



HAL
open science

Etudes structurales et fonctionnelles des protéines virales impliquées dans le trafic intracellulaire du génome du virus de la grippe

Hatice Akarsu

► **To cite this version:**

Hatice Akarsu. Etudes structurales et fonctionnelles des protéines virales impliquées dans le trafic intracellulaire du génome du virus de la grippe. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011131

HAL Id: tel-00011131

<https://theses.hal.science/tel-00011131>

Submitted on 29 Nov 2005

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.

THESE

Pour l'obtention du diplôme de
Docteur de l'Université Grenoble I - Joseph Fourier
Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Hatice AKARSU

le 9 novembre 2005

Etudes structurales et fonctionnelles des protéines virales impliquées dans le trafic intracellulaire du génome du virus de la grippe

JURY :

Pr Michel ROBERT-NICOUD
Pr Sylvie VAN DER WERF
Dr Catherine DARGEMONT
Dr Félix REY
Dr Florence BAUDIN

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Institut de Virologie Moléculaire et Structurale (**IVMS**)
Travaux effectués au Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire
(**EMBL**)

A mes parents, Huseyin et Ayse AKARSU

*Je remercie le Dr **Stephen Cusack**, directeur de l'EMBL-Grenoble, de m'avoir accueillie dans son institut.*

*Je tiens à témoigner toute ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, le Dr **Florence Baudin** pour son aide inestimable tout au long de ma thèse et l'intérêt constant qu'elle a porté à mon travail en laboratoire ; mais aussi pour sa bonne humeur, son dynamisme et ses encouragements qui m'ont permis de ne pas baisser les bras.*

*J'exprime ma gratitude à notre chef de groupe et désormais directeur de l'IVMS, le Pr **Rob Ruigrok**, pour m'avoir donné la chance de travailler dans son équipe, pour ses précieux conseils aussi (tant scientifiques que métaphysicosociologicophilosophiques...). J'espère ne pas l'avoir trop déçu.*

*Mes plus vifs remerciements vont au Dr **Iain Mattaj** (EMBL-Heidelberg) pour m'avoir initiée au monde de l'in vivo.*

*Je ne voudrais pas non plus oublier le Pr **Michel Robert-Nicoud** pour m'avoir aidée dans mes démarches de recherche de laboratoire, il y a bien longtemps maintenant...*

*Je suis extrêmement reconnaissante aux Pr **Sylvie van der Werf**, Dr **Félix Rey** et Dr **Catherine Dargemont** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.*

*Je ne peux pas oublier le Dr **Guy Schoehn** et **Céline Fabry**, pour toute leur aide et leur patience (presque sans limites, surtout celle de Guy) en microscopie électronique.*

*Merci, du fond du cœur, au Dr **Cédric Clapier**, pour m'avoir soutenue, encouragée et aidée, particulièrement au cours de cette si difficile fin de thèse. Un grand merci aussi au Dr **Thibaut Crepin** pour son aide inestimable dans la préparation de ma thèse.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement **Isabelle Petit** qui m'a enseigné avec beaucoup de patience et de bonne humeur les rudiments du travail en laboratoire.*

*Je remercie **Aurélie Albertini** pour son amitié et pour tout le reste, professionnel et privé...*

*Et bien-sûr, tous mes camarades de groupe et de l'EMBL, qui ont créée cette atmosphère de travail incroyable et simplement pour avoir été là, avec moi, dans les moments de rigolade et ceux plus difficiles : **Jeanne Morinière**, **Sébastien Boulo**, **Francine Gérard**, **Majida El Bakkouri**, **Thibault Géoui**, **Annie Simon** et tous les autres...*

SOMMAIRE	4
ABREVIATIONS	9
I - INTRODUCTION	10
1 - GENERALITES	10
A) Les maladies infectieuses	10
B) Les virus	11
C) Les virus à ARN négatif (-)	13
2 - LE VIRUS DE LA GRIPPE	17
A) Les Orthomyxoviridae	17
B) Epidémiologie de la grippe	18
Sous-types	18
Pathologie	18
Traitements	20
Glissement et cassure antigéniques	20
Réassortiment	21
C) Structure d'une particule du virus de la grippe	24
Présentation générale	24
Génome	25
D) Les protéines du virus de la grippe	27
L'hémagglutinine HA	28
La neuraminidase NA	28
La protéine canal M2	28
La protéine matricielle M1	29
La nucléoprotéine NP	31
Le complexe de la polymérase	31
La protéine non structurale NS1	33
La protéine d'export NEP	34

E) Le cycle d'infection du virus de la grippe	35
Rôle de l'HA dans la fixation du virus sur la cellule hôte et dans la virulence	35
Endocytose	37
Import actif du génome viral dans le noyau cellulaire	38
Transcription et réplication virales dans le noyau	39
Export nucléaire des vRNPs	40
Assemblage et bourgeonnement	40
3 - LE TRANSPORT NUCLEOCYTOPLASMIQUE	42
A) Le complexe du pore nucléaire (NPC)	42
Le NPC : voie de passage des échanges nucléocytoplasmiques	42
Structure du NPC	42
Mécanisme de translocation dans le NPC	44
B) L'import nucléaire	45
Présentation	45
L'importine α	48
L'importine β	50
C) L'export nucléaire	52
Introduction	52
CRM1	53
Gradient de RanGTP et directionnalité du transport nucléocytoplasmique	56
4 - OBJECTIFS DE TRAVAIL	58
Complexe NP/importine α	58
Interactions de M1 et des vRNPs avec la chromatine	58
Export nucléaire des vRNPs	59

