+07	1,48E+07	9,61E+06
Q5ZLB3_CHICK	tr Q5ZLB3 Q5ZLB3_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_601 PE=2 SV=1	693,418	1,00E+06	3,24E+06	2,82E+06	5,57E+05	3,32E+06	2,26E+06	1,00E+06	1,06E+07	2,65E+06	4,59E+06	5,76E+06	2,60E+06
E1C1S1_CHICK	tr E1C1S1 E1C1S1_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=ENPP3 PE=4 SV=2	487,898	1,45E+06	9,56E+04		1,87E+05			1,45E+06	3,15E+05	1,08E+04	1,54E+06	1,39E+04	1,08E+04
A0A0A0MQ61_CHICK	tr A0A0A0MQ61 A0A0A0MQ61_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=LOC100859645 PE=3 SV=1	167,944	3,24E+05	5,96E+05		2,27E+05	3,81E+05		3,24E+05	1,96E+06	1,08E+04	1,86E+06	6,62E+05	1,08E+04
О57348_СНІСК	tr O57348 O57348_CHICK Cellular nucleic acid binding protein OS=Gallus gallus GN=CNBP PE=2 SV=1	207,95	2,18E+04	2,09E+05	1,13E+05	2,76E+04	2,02E+05	1,72E+05	2,18E+04	6,89E+05	1,06E+05	2,27E+05	3,51E+05	1,98E+05
E1C2R8_CHICK	tr E1C2R8 E1C2R8_CHICK Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=DDX17 PE=3 SV=2	876,006	2,60E+06	7,19E+06	4,56E+06	2,11E+06	6,14E+06	3,06E+06	2,60E+06	2,36E+07	4,27E+06	1,73E+07	1,07E+07	3,53E+06
нэкzf8_сніск	tr H9KZF8 H9KZF8_CHICK ATP synthase subunit gamma OS=Gallus gallus GN=ATP5C1 PE=3 SV=2	198,835	1,79E+05	3,55E+05	2,69E+04	1,13E+05	1,72E+05	1,02E+05	1,79E+05	1,17E+06	2,52E+04	9,28E+05	2,98E+05	1,17E+05
1433B_CHICK	sp Q5ZLQ6 1433B_CHICK 14-3-3 protein beta/alpha OS=Gallus gallus GN=YWHAB PE=2 SV=1	123,172	4,49E+05	5,10E+05	2,37E+05	1,53E+05	3,97E+05	3,67E+05	4,49E+05	1,68E+06	2,22E+05	1,26E+06	6,91E+05	4,23E+05
BASP1_CHICK	sp P23614 BASP1_CHICK Brain acid soluble protein 1 homolog OS=Gallus gallus GN=BASP1 PE=2 SV=4	305,66	1,08E+06	8,88E+04		1,62E+05	1,31E+04		1,08E+06	2,92E+05	1,08E+04	1,33E+06	2,28E+04	1,08E+04
Q9W744_CHICK	tr Q9W744 Q9W744_CHICK DEAD-box RNA helicase OS=Gallus gallus PE=2 SV=1	1102,116	4,24E+06	1,10E+07	7,62E+06	3,12E+06	9,40E+06	4,98E+06	4,24E+06	3,60E+07	7,14E+06	2,57E+07	1,63E+07	5,75E+06
	J>p1 YUV0>1 In46_LTICK HISTORE H4 Type VIII US=GalluS galluS GN=H4-VIII PE=3 SV=3 Sp1P84172 IEFTU_CHICK Elongation factor Tu, mitochondrial (Fragment) OS=Gallus gallus CN=TU-TUEN F1_SV=1_SV=1_SV=1_SV=1_SV=1_SV=1_SV=1_SV=	207,645	1,7E+06 9,91E+04	2,61E+05	1,57E+06 8,02E+04	5,58E+05 9,43E+04	5,43E+05 1,09E+05	3,66E+06 5,82E+04	1,77E+06 9,91E+04	6,49E+06 8,60E+05	1,48E+06 7,52E+04	4,59E+06 7,76E+05	9,45E+05 1,89E+05	4,23E+06 6,72E+04
		1	1	1	1	1		1		1	1	1		

Annexe 2 : Rapport de la plateforme de spectrométrie de masse de l'IPBS



Coordonnées de l'équipe :

Mariette Ducatez Charlotte Foret Romain Volmer

ENVT

INRA UMR 1225 IHAP-ENVT 23 Chemin des Capelles 31076 Toulouse cedex FRANCE

2 +33-(0)5-61-19-32-49

 <u>m.ducatez@envt.fr</u>
 <u>c.foret@envt.fr</u>
 <u>m.volmer@envt.fr</u>

Ingénieur en charge de l'étude : Carole Pichereaux/Audrey Gargaros Numéro de Devis : 20160805_CPI Nom du rapport : CPI_AMG_ENVT Mariette Ducatez_S2_160907.doc



Odile Schiltz : Odile.Schiltz@ipbs.fr

Carole Pichereaux : <u>Carole.Pichereaux@ipbs.fr</u> Audrey Gargaros : <u>Audrey.Gargaros@ipbs.fr</u>

Date : 26 septembre 2016

SERIE 2 : Recherche de partenaires de la protéine NS1 dans les cellules de poulet infectées ou non par le virus Influenza A.

ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (ORBITRAP)

Date de réception des échantillons : 04/08/2016 Date envoi des résultats : 06/09/2016

Contexte biologique et Objectifs de l'analyse protéomique :

Projet : "Mécanismes cellulaires d'adaptation des virus influenza : interactions entre protéines virales et aviaires ».

Historique du projet :

<u>2012</u>: Une première réunion avait eu lieu le 22/05/2012 et les objectifs suivants avaient été définis : - <u>Objectif 1</u>: identifier les protéines cellulaires aviaires qui interagissent avec les protéines du virus influenza, l'appât d'interaction est la protéine NS1 (Non Structurale 1, Grippe aviaire)

- <u>Objectif 2</u>: préciser les interactions identifiées à l'échelle du domaine protéique et identifier les déterminants moléculaires de la spécificité de l'hôte

- Objectif 3 (à plus long terme): étudier le mécanisme d'interaction

Un résumé du projet (Appel à projet avec INRA DSA-Janvier 2012) avait été fourni pour préciser le contexte et de la démarche scientifique envisagée à cette époque.

A l'issue de cette réunion, les points suivants avaient été évoqués pour le démarrage du projet:

1. Utilisation de cellules de poulet plutôt que de cellules de caille pour la transfection avec des gènes du virus influenza afin de réduire les problèmes d'identification des protéines aviaires (le génome de la caille n'est pas ou peu connu)

2. Expériences préliminaires à réaliser:

- vérifier que les anticorps anti NS1 disponibles immunoprécipitent

 reproduire les résultats publiés sur cellules humaines pour s'approprier la technique et vérifier les interactions protéiques hôte/virus avec notre souche de virus influenza (Les études d'interactions protéiques sur le modèle mammifère ont plus généralement été menées à bien soit avec des co-IP + Western blot (lorsque les interactions étaient connues), soit avec des tests double hybride, soit avec des 'kinase assays' après pull-down).

3. Test sur cellules aviaires (lignée de fibroblastes de poulet : DF1) : transfection avec un gène influenza, pull-down avec un anticorps spécifique de la protéine grippale d'intérêt, co-IP, gel 1D pour avoir une idée de la complexité de la mixture protéique obtenue. Un contrôle négatif avec anticorps irrelevant sera effectué en parallèle pour que l'on puisse soustraire les protéines non spécifiques. Nous enverrons une photo du gel a l'IPBS pour que l'on puisse décider de la suite: stacking si possible (2 points d'analyse pour cette expérience pilote) ou shotgun si la complexité protéique est trop importante (plus de points d'analyse dans ce cas)

<u>Juillet 2015</u> : Mariette Ducatez a repris contact avec la PF en juillet 2015 pour nous informer des avancées du projet :

- un anticorps anti-NS1 existe (ce n'était pas le cas en 2012) et permet d'immunoprécipiter la protéine influenza NS1 avec ses interacteurs cellulaires.

- des cellules **MDCK** (cellules canines, les plus permissibles au virus influenza, comme contrôle "mammifère") ont été infectées avec un virus influenza, NS1 a été immunoprécipité , puis chargé un gel SDS page avec le lysat immunoprécipité de cellules infectées et de cellules non infectées.

Après coloration au coomassie, il n'y a presque pas de différence entre les 2 conditions (infecté/non infecté (NI)) à l'exception de la bande NS1 (cf photo de gel en pièce jointe, les différents puits correspondent à différents lavages).

Réunion du 09/12/2015 :

Les tests préliminaires ont été effectués sur des cellules canines mais les manips réalisées pour les analyses protéomiques seront réalisées sur deux lots de cellules de volaille (**poulet**) : **non infectées et infectées par le virus influenza**. Les virus complets sont injectés et des IP anti NS1 sont réalisées sur les 2 lignées. La bande correspondant à NS1 est visible sur le gel.

Il existe des interactants connus chez l'homme, qui peuvent servir à valider les premiers candidats. Le numéro d'accession du NS1 recherché est le suivant : **Q1PSTO (Q1PSTO_9INFA)** GU053003. Le nom du virus: A/turkey/Italy/977/1999(H7N1).

Résultats de la série 1 (01/06/2016) :

Analyse de 2 échantillons de cellules de volaille (poulet) non infectées et infectées par le virus influenza. (gel non migré ci-dessus)

Les résultats ont montré 39 protéines présentant à priori un fort intérêt, et 55 protéines un intérêt moindre. Cette série 2 constitue les 2 réplicats biologiques nécessaire aux analyses statistiques pour réaliser de la quantification entre les 2 échantillons de cellules de volaille (poulet) non infectées et infectées par le virus influenza.