II – RESULTATS ET DISCUSSION	60
1 - COMPLEXE NP/IMPORTINE α	60
A) Introduction	60
Généralités	60
Les vRNPs contiennent l'information nécessaire à leur import nucléaire	60
NP possède plusieurs NLS	62
B) Purification du complexe NP/importine α 5 humaine et essais de cristallogénèse	66
C) Détermination d'une structure à basse résolution du complexe NP/importine α 5 humaine par microscopie électronique à transmission (MET)	68
Sélection et isolement des particules	68
Modélisation et correction de la fonction de transfert de contraste (CTF)	69
Reconstruction du modèle du complexe NP/importine α 5 humaine	70
Modèle du complexe NP/importine α 5 humaine	70
D) Conclusions et perspectives	79
2 - INTERACTION DES vRNPS ET DE M1 AVEC LA CHROMATINE	86
A) Introduction	86
Généralités	86
La chromatine	86
NS1 de la grippe bloque le système d'épissage des ARNm	88
Le vol des coiffes 5' m7Gppp des ARNm cellulaires	89
Liaison des vRNPs, de NP et de M1 à la chromatine	90
B) Article « Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes » Garcia-Robles <i>et al.</i> , 2005	95
C) Conclusions et perspectives	95
3 - ETUDE DES PROTÉINES VIRALES IMPLIQUÉES DANS L'EXPORT NUCLEAIRE DES vRNPs	99
A) Généralités	99
B) Présentation des acteurs clefs dans l'export nucléaire des vRNPs : M1 et NEP	100

La protéine matricielle M1	100
La protéine d'export nucléaire NEP (anciennement appelée NS2)	101
Principes de nos expériences	102
C) Article « Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2) » Akarsu <i>et al.</i> , 2003	103
D) Conclusions et perspectives	103
E) ETUDES <i>IN VIVO</i> DU MODELE D'EXPORT DES vRNPs	107
III – MATERIEL ET METHODES	114
1 - MUTAGENESE DIRIGEE ; EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES	114
A) Mutagénèse dirigée	114
B) Expression des protéines recombinantes	115
C) Purifications des protéines	116
M1wt et mutants (dans pET-16b, sans étiquette histidines)	116
NEPwt et mutants (dans pET-16b, étiquette histidine non clivable)	116
vRNPs	117
Importine α 5 humaine [66-512]	117
NP recombinante	118
Complexe NP/Importine α 5 humaine [66-512]	119
Nucléosomes recombinants	119
2 - PONTAGES COVALENTS AVEC L'EGS	120
3 - TESTS D'INTERACTION SUR BILLES MAGNETIQUES DE NI²⁺	120
4 - MICROINJECTIONS DANS LES OVOCYTES DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	121
Injection	121
Dissection et préparation des protéines	121
Western-Blot	121

5 - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET) EN COLORATION NEGATIVE	122
Principe	122
Préparation des échantillons biologiques	122
Observation d'échantillons	122
Sélection des micrographies	123
Digitalisation des plans films	123
Calibration du microscope	123
 IV – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 124
 RESUME	

ABREVIATIONS

A : alpha
Å : angström
ADN : Acide DésoxyRibonucléique
ARM : Armadillo repeat (motif répété de 3 hélices)
ARN : Acide RiboNucléique
B : beta
β-SH : β-mercaptoéthanol
Da : Dalton
DO : Densité Optique
DTT : Dithiothreitol
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGS : Ethylene Glycolbis (Succinimidylsuccinate)
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
IPTG : IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside
LB : Luria-Bertani Broth
LMB : Leptomycin B
MET : Microscopie Electronique à Transmission
NES : Nuclear Export Signal (signal d'export nucléaire)
NLS : Nuclear Localisation Signal (signal de localisation nucléaire)
NPC : Nuclear Pore Complex (le complexe du pore nucléaire)
PDB : Protein Data Bank (base de données des structures cristallographiques de protéines résolues)
PMSF : Phenylmethylsulphonylfluoride
p/p : poids/poids
PVDF : Polyvinylidene Fluoride
rpm : rotation par minute
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SST : Sodium Silicotungstate
TEV : Tobacco Etch Virus
Tris : 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
°C : degrés Celsius
h : heure
min : minute
3D : tridimension

Protéines du virus de la grippe

HA : hémagglutinine
M1 : Matrix protein 1 (protéine matricielle)
M2 : Matrix protein 2 (protéine canal)
NEP : Nuclear Export Protein (nom donné à NS2)
NP : nucléoprotéine
NS1 : Non Structurale protein 1
NS2 : Non Structurale protein 2
PA : Protéine Acide
PB1 : Protéine Basique 1
PB2 : Protéine Basique 2
vRNP : viral RiboNucleoProtein (ribonucléoprotéine virale)

I - INTRODUCTION

1 - GENERALITES

A) Les maladies infectieuses

Les maladies infectieuses sont causées par des bactéries, des virus, des champignons ou des parasites. Chaque année, elles sont responsables de 12-14 millions de décès dans le monde, dont 90 % dans les pays en voie de développement (d'après l'Institut Pasteur, 2005). Les pays développés ne sont pas épargnés pour autant et on y observe une résurgence des maladies infectieuses que l'on croyait en voie de marginalisation comme la coqueluche, la rougeole, la tuberculose (Organisation Mondiale de la Santé, OMS) (Figure 1.1).

Les antibiotiques utilisés commencent à atteindre leur limite du fait de l'apparition de résistances multiples ; la mise au point de vaccins contre le VIH (Virus de l'Immunodéficience acquise Humaine) par exemple, une des six maladies infectieuses les plus meurtrières, ne semble pas être pour tout de suite...et même lorsqu'un vaccin efficace existe déjà, comme celui de la rougeole, de nombreuses personnes continuent de mourir chaque année à cause de cette maladie, souvent d'un manque d'accès aux soins. Quant au vaccin contre la grippe, il doit être modifié constamment pour suivre l'évolution du virus et les souches en circulation, en attente de la mise au point d'un vaccin plus « universel ». Les antiviraux sont peu nombreux, d'efficacité parfois médiocre et ont souvent des effets secondaires non négligeables.

Ce tableau, pessimiste mais néanmoins réaliste, de l'état actuel des moyens de lutte contre les agents pathogènes montre à quel point il est important et urgent que la recherche, fondamentale et clinique, bénéficie d'un soutien plus actif de la part des acteurs politiques. Contrairement aux autres causes de décès (accidents cardiovasculaires notamment) qui peuvent être évités plus aisément (par une hygiène de vie meilleure par exemple), les maladies infectieuses son difficilement contournables, qu'on habite au Togo ou en Suède. Les pandémies de grippe passées, et à venir, montrent bien que les agents infectieux ne tiennent pas compte du tracé des frontières.

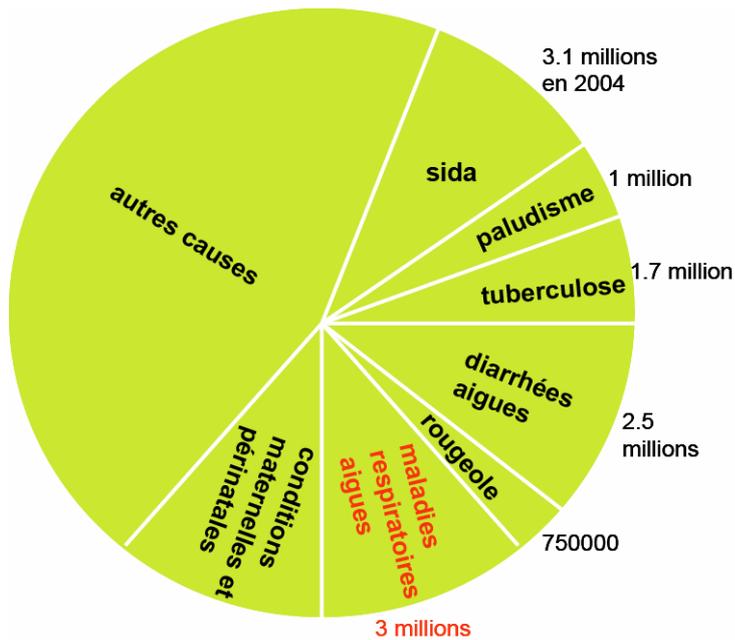


Figure 1.1. Répartition des causes de mortalité dans le monde, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé. Les maladies infectieuses sont la cause de 43 % des décès dans le monde, six groupes de maladies représentant à elles seules 90 % des décès par infection dans le monde.

B) Les virus

Parmi les maladies infectieuses les plus meurtrières, beaucoup sont causées par des virus : le sida (VIH), la rougeole, une grande partie des diarrhées sévères (*Rotaviridae*, *Réoviridae*, *Picornaviridae*, *Caliciviridae*) et des maladies respiratoires aiguës (virus respiratoire syncytial, grippe, parainfluenza...) (**Tableau 1.1**).

Outre la mortalité due à ces maladies, surtout dans les pays en voie de développement, les maladies infectieuses d'origine virale ont également un impact médico-économique lourd dans les pays occidentaux, comme c'est le cas pour la grippe (**Tableau 1.2**).

On peut souvent lire en introduction dans les livres de virologie une interrogation sur l'appartenance ou non des virus au monde du vivant, suivant la définition qu'on donne du vivant. Dans son livre - Les virus, de la structure aux pathologies - Hélène Terzian décrit les virus comme des organismes du fait de leur capacité « à se répliquer au niveau moléculaire », un organisme étant « une unité élémentaire d'un lignage continu avec une histoire évolutive individuelle ». Ainsi, les virus « se répliquent ; leur évolution peut dans certains cas être retracée ; ils sont indépendants dans le sens où ils ne sont pas limités à un seul organisme - hôte ni même à une seule espèce, genre ou phylum d'hôte ». Cette description correspondant

assez bien à ma conception des virus, j'en parlerai aussi en tant qu'organismes ou plutôt comme des êtres opportunistes passés maîtres dans l'art du parasitage...

Tableau 1.1. Les principaux agents des symptômes respiratoires aigus (en Suisse). Source : faculté des sciences de l'université de Genève.

syndrome	virus	bactérie
rhinite	rhinovirus, coronavirus, parainfluenza, virus respiratoire syncytial, influenza , adénovirus, entérovirus	
pharyngite	adénovirus, virus Epstein-Barr, entérovirus, influenza , parainfluenza, cytomégalovirus, VIH	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Borrelia vincenti</i> , <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Candida albicans</i> *
laryngite	adénovirus, influenza , parainfluenza, virus respiratoire syncytial	
épiglottite		<i>Haemophilus influenza type b</i>
coqueluche		<i>Bordetella pertussis</i>
sinusite		<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
otite moyenne		<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>
bronchiolite	virus respiratoire syncytial	
pneumonie	virus respiratoire syncytial, parainfluenza, influenza , adénovirus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Pneumocystis carinii</i> **

*champignon; **parasite

Tableau 1.2. Coût médico-économique d'une épidémie de grippe en France. Le coût direct moyen comprend les honoraires médicaux, les dépenses pharmaceutiques, les examens complémentaires et les dépenses d'auxiliaires médicaux. *Source : GROG (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe et d'autres maladies).*

	hiver 1996-97	hiver 1997-98	hiver 1998-99	hiver 1999-2000	hiver 2000-2001
millions de cas	8.1	2.8	5.5	8.8	<2
ampleur épidémique	forte	faible	moyenne	intense	très faible
coût total moyen (millions d'euros)*	240-620	80-210	160-420	260-670	60-150

*fourchette : le coût moyen d'un cas de grippe dépend de la classe d'âge concernée et de la sévérité clinique

Le génome d'un virus contient l'information nécessaire à sa réplication et à la production de nouvelles particules virales. Dans « Viruses and Human Disease », J.H. Strauss et E.G. Strauss classent les protéines codées par les génomes viraux en trois groupes principaux : les protéines impliquées dans les réplication/transcription, dans les assemblage/structure des virions et dans les interactions avec les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. En ce qui concerne leur réplication, les virus à ARN comme le virus de la grippe sont obligés de posséder leur propre réplicase puisque la cellule n'a pas d'ARN polymérase ARN-dépendante, alors que les virus à ADN ont accès à la machinerie cellulaire de réplication d'ADN. Je ne présenterai ici que les virus à ARN négatif [ARN(-)] dont fait partie le virus de la grippe.

C) Les virus à ARN négatif

Le groupe des virus à ARN négatif comporte sept familles dont la plupart est responsable de graves pathologies chez l'homme. Certains de ces virus provoquent des maladies très impressionnantes comme les fièvres hémorragiques : les virus de Marburg et Ebola (*Filoviridae*), les virus de Séoul et de Congo Crimée (*Bunyaviridae*)...D'autres sont la cause de maladies beaucoup plus fréquentes en Occident comme la rougeole et les oreillons (*Paramyxoviridae*), la rage (*Rhabdoviridae*) ou encore la grippe (virus *Influenza*) (**Tableau 1.3**).

Tableau 1.3. Les virus à ARN négatif simple brin.