Descriptif de l'échantillon : manip du 22/07/2016 et 29/07/2016 réplicats de la série 1

- Organisme : Poulet et Influenza A virus
- Type d'échantillon : Gel stacking
- Electrophorèse :

⊠ 1D □ 2D

Nombre d'échantillons à analyser : 4

Nom Echantillon	Descriptif échantillon
MD01_Ni	Bande gel stacking cellules non infectées par virus
MD02_Ni	Bande gel stacking cellules non infectées par virus
MD03_Inf	Bande gel stacking cellules infectées par virus
MD04_Inf	Bande gel stacking cellules infectées par virus

Analyse protéomique

A. Traitement de l'échantillon :

La bande de gel découpée est traitée selon le protocole utilisé à l'IPBS, pour le lavage, la digestion trypsique et l'extraction des peptides.

Les peptides générés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse.

A. Analyse par Spectrométrie de masse : NanoLC/ESI LTQ-Orbitrap Velos ETD MS/MS

Descriptif des analyses :

L'extrait peptidique sec est repris dans 14µL d'une solution 2% acétonitrile / 0,05% acide trifluoroacétique. Pour l'analyse en MS, 5µl d'extrait peptidique sont injectés et le reste est conservé à -20°C.

Méthode d'acquisition :

OT60000_T1e6_20ITMSMS_160min_LM0_T40_NCS-CHR009

B. Analyse Bioinformatique : validation et quantification des données

Les données brutes ont été obtenues après recherche avec le moteur de recherche MS-Angel dans la banque *Gallus-Gallus et Influenza A virus*

Les listes de protéines ainsi crées sont ensuite validées par le logiciel Proline.

Brièvement, la trypsine/P est utilisée comme enzyme et un clivage manqué est autorisé. L'oxydation des méthionines est définie comme modifications variables et la carbamidométhylation des cystéines est définie comme modification fixe.

La validation des données est effectuée grâce au logiciel Proline. Les peptides et protéines sont validés en générant une banque peptidique aléatoire « decoy », où le seuil de faux positifs (FDR) est fixé à 1%, pour les peptides et les protéines.

Les protéines identifiées avec exactement le même jeu de peptides (samesets) ou avec une partie du même jeu de peptides (subsets) sont regroupées sous formes de listes dans des tableaux Excel.

Les protéines d'un même groupe sont classées selon leur score protéique, leur nombre de séquence peptidiques (spécifiques ou non de la protéine), leur nombre de spectres MSMS qui sont les spectres de fragmentation. Seul un membre du groupe est reporté dans la liste des protéines identifiées, c'est la protéine de 1er rang.

La quantification « Label-free » a été réalisée sur Proline. L'approche « Label-free » se base sur la comparaison des intensités des signaux MS afin d'obtenir l'abondance relative des protéines issues de chaque échantillon. En effet, dans une expérience LC-MS, l'intensité du signal lorsque le peptide est élué de la colonne chromatographique peut être suivi au cours du temps. L'aire sous la courbe du pic chromatographique d'un peptide est linéairement dépendante de sa quantité. L'intégration de cette aire sur l'ensemble de l'analyse chromatographique est la base de l'approche « Label Free ».

Le logiciel Proline réalise une normalisation des données entre tous les échantillons analysés. Cependant, certaines protéines n'ont pas été identifiées et/ou détectées dans certaines conditions. Afin de pouvoir calculer les ratios, les valeurs manquantes ont été remplacées par une valeur de bruit de fond qui est calculée par le centile 1% des intensités brutes de chaque condition.

Nom échantillon	Nom acquisition :	Banque :
	MS data File	GallusGallus
		InfluenzaAvirus
		Job 1028/1030
		Search log :
MD01_Ni1	OECPI160816_01	79890/79892
MD02_Ni2	OECPI160816_03	79887/79891
MD03_Inf1	OECPI160816_06	79883/79889
MD03_Inf1	OECPI160816_08	79879/79884

<u>Résultats</u>

A. <u>Résultats de l'identification</u>

Les interrogations ont été effectuées sur la banque Gallus-Gallus et Influenza A virus

Les protéines identifiées ont été validées automatiquement dans Proline avec les paramètres décrits cidessus et des listes de protéines ont été générées.

Afin d'augmenter la robustesse des résultats, les listes obtenues sont ensuite filtrées afin de ne valider que les protéines identifiées avec au moins 2 peptides et 4 MS/MS (les protéines non validées par les filtres sont grisées dans les tableaux résultats).

Les listes complètes des protéines identifiées pour ces 2 échantillons dans la banque **Gallus-Gallus** sont exportées sous forme de fichiers Excel : 160824 S2 Recherche en banque Gallus Gallus

Le nombre de protéines identifiées dans la banque Gallus-Gallus: MD01_Ni : 214 protéines MD02_Ni: 186 protéines MD03_Inf: 218 protéines MD04_Inf: 177 protéines

Les listes complètes des protéines identifiées pour ces 2 échantillons dans la banque **Influenza Avirus** sont exportées sous forme de fichiers Excel : 160907 S2 Recherche en banque InfluenzaAVirus

Le nombre de protéines identifiées dans la banque Influenza: MD01_Ni : 0 protéines MD02_Ni: 0 protéines MD03_Inf: 402 protéines MD04_Inf: 256 protéines

NB : dans les échantillons MD01 et MD02, NS1 est identifiée mais ne passe pas les filtres de validation.