Famille/Genre	Taille du génome (kb)	Type de virus	Hôte(s)	Transmission
Mononegavirales				
Rhabdoviridae	13-16			
<i>Vesiculovirus</i>		VSV	Vertébrés	Arthropodes
<i>Lyssavirus</i>		Rage	Vertébrés	Salive
Filoviridae	13			
<i>Type Marburg</i>		Marburg	Vertébrés	-
<i>Type Ebola</i>		Ebola	Vertébrés	-
Paramyxoviridae	16-20			
<i>Respirovirus</i>		Sendai/RSV	Vertébrés	Air
<i>Morbillivirus</i>		Rougeole	Vertébrés	Air
<i>Rubulavirus</i>		Oreillons	Vertébrés	Air
Bornaviridae	~9			
<i>Bornavirus</i>		BDV	Vertébrés	
Virus segmentés				
Orthomyxoviridae	12-15 kb dans:			
<i>Influenzavirus A</i>	8 segments	grippe type A	Vertébrés	Air
<i>Influenzavirus B</i>	8 segments	grippe type B	Vertébrés	Air
<i>Influenzavirus C</i>	7 segments	grippe type C	Vertébrés	Air
<i>Thogotovirus</i>	6/7 segments	virus Thogoto	Vertébrés	Arthropodes
Bunyaviridae				
<i>Bunyavirus</i>	11-20 dans 3 segments	Bunyamwera	Vertébrés	Moustiques
<i>Hantavirus</i>		virus de Séoul	Vertébrés	Fèces/urine/salive
<i>Phlebovirus</i>		fièvre du Rift	Vertébrés	Arthropodes
<i>Nairovirus</i>		virus Congo-Crimée	Vertébrés	Tiques
Arenaviridae				
<i>Arenavirus</i>	10-14 dans 2 segments	LCMV	Vertébrés	Urine/salive

NB : LCMV = virus de la chorioméningite lymphocytaire

Tous les virus à ARN(-) sont des virus enveloppés et possèdent un génome relativement petit (entre 10 et 20 kb) comparé à ceux des virus à ADN (150-200 kb pour les *Herpesviridae*), des bactéries (3,6 Mpb pour *Escherichia coli*) ou de l'homme (3200 Mpb) (Tableau 1.4).

La polarité négative de l'ARN viral génomique implique qu'il ne peut pas être traduit directement tel quel en protéines virales ; un brin d'ARN complémentaire de polarité positive

[ARN(+)] équivalent à l'ARN messager cellulaire doit être d'abord synthétisé par la polymérase virale.

Tableau 1.4. Comparaison de la taille de quelques génomes d'organismes modèles.

	organisme	taille du génome (Mpb)
Virus	Virus de la grippe	0,014 (simple brin)
Procaryotes	<i>Escherichia coli</i>	3,6
Eucaryotes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	97
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	125
	<i>Drosophila melanogaster</i>	180
	<i>Zea mais</i>	2500
	<i>Homo sapiens</i>	3200

Les virus ARN(-) diffèrent entre eux en fonction de la segmentation ou non de leur génome et par le lieu de leurs étapes de réplication/transcription dans la cellule : seules les familles des *Bornaviridae* (ordre des Mononegavirales, génome non segmenté) et des *Orthomyxoviridae* (génome segmenté) ont une étape nucléaire, les autres virus ARN(-) restent dans le cytoplasme. De façon plus générale, la plupart des virus à ARN humains restent dans le cytoplasme de la cellule hôte pour amplifier leur génome et exprimer les protéines virales. En ce qui concerne les autres types de virus, certains virus à ADN envoient aussi leur génome dans le noyau ; ce sont souvent des virus oncogènes : certains *Herpesviridae* (virus de l'herpès humain 8/HHV8 et cancer de Kaposi, virus d'Epstein-Barr/EBV et lymphome de Burkitt), certains *Papovaviridae* (virus du papillome et cancer du col de l'utérus). A ceux-là s'ajoutent les *Rétroviridae* (virus humain des lymphocytes T/HTLV et leucémies) et les *Hépadnaviridae* (hépatite B/VHB et cancer du foie).

Sans toutefois entrer dans des considérations déterministes, il est intéressant de s'interroger sur « l'intérêt », pour un être aussi minimaliste qu'un virus, d'aller dans le noyau. Il existe différentes explications à la localisation nucléaire de ces virus. Certains vont dans le noyau pour modifier le cycle cellulaire en poussant la cellule à se diviser : la prolifération cellulaire apporte les conditions optimales pour la réplication virale du fait de l'activation du métabolisme nucléotidique. Ce sont les virus à ADN oncogènes comme les virus de la famille des *Papillomaviridae*, le virus d'Epstein-Barr (EBV) (*Herpèsviridae*) : ils amplifient l'avancée du cycle cellulaire vers les phases G1 et S par intégration des gènes viraux dans le

génomique cellulaire et/ou production de protéines virales interagissant avec les protéines cellulaires suppresseurs de tumeurs (p53, pRb).

D'autres vont dans le noyau pour profiter du système de transcription de la machinerie cellulaire. Ainsi, le virus de l'hépatite B (génomique à ADN partiellement simple et double brin) fait une partie de sa réplication dans le cytoplasme et utilise pour sa transcription dans le noyau, l'ARN polymérase de la cellule afin de produire les ARN messagers viraux. En ce qui concerne le virus de la grippe, ses étapes de transcription et de réplication ont lieu dans le noyau : certains segments génomiques du virus de la grippe codent pour plusieurs protéines (**Tableau 2.2**), nécessitant un épissage des ARN messagers viraux, la machinerie d'épissage cellulaire se trouvant dans le noyau.

2 - LE VIRUS DE LA GRIPPE

A) Les Orthomyxoviridae

Le virus de la grippe appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* qui comprend quatre genres : les *Influenzavirus A*, *B* et *C*, et le genre *Thogotovirus*. Les *Influenzavirus A* et *B* sont proches phylogénétiquement, ils sont composés d'un génome segmenté en huit parties, alors que l'*Influenzavirus C* en possède sept (**Tableau 1.3**).

La grippe que l'on connaît communément correspond en réalité aux genres A et B qui circulent en parallèle durant les épidémies. Les vaccins sont composés de virus de la grippe de types A et B inactivés ; les souches virales utilisées dans les vaccins sont modifiées en fonction des souches en circulation.