La liste des protéines identifiées se trouve dans l'onglet proteins sets.

Concernant le nom des colonnes :

- 1 accession = numéro d'accession de la protéine de tête
- 2 description = description de la protéine dans la base de données ciblée
- 3 protein_set_score = score de la protéine identifiée
- 4 #sameset_protein_matches = les protéines qui ont strictement les mêmes peptides
- 5 #subset_protein_matches = les protéines qui ont des peptides en communs
- 6 #sequences = nombre de sequences correspondant à la sequence protéique
- 7 #specific_sequences = séquence peptidique spécifique d'une protéine
- 8 #peptides= nombre de peptides correspondant à la protéine
- 9 #specific_peptides = peptide spécifique d'une protéine
- 10 #peptide_matches = spectre relatif au peptide
- 11 #specific_peptide_matches = spectre relatif au peptide spécifique

B. <u>Résultat de la quantification</u>

Pour la quantification, les résultats de la série 1 ont été integrés afin de réaliser une quantification robuste permettant de réaliser des tests statistiques fiables.

Suite à l'obtention des résultats d'identification, des filtres sont appliqués pour mettre en évidence les protéines variantes en fonction des différentes comparaisons réalisées. Une protéine est donc considérée variante :

- Filtre1 : Si elle est détectée dans 3 sur 3 de ses réplicats biologiques, dans une des deux conditions
- Filtre 2 : lorsque le seuil de significativité du test de Student (p-value) est inférieur à 0.05
- **Filtre 3** : Lorsque son ratio d'expression (moyenne des intensités « condition 1 » / moyenne des intensités « condition 2 ») est supérieur à 2 (rouge) ou inférieur à 0,5 (vert)

Les résultats de l'analyse quantitative sont détaillés dans le fichier Excel : 210916_S2_Quantification_Gallus.xlsx.

Accession	ion Numéro d'accession de la protéine		
Description	Nom de la protéine		
Protein set score	Score de la protéine		
Samset protein matches	protéines qui ont strictement les mêmes peptides		
Subset protein matches	protéines qui ont des peptides en communs		
Sequences	Nombre de séquence qui ont permis de détecter la protéine dans tous les échantillons		
Specific sequences	Nombre de séquence spécifique à la protéine qui ont permis de détecter la protéine dans tous les échantillons		
Peptides	Nombre de peptide qui ont permis de détecter la protéine dans tous les échantillons		
Specific peptides	Nombre de peptide spécifique à la protéine qui ont permis de détecter la protéine dans tous les échantillons		
Peptide matches	Nombre de spectres MS/MS qui ont permis de détecter la protéine dans tous les échantillons		
Specific peptide matches	Nombre de spectres MS/MS spécifique à la protéine qui ont permis de détecter la protéine dans tous les échantillons		
Status « nom condition »	Définit si la protéine a été identifiée dans l'échantillon ou par homologie aux autres échantillons		
Psm count « nom condition »	Le nombre de MS/MS générés est proportionnel à l'abondance relative d'une protéine dans l'échantillon. Cette colonne correspond à la somme du nombre de MS/MS par condition.		
Abundance « nom condition »	Intensité non normalisée correspondant à l'aire sous la courbe des peptides ayant permis d'identifier la protéine.		
Raw abundance « nom condition »	Intensité normalisée correspondant à l'aire sous la courbe des peptides ayant permis d'identifier la protéine. (en grisé : Protéine absente remplacée par bruit de fond pour calcul des ratios)		
Moyenne « nom échantillon »	Moyenne des intensités normalisées/ condition		
Ratio	Rapport des intensités calculées pour chaque protéine entre différentes conditions. (Ratio <0.5 en vert et >2 en rose dans le tableau)		
Student	Permet de vérifier que la variabilité est plus significative entre deux conditions qu'au sein d'un même groupe de données. Dans cette étude, le test de Student est fixé à 5%. (en orange dans le tableau)		
Protéine spécifique d'une condition	Si « X » : Protéine absente dans 3 des réplicats de sa condition		

Dans la liste complète regroupant tous les échantillons 381 protéines ont été identifiées. Parmi ces protéines identifiées toutes ont été quantifiées et ont permis d'identifier les protéines variantes (selon les 3 filtres détaillés page précédente).

Pour la comparaison CELLULES INFECTEES vs CELLULES NON INFECTEES, 14 protéines sont variantes dont 13 surexprimées dans les cellules infectées et 1 sous-exprimées dans les cellules infectées.

Tableaux récapitulatif des protéines variantes :

accession	nom protéine	nom gene	ratio INF/NF	Student
F1NAC8	Uncharacterized protein	SNRPA1	7,42	0,003
F1NME1/	Uncharacterized protein/	HIST1H111R	6,79	0,045
P08287/	Histone H1.11L / Histone H1.01/			
P08284/	Histone H1.11R/ Histone H1.10			
P08288/				
P08286				
F1NBN0	Uncharacterized protein		6,55	0,009
E1C6A9	Uncharacterized protein	CDC5L	6,26	0,016
Q5ZMA2	Pre-mRNA-processing factor 19	PRPF19	5,21	0,026
E1BTS4	Uncharacterized protein	BCAS2	4,45	0,019
Q98TH5	Ribosomal protein S11	cRPS11	3,61	0,026
Q5ZHN7	Uncharacterized protein	RCJMB04_35b4	3,19	0,041
Q5F346	Uncharacterized protein	RCJMB04_34p20	3,12	0,021
F1NF89	40S ribosomal protein S24	RPS24	3,05	0,047
F2Z4K6	Uncharacterized protein	RPL26L1	2,99	0,016
E1C8F7	Uncharacterized protein	RPL24	2,87	0,016
F1NYC0	60S ribosomal protein L35	RPL35	2,81	0,038
E1C0J4	Uncharacterized protein	UPF1	0,27	0,027

Surlignée en jaune, protéine d'intérêt considérée interessante dans la série 1 (surlignée en orange dans la liste triée par Charlotte Foret).

C. Conclusion

Cette série a permis de réaliser deux réplicats techniques de la série 1. Le but de l'étude étant d'identifier les protéines cellulaires aviaires qui interagissent avec les protéines du virus influenza, l'appât d'interaction étant la protéine NS1.

Les interrogations ont donc été effectueés sur les 2 banques aviaire et virale : Gallus-Gallus et Influenza Avirus comme précedemment.

Dans les échantillons infectés, MD03Inf et MD04Inf, la protéine NS1 est identifiée avec respectivement 31 peptides (301 MS/MS) et 25 peptides (129 MS/MS).

Aucune protéine virale n'est identifiée dans les échantillons non infectés ce qui démontre la pureté des échantillons.

La quantification a permis de mettre en évidence 14 protéines variantes (dans Gallus Gallus) entre les échantillons infectés et non infectés.

Annexe 3 : Protocole de transfection à la Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen)

Lipofectamine[®] 2000 Reagent

	Package Contents	Catalog Number 11668-030 Buy Now 11668-027 Buy Now 11668-019 Buy Now 11668-500 Buy Now	Size 0.3 mL vial 0.75 mL vial 1.5 mL vial 15 mL vial		
	Storage Conditions	Store at 4°C (do not free	eze).		
	Required Materials	 Plasmid DNA (0.5–5) Opti-MEM[®] Reduced Eppendorf tubes 	ug/µL stock) Serum Medium		
	Timing	Preparation: 10 minutes Incubation: 5 minutes Final Incubation: 1–3 da	s nys		
Å	Selection Guide	Lipofectamine [®] Reagent Go online to view relate	ed products.		
	Product Description	 Lipofectamine[®] 2000 I for transfecting nuclei cells. 	Reagent is a proprietary formulation c acids into a wide range of eukaryotic		
		 DNA-Lipofectamine[®] serum-free medium s Medium and can be a medium, in the prese 	² 2000 complexes must be made in uch as Opti-MEM [®] Reduced Serum idded directly to cells in culture nce or absence of serum/antibiotic.		
	Important Guidelines	 It is not necessary to remove complexes or change/add medium after transfection. 			
		 Ine amount of Lipotectamine[®] 2000 Keagent required for successful transfection varies depending on the cell type 			

 The amount of Lipofectamine[®] 2000 Reagent required for successful transfection varies depending on the cell type and passage number. Start any new transfection by testing the recommended four concentrations of Lipofectamine[®] 2000 Reagent to determine an optimum amount.

	Online Resources	Visit our product page for additional		
		information and protocols. For support, visit		
		www.lifetechnologies.com/support.		



Learn More

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Protocol Outline

- A. Plate cells so they will be 70–90% confluent at the time of transfection.
- B. Prepare plasmid DNA-lipid complexes.
- C. Add DNA-lipid complexes to cells.

Lipofectamine[®] 2000 DNA Transfection Reagent Protocol

f See page 2 to view a typical DNA transfection procedure.

Component	96-well	24-well	6-well
Final DNA per well	100 ng	500 ng	2500 ng
Final Lipofectamine® 2000 Reagent per well	0.2–0.5 μL	1.0–2.5 μL	5.0–12.5 μL

Co-Transfection of Plasmid DNA and siRNA

Transfect plasmid DNA and siRNA at the same time using Lipofectamine[®] 2000 Reagent by adding 30 pmol (~0.6 μ g) of siRNA per 1 μ g of DNA.

mRNA Transfection

mRNA can be transfected in a 24-well plate using Lipofectamine^ 2000 Reagent by adding 0.5–1 μg of mRNA per well.

Photograph of Expected Results

Scaling Up or Down Transfections

Dimited Product Warranty and Disclaimer Details



Lipofectamine® 2000 DNA Transfection Reagent Protocol

Transfect cells according to the following chart. Volumes are given on a per-well basis. Each reaction mix is sufficient for triplicate (96-well), duplicate (24-well), and single well (6-well) transfections, and accounts for pipetting variations. Adjust the amounts of components according to your tissue culture format. For additional information on scaling your transfection reaction, see page 1.