Le virus de la grippe de type A possède un large spectre d'hôte puisqu'il peut infecter aussi bien les humains que les oiseaux, les cochons, les chevaux et les mammifères aquatiques. Le virus de la grippe de type B en revanche n'infecte que l'homme, ce qui limite le risque et la fréquence d'apparition de nouvelles souches pathogènes pour l'homme par cassure antigénique. La cassure antigénique due à un réassortiment est très improbable, ce qui évite que le virus de la grippe de type B conduise à des pandémies. Les termes de glissement et cassure antigéniques seront développés plus en détail dans la suite du texte. Il est à noter cependant qu'une grippe de type B a été récemment observée chez le phoque, sans que l'on sache s'il s'agit d'un cas isolé ou si ce virus a une répartition plus vaste que ce que l'on pensait ([Osterhaus et al., 2000](#)).

Les trois types de virus de la grippe utilisent comme récepteur cellulaire l'acide sialique exposé à la surface de la cellule hôte, mais le virus de la grippe C utilise une forme différente d'acide sialique et les enzymes utilisées par les virus pour détruire les récepteurs sont radicalement différentes : la glycoprotéine neuraminidase (NA) pour les virus de la grippe de types A et B, la glycoprotéine HEF (Hemagglutinin Esterase Fusion protein) pour le virus de la grippe de type C. Par ailleurs, HEF sert aussi de protéine de liaison à l'acide sialique lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte, rôle joué par l'hémagglutinine (HA) dans les virus de type A et B. Le virus de la grippe de type C n'est pas responsable d'épidémies annuelles chez l'homme, c'est pourquoi il est beaucoup moins étudié que les virus de type A et B.

Les virus de la grippe de types A et B provoquent en revanche des épidémies chaque hiver dans nos pays, avec des conséquences socio-économiques plus ou moins importantes suivant la virulence de la souche en circulation (**Tableau 1.2**). En ce qui concerne le virus de

la grippe de type A, sa capacité de mutation élevée et les effets dévastateurs des trois pandémies au cours du 20^{ème} siècle (1918, 1957, 1968), particulièrement celle de 1918, le font classer parmi les virus potentiellement très sévères. C'est pourquoi le virus de la grippe de type A est étudié de façon plus intensive.

B) Epidémiologie de la grippe

Sous-types. Les différents souches et variants de grippe de type A sont classés en fonction des caractéristiques antigéniques du virus. Ces dernières dépendent elles-mêmes des deux glycoprotéines virales présentes à la surface de chaque virion : l'hémagglutinine (HA) qui est la protéine de surface majoritaire et la neuraminidase (NA) (**Figure 2.1**).

Il existe au total 16 hémagglutinines (H1 à H16) et 9 neuraminidases (N1 à N9), leurs combinaisons éventuelles pouvant résulter en 135 sous-types différents (ex : H1N1, H3N2...) dont certains sont potentiellement très pathogènes pour l'homme (H5N1). Les sous-types spécifiques de l'homme actuellement sont H1, H2 et H3 pour l'HA, et N1 et N2 pour la NA. Cependant, les dernières épidémies de grippe aviaire d'Asie montrent que certains nouveaux sous-types peuvent infecter l'homme (H5, H7, H9, N7), même si une transmission interhumaine n'a pas été encore établie.

D'après les données de génotypage et sérotypage, seulement deux souches de grippe circulaient chez l'homme ces dernières décennies: H1N1 et H3N2 (**Figure 2.2**). Un nouveau sous-type, H1N2, issu du réassortiment entre H1N1 et H3N2, est apparu récemment en 2001 ([Gregory et al., 2002](#)). Depuis octobre 2004, H1N2 semble avoir disparu dans le cadre de la surveillance mondiale de la grippe puisque un seul isolat a été depuis détecté.

Pathologie. Lors des épidémies habituelles, les patients atteints de grippe développent en général des symptômes non-spécifiques comme la fièvre, la toux, des céphalées, des myalgies, et se rétablissent complètement en une à deux semaines. Des complications peuvent cependant survenir chez des personnes âgées ou déjà atteintes de maladies respiratoires ou cardiovasculaires, les enfants en bas âge, les immunodéprimés. Les décès observés alors ne sont pas directement dus au virus de la grippe lui-même mais à d'autres agents pathogènes (viraux ou bactériens) secondaires à l'infection grippale : l'épithélium respiratoire mis à mal par le développement du virus de la grippe devient une porte d'entrée pour les autres pathogènes. Il est à noter que les souches de grippe acclimatées à l'homme ont comme cellules hôtes uniquement l'épithélium trachéo-bronchial, les aspects systémiques de l'infection étant dus à l'induction de cytokines inflammatoires. Cette restriction de type

cellulaire ne serait plus respectée dans les cas des gripes aviaires transmises à l'homme lors des récentes épidémies en Asie du Sud-Est (souche H5N1), ce qui serait, entre autres, à l'origine de la haute pathogénicité de ces nouveaux virus. Ce point sera développé plus en détail dans la suite du texte.