		Timeline	Steps	Procedure Details				
0			Seed cells to be	Component	96-well	24-well	6-well	
Day	1	1	70–90% confluent at transfection	Adherent cells	$1-4 \times 10^{4}$	$0.5-2 \times 10^{5}$	$0.25 - 1 \times 10^{6}$	
ay 1			Dilute four amounts of Lipofectamine® Reagent in Opti-MEM® Medium	Opti-MEM® Medium	$25 \ \mu L \times 4$	$50 \ \mu L \times 4$	$150 \ \mu L \times 4$	
	2			Lipofectamine [®] 2000 Reagent	1 , 1.5, 2, 2.5 μL	1 2, 3, 4, 5 μL	1 6, 9, 12, 15 μL	
	3	2000	Dilute DNA in Opti-MEM® Medium	Opti-MEM [®] Medium	125 µL	250 µL	700 µL	
				DNA (0.5–5 μg/μL)	2.5 µg	5 µg	14 µg	
			Add diluted DNA to diluted Lipofectamine® 2000 Reagent (1:1 ratio)	Diluted DNA Total	25 µL	50 µL	150 µL	
	4			Diluted Lipofectamine [®] 2000 Reagent	25 µL	50 µL	150 µL	
	5	5	Incubate	Incubate for 5 minutes at	Incubate for 5 minutes at room temperature.			
				Component	96-well	24-well	6-well	
		6	Add DNA-lipid complex to cells	DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL	
	6			Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng	
				Final Lipofectamine [®] 2000 Reagent used per well	0.2–0.5 μL	1.0–2.5 μL	5.0–12.5 μL	
Day 2-4	7		Visualize/analyze transfected cells	Incubate cells for 1–3 days at 37°C. Then analyze transfected cells.				

Annexe 4 : Protocole de Duolink[®] PLA (Sigma - Merck Millipore)
Duolink[®] In Situ

Short Instructions – Fluorescence

1 BLOCKING

Add blocking solution to samples. Incubate.

Remove block

2. PRIMARY ANTIBODIES

Dilute the primary antibodies in appropriate buffer and apply to samples. Incubate.

Wash in suitable buffer for 2 × 5 min

3. PLA® PROBES

Dilute the two PLA probes 1:5 in appropriate buffer and apply to samples. Incubate for 60 min at $+37^{\circ}$ C

Wash in 1x Wash Buffer A for 2 x 5 min

4 LIGATION

Dilute the Ligation stock 1:5 in H₂O. Dilute the Ligase at 1:40 in the solution and apply the mix to samples.

Incubate for 30 min at +37°C

Wash in 1x Wash Buffer A for 2 × 2 min

5 AMPLIFICATION

Dilute the Amplification stock 1:5 in H₂O. Dilute the Polymerase at 1:80 in the solution and apply the mix to samples. Incubate for 100 min at +37°C.

- Wash in 1x Wash Buffer B for 2 × 10 min
- Wash in 0.01x Wash Buffer B for 1 min

6. PREPARATION FOR IMAGING

Mount the samples with Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI, wait for 15 min, and analyze in a fluorescence or confocal microscope.

Note: Use open droplet reactions without a cover slip and perform all incubations in a humidity chamber. Use volumes corresponding to your reaction area, see the Reaction Volume Guide at sigma.com/duolink. Use a freezing block when removing the enzymes from the freezer (-20°C). Washing should be done in a minimum volume of 70 ml on a shaker with gentle orbital shaking.

© 2013 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA and SIGMA-ALDRICH are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. Where bio begins is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC. Content and images are © 2012 Olink AB and used with permission. Duolink and PLA are trademarks of Olink AB.

80017-513642













SIGMA-ALDRICH



Annexe 5 : Liste des anticorps testés en WB non validés

Protéine cible	Description	Fabricant	Espèces cibles	Application	
PI3KR2	Anticorps monoclonal de lapin dirigé contre la sous unité p85β de la PI3K humaine endogène totale.	Cell signaling #4257T	Humain, souris, Rat <i>Croisées: poulet</i>	WB, IP	
EIF2S3	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la sous unité 3γ de EIF2	Aviva system biology #ARP46056	Humain, souris, Rat Croisées: poulet, Vache, chien,cobaye, poisson zèbre, lapin	WB	
SNRPA1	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la SNRPA1 (U2 small nuclear ribonucleoprotein A')	Aviva system biology #ARP40441_T100	Humain, souris, Rat Croisées: poulet, Vache, chien,cobaye, poisson zèbre, lapin	WB, ELISA, IHC	
PRPF19	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre PRPF19 (Pre-mRNA processing factor 19)	Aviva system biology #ARP43158_T100	Humain, souris, Rat Croisées: poulet, Vache, chien,cobaye, poisson zèbre, lapin	WB, IHC	

Annexe 6 : Poster présenté aux XIX^{èmes} Journées Francophones de Virologie (2017)

Mécanismes d'adaptation des virus Influenza A: Etude des interactions entre protéine virale NS1 et protéines cellulaires

Charlotte Foret¹, Romain Volmer¹, Carole Pichereaux², Audrey Gargaros², Mariette F. Ducatez¹

¹ IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France; ² Infrastructure Protéomique de Toulouse, Institut de Pharmacologie et de







Introduction

L'adaptation des virus Influenza A (IAV) aviaires à l'Homme dépend en grande partie de la capacité des protéines virales à interagir avec les protéines cellulaires humaines. En effet, les IAV ont la capacité de détourner la fonction des protéines cellulaires pour permettre ou favoriser leur réplication. Néanmoins, si certaines protéines cellulaires sont relativement bien conservées chez l'Homme et les oiseaux, elles ne sont pas identiques et peuvent donc interagir différemment avec les protéines virales. La protéine non structurale NS1 est un facteur de virulence important pour les IAV et de multiples fonctions lui sont attribuées comme l'échappement à la réponse immunitaire. C'est également une protéine clé de l'adaptation du virus à son hôte.

L'objectif de cette étude est d'identifier et de caractériser les interactions entre NS1 et protéines cellulaires aviaires intervenant dans l'adaptation des virus IA et dans le franchissement de la barrière d'espèce.

Matériel et Méthodes

Co-immunoprecipitation

Infection

- 3,5.107 cellules (DF1 lignée de fibroblastes embryonnaires de poulet) 24h
- Virus Influenza A/turkey/Italy/977/1999 (H7N1) MOI = 3 (Contrôle : Non Infecté NI)

Lyse 8h P.I.

- 10ml de tampon de lyse (Tris HCl pH 7,4 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM,
- NP-40 0,5%, anti-protéases cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Roche) 15 minutes / Rotation / 4°C

Co-IF

- « Pre-clear » : lysat + 40µl billes A/G (Protein A/G PLUS Agarose Immunoprecipitation Reagent - Santa Cruz #sc-2003) - 1h / Rotation / TA
- Lysat + 90µg anticorps (Monoclonal Anti-Influenza A Virus NS1, Clone NS1-1A7 -Bei Resources #NR-44426) - 15h / Rotation / 4°C (rotation) + 80µl billes - 2 h / Rotation / 4°C

Lavages : Tampon de lyse sans NP-40

Elution : Laemmli 2X

Pré-analyse

- Gel SDS-PAGE 10% : 10µl de lysat total (TOT), surnageant après IP (SN) et éluat d'IP (IP) -3µl de marqueur (Mw, ProSieve QuadColor Protein Marker - Ozyme)
- Révélation : Bleu de Coomassie (lecture : ChemiDoc™ XRS+ System BIORAD)

Spectrométrie de masse

Gel préparatif

- Dépôt totalité IP en gel SDS-PAGE (Concentration 0,125M tris, pH 6,8 4% Séparation 0,325M tris, pH8,8 12%)
- Migration de 1cm dans le gel de séparation (conservé en acide acétique)

Préparation des peptides

- 60µl Trypsine modifiée (10ng/µl, 25mM NH4HCO3 Promega) 37°C / 15h
- Extrait peptidique sec + 14µL acétonitrile 2% / acide trifluoroacétique 0,05%

Analyse par nano-LC-MS/MS

5µl d'extrait peptidique : HPLC (Système nanoRS UHPLC - Dionex) couplé au spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific)

Analyse des spectres de masse

- Extraction de la liste de pics : macro Xcalibur Extract_msn.exe (V2.0 SR2 Thermo Fisher Scientific)
 - Alignements avec les bases de données Gallus Gallus et Influenza A (SwissProt-Trembl) : Logiciel Mascot Daemon software (V2.4, Matrix Science)

Test statistique

Résultats

T-test apparié unilatéral des ratios



		<u> </u>						(moyenne)	
Transcriptional repressor - CTCF	CTCF	1,4E+04	2,0E+05	6,9E+04	6,1E+04	1,5E+06	5,6E+05	6,6	0,006
Serine/threonine-protein kinase - VRK1	F1NDK1	2,3E+05	4,4E+04	2,9E+04	9,7E+06	7,5E+05	3,0E+05	23,4	0,010
Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta - PIK3R2 (PI3K)	E1C2C5	1,4E+04	4,4E+04	1,1E+04	6,1E+04	4,2E+05	1,1E+05	8,1	0,010
Protein LYRIC (MTDH : metadherin gene in human)	F1NBN0	6,5E+04	2,0E+05	1,3E+05	8,5E+05	1,1E+06	6,0E+05	7,8	0,013
Ras GTPase-activating-like protein - IQGAP1		1,6E+06	1,0E+06	3,5E+05	1,8E+07	4,0E+06	1,8E+06	6,6	0,014
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 - EIF2S3		2,6E+05	1.7E+05	1,4E+05	3,6E+06	9,0E+05	5,7E+05	7,7	0,019
Aggrecan promoter binding protein	Q45KQ2	2,6E+06	4,5E+05	2,9E+04	1,4E+07	1,6E+06	3,9E+05	7,4	0,022
Guanine nucleotide-binding protein-like 3 isoform X1 - GNL3	F1NLK0	1,4E+04	4,4E+04	1,9E+04	6,1E+04	2,3E+05	3,2E+05	8,7	0,022
U2 small nuclear ribonucleoprotein A' - SNRPA1	F1NAC8	3,7E+04	2,8E+05	8,5E+04	1,2E+06	9,9E+05	8,0E+05	15,0	0,034
Histone H2A-IV	H2A4	1,4E+06	1,5E+06	1,0E+06	7,5E+06	2,7E+06	3,3E+06	3,4	0,035
DNA topoisomerase 1 - TOP1	F1NPT1	5,8E+05	1,4E+06	5,3E+05	6,4E+06	3,3E+06	1,8E+06	5,6	0,042
Cell division cycle 5-like protein - CDC5L	E1C6A9	3,4E+04	3,0E+05	1,9E+05	1,1E+06	1,5E+06	7,1E+05	13,8	0,045
Leucine zipper protein - PTRF	Q90838	6,7E+05	8,1E+05	1,8E+04	3,1E+06	1,3E+06	1,2E+05	4,4	0,051
ADP/ATP translocase 3	Q5ZLG7	1,5E+06	6,4E+05	4,8E+04	1,0E+07	9,6E+05	3,4E+05	5,1	0,054
Histone H1.11R - HIST1H111R	F1NME1	1,0E+06	5,7E+06	2,6E+06	3,3E+07	1,5E+07	1,5E+07	13,6	0,054
Pre-mRNA-processing factor 19 - PRPF19	PRP19	1,3E+05	4,7E+05	5,0E+05	2,4E+06	2,3E+06	1,0E+06	8,5	0,055
Heterochromatin protein 1-binding protein 3- HP1BP3	F1N8H6	2,6E+05	6,6E+05	3,6E+05	3,6E+06	1,2E+06	1,5E+06	6,7	0,057