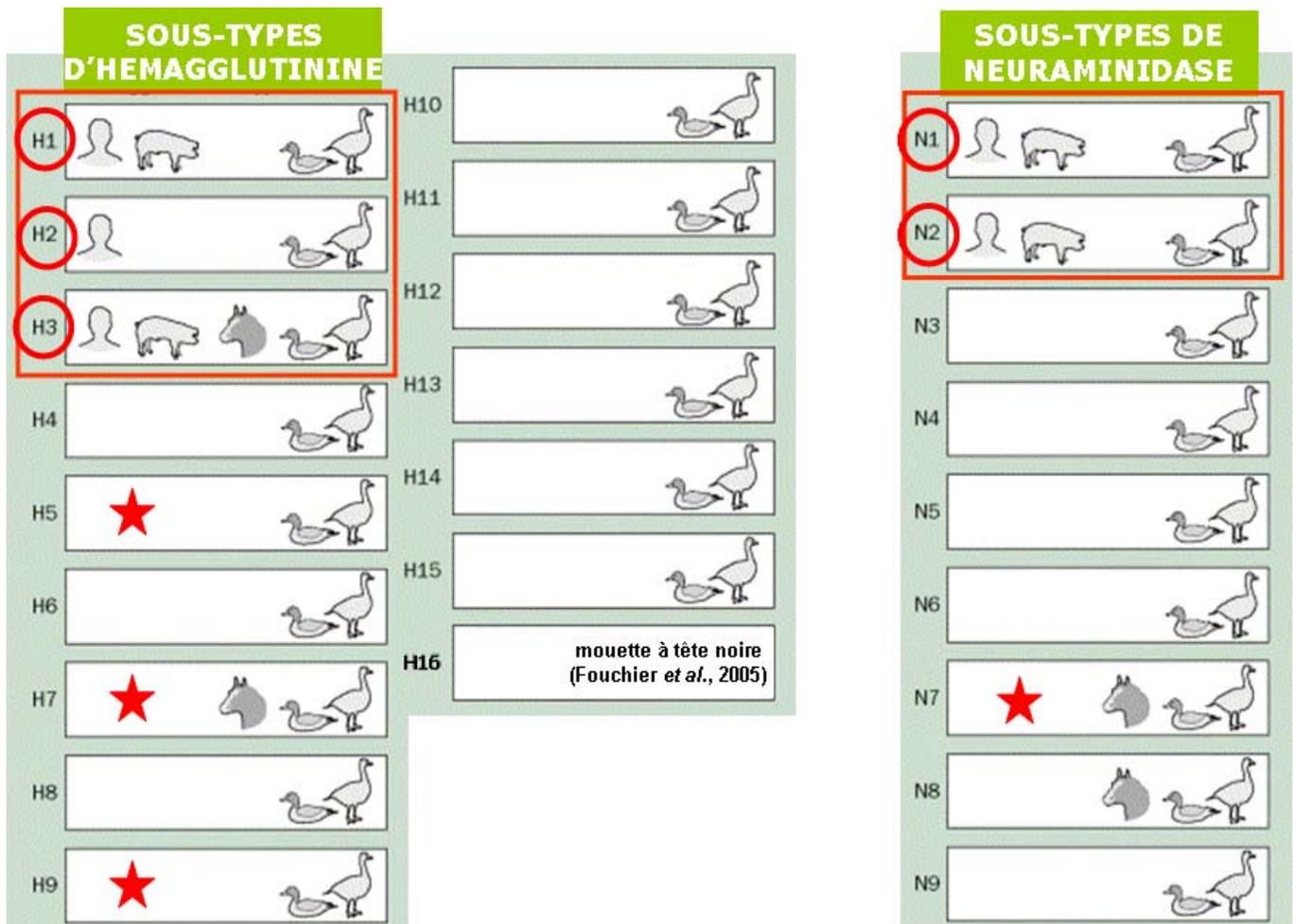


Figure 2.1. Les différentes espèces répertoriées d'hémagglutinine et neuraminidase de la grippe (d'après Y. Kawaoka). En encadré rouge, les sous-types qui circulent chez l'homme. Les étoiles rouges indiquent les sous-types aviaires retrouvés chez l'homme lors des récentes épidémies mais non encore répertoriés comme transmissibles d'homme à homme.

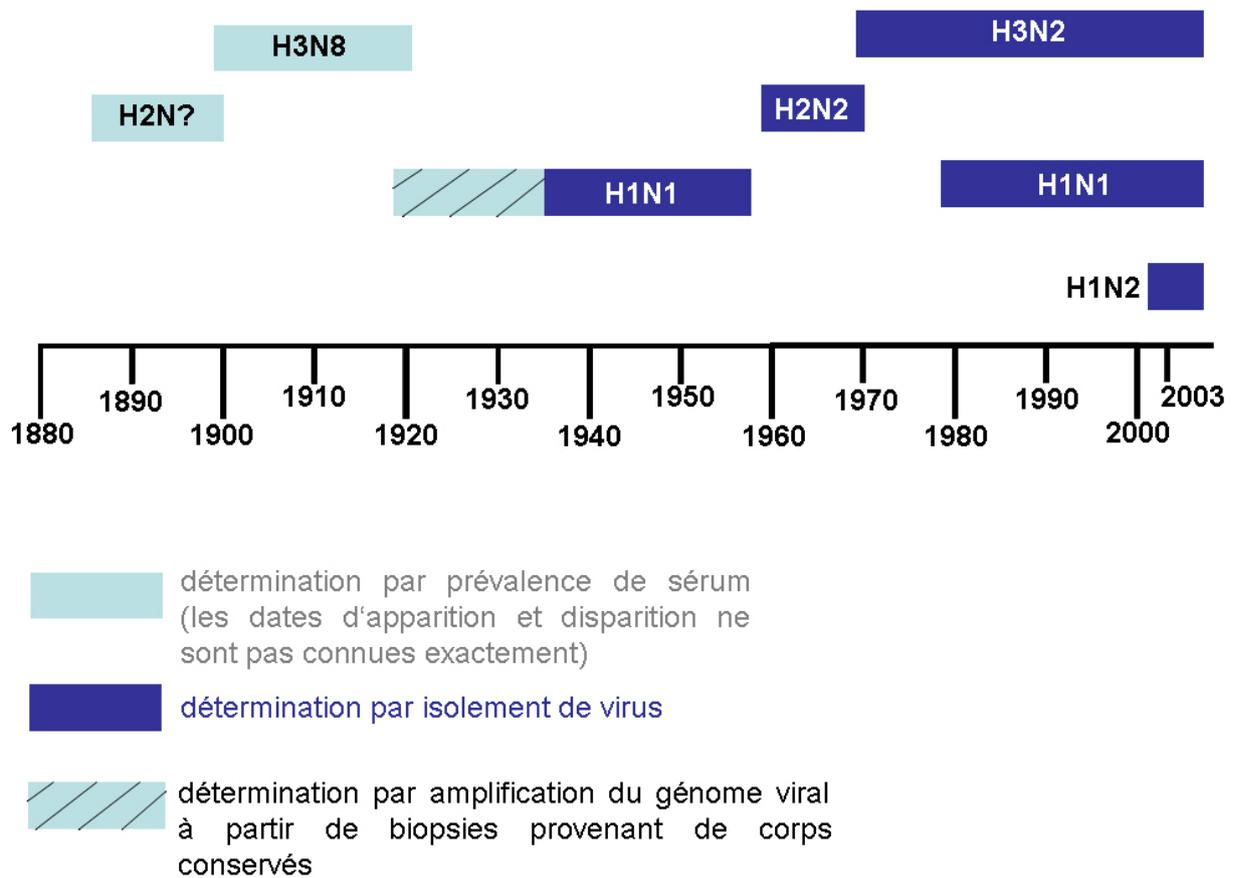


Figure 2.2. Périodes de prévalence des différents sous-types d'influenza A (adapté de Cox *et al.*, 2005, revue). Les sous-types en rectangles bleu foncé correspondent à des génotypages sur des virus isolés, alors que ceux en bleu clair sont déterminés d'après les analyses rétrospectives de sérum. NB : la séquence du sous-type H1N1 de 1918 est désormais connue grâce à l'amplification de génome viral provenant des biopsies effectuées sur des corps conservés.

Traitements. Les moyens de lutte contre la grippe sont peu nombreux et d'efficacité moyenne. Les antiviraux qui existent sont utilisés avec beaucoup de précaution du fait des effets secondaires importants pour certains d'entre eux. La rimantidine (non commercialisée en France désormais) et l'amantadine (autorisée en France en prophylaxie mais pas en traitement, aussi utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson) se fixent sur la protéine canal M2. Cette protéine virale est impliquée dans l'acidification de l'intérieur du virion, étape clef dans le relargage des vRNPs dans le cytoplasme, en phase précoce d'infection virale (voir chapitre suivant). On leur préfère les inhibiteurs de la neuraminidase NA, c'est-à-dire le zanamivir et l'oseltamivir : le blocage de l'activité enzymatique de NA empêche la libération des virions nouvellement produits de la cellule hôte, et donc la diffusion de l'infection virale.

La prophylaxie reste encore la meilleure arme de lutte contre la grippe. Cependant, le vaccin est à renouveler chaque année en fonction des souches en circulation, le virus de la grippe possédant une grande variabilité antigénique.

Glissement (ou dérive) et cassure antigéniques. Deux mécanismes sont à l'origine de la variabilité antigénique du virus de la grippe. Tout d'abord, il existe le glissement génétique, phénomène classique d'accumulation de mutations successives. Cela est dû au taux élevé de mutations dans son génome à cause de la faible fidélité et l'absence d'activité correctrice de l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus. De nombreux génotypes de grippe atténués ou non-viables sont ainsi produits, mais les pressions de sélection (lymphocytes T, anticorps, récepteurs de l'hôte...) exercées par le système immunitaire de l'organisme hôte conduit à l'expansion de certains variants seulement.

Parallèlement au glissement génétique, mais beaucoup moins fréquente heureusement, existe la cassure génétique à l'origine de l'apparition soudaine d'un virus complètement nouveau. La cassure génétique est due au fait que le virus de la grippe possède d'une part un génome segmenté, et d'autre part un large spectre d'hôtes allant des oiseaux aquatiques à l'homme, en passant par les oiseaux domestiques et les cochons (**Figure 2.3**).

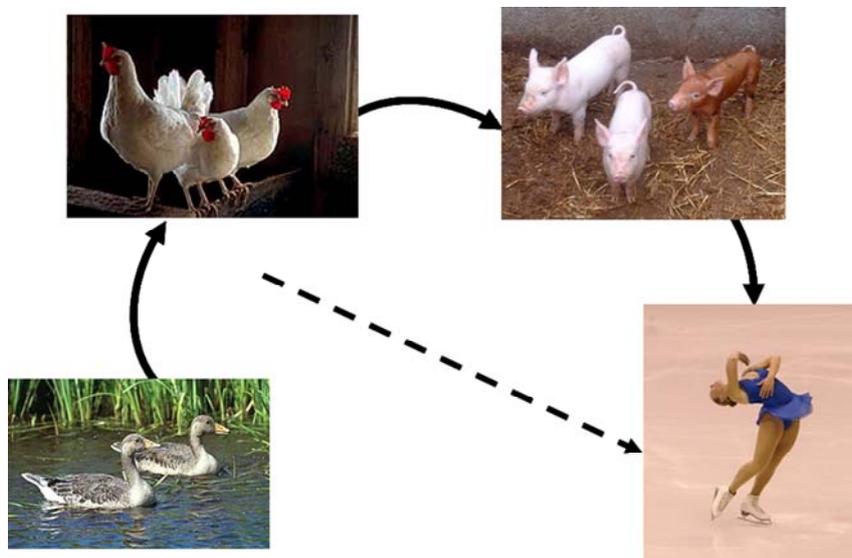


Figure 2.3. Le virus de la grippe possède une grande variété d'hôtes. Le réservoir naturel du virus de la grippe se compose des oiseaux sauvages. En temps normal, le virus de la grippe aviaire ne peut pas infecter directement l'homme ; il faut un hôte intermédiaire, comme le cochon. Cependant, les épidémies récentes montrent la transmission directe à l'homme de souches purement aviaires hautement pathogènes comme H5N1, ou non comme H9N2.

Réassortiment. Lorsque deux différents virus co-infectent un même hôte, un réassortiment des segments viraux peut se produire, conduisant dans certains cas à l'apparition d'un nouveau virus (c'est-à-dire un nouveau sous-type) potentiellement dangereux pour l'homme. Ainsi, la combinaison de segments d'un virus adapté à l'homme - qui peut donc se propager entre humains - avec certains segments viraux d'origine animale peut aboutir à l'apparition d'un virus pathogène. Ce mécanisme serait à l'origine des pandémies de 1957 (H2N2, grippe asiatique) et de 1968 (H3N2, grippe de Hong Kong) (**Figure 2.4**). Dans celle de 1957, une souche H2N2 aviaire aurait « donné » ses segments génomiques de PB1, HA et NA à la souche H1N1 adaptée à l'homme à cette époque. Dans la pandémie de 1968, les segments PB1 et HA d'une souche aviaire H3N? (sous-type de NA non connu) auraient été incorporés dans le génome de la souche H2N2 adaptée alors à l'homme. En ce qui concerne la pandémie de 1918 (H1N1), bien plus grave que celles de 1957 et 1968, son origine est moins claire : ce serait un virus purement aviaire qui serait soit passé directement à l'homme et aurait ensuite acquis la capacité de transmission interhumaine, soit serait passé à l'homme après une phase d'adaptation chez un mammifère – inconnu, autre que le cochon - pour acquérir la compatibilité antigène/récepteur.

Au vu des pandémies passées du 20^{ème} siècle, on peut craindre le pire sur les conséquences d'une éventuelle transmission d'homme à homme des cas d'épizootie actuellement en cours en Asie (**Tableau 2.1**). D'autant que H5N1 - souche candidate la plus probable à la prochaine pandémie et la plus mortelle comparée à H9N2 (non mortelle, cf **Tableau 2.1**), H7N2 ou H7N7 - semble être bien plus virulente que celle de 1918 (H1N1), elle-même déjà connue pour être plus grave que celles de 1957 (H2N2) ou 1968 (H3N2).

Dans les différentes épidémies reportées dernièrement, la souche aviaire H5N1 semble avoir en moyenne un taux de mortalité largement supérieure à 50 % chez les personnes déclarant les symptômes, alors que la souche humaine H1N1 de 1918 était de moins de 5 %. Bien-sûr, il est difficile de comparer une souche adaptée à l'homme (H1N1) avec une souche encore aviaire (H5N1) : il n'est pas exclu que, si le virus H5N1 devient un jour transmissible d'homme à homme, il perde de sa virulence. De plus, les conditions socio-économiques, sanitaires, médicales et de collectes de données sont bien différentes aujourd'hui (bien qu'encore trop souvent difficiles...).

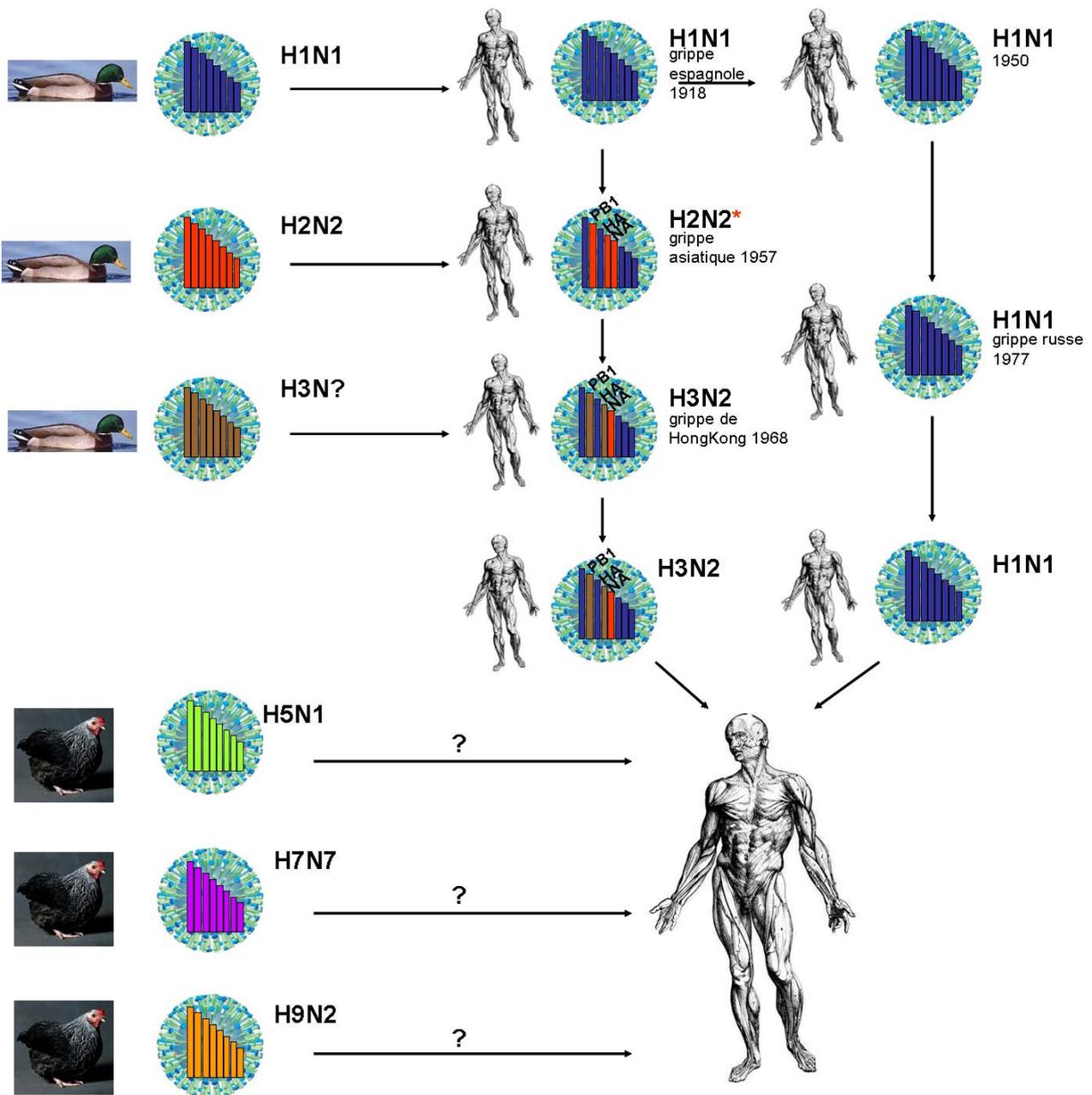


Figure 2.4. Pandémies passées et à venir du virus de la grippe (adapté de Horimoto et Kawaoka, 2005, revue). La pandémie de 1918 aurait été causée par un virus H1N1 aviaire transmis à l'homme. Celle de 1957 est causée par un nouveau virus H2N2 issu du réassortiment du sous-type H1N1 adapté à l'homme avec un sous-type H2N2 aviaire : ce nouveau sous-type nommé H2N2* possède les segments PB1, HA et NA d'origine aviaire (H2N2 aviaire) dans un environnement de génotype du virus de la grippe adapté à l'homme (H1N1). H1N1 disparaît alors de la circulation. La pandémie de 1968 (grippe de Hong Kong, sous-type H3N2) est provoquée par la combinaison des segments PB1 et HA d'un sous-type H3N? aviaire avec H2N2* humain. Les nombreux cas d'épizootie en Asie du Sud-Est de ces dernières années semblent se propager progressivement vers l'ouest, faisant craindre l'apparition imminente de la première pandémie du 21^{ème} siècle.

Tableau 2.1. Une nouvelle pandémie de grippe en vue. Parmi les différentes zoonoses