Résultats de Co-IP : Gel SDS Page révélé en Bleu de Coomassie Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse : 17 protéines détectées significativement dans les éluats (IP) de co-immunoprécipitation NS1, NI vs INF - p-value ≤ 0,05)

Conclusion et perspectives

En conclusion, l'analyse par spectrométrie de masse montre que la protéine non structurale NS1 possède, au moins, 17 partenaires cellulaires aviaires potentiels. Dans un premier temps, les interactions avec cinq de ces protéines seront confirmées ou non (par immunoprécipitations, co-localisation en microscopie confocale et knock-down par interférence à l'ARN siRNA). Ces interactions seront ensuite caractérisées notamment par génération de virus recombinants mutés pour NS1.

Remerciements : Les auteurs remercient Brigitte PERALTA (UMR 1225 IHAP, équipe IHVV) pour son assistance technique et Alexandre LUCAS (UMR1048 I2MC INSERM, Plateau Analyse des Protéines Cellulaires) pour ses conseils.

Financement : Ce projet est financé par le "People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme FP7/2007 - 2013" (agrément REA nº 333624)



ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES SCIENCE DE LA VIE ET DE LA TERRE

Mécanismes cellulaires d'adaptation des virus Influenza A : Interaction entre protéine virale NS1 et protéines cellulaires

Charlotte FORET-LUCAS 12 Décembre 2018

RÉSUMÉ

Les virus influenza A ont été à l'origine de nombreuses pandémies dont quatre ces cent dernières années. Aujourd'hui, nous sommes toujours incapables de prédire l'apparition d'une pandémie. L'adaptation des virus Influenza A (VIA) aviaires à l'Homme dépend en grande partie de la capacité des protéines virales à interagir avec les protéines cellulaires humaines. En effet, les VIA ont la capacité de détourner la fonction des protéines cellulaires pour permettre ou favoriser leur réplication. Néanmoins, si certaines protéines cellulaires sont relativement bien conservées chez l'Homme et les oiseaux, elles ne sont pas identiques et peuvent donc interagir différemment avec les protéines virales

La protéine non structurale NS1 est un facteur de virulence important pour les VIA et de multiples fonctions lui sont attribuées comme l'échappement à la réponse immunitaire. C'est également une protéine particulièrement impliquée dans l'adaptation du virus à son hôte.

L'objectif de cette étude est d'identifier et de caractériser les interactions entre NS1 et protéines cellulaires aviaires pouvant intervenir dans l'adaptation des VIA à l'hôte voire dans le franchissement de la barrière d'espèce.

Dans cette étude nous avons utilisé une approche par co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse qui nous ont permis de sélectionner 17 protéines d'intérêt notamment des facteurs d'initiation de la transcription, de répression de la traduction ou encore d'épissage des pré-ARNm. La suite de l'étude s'est portée sur plusieurs de ces protéines, statistiquement les plus susceptibles d'interagir avec NS1 ou ayant été décrites comme partenaire de NS1 ou d'autres protéines virales en cellules humaines. Nous avons cherché à mettre en évidence l'interaction de ces protéines avec NS1 par des approches de de co-Immunoprécipitation, de colocalisation en microscopie confocale et de *Proximity Ligation Assay* (DuoLink® PLA Technology).

Les résultats bien que préliminaires nous permettent d'envisager prochainement la caractérisation de ces interactions, à l'échelle moléculaire. De plus, le développement de nouveaux outils technologiques tels que la PLA nous permettront d'identifier et caractériser d'autres partenaires de NS1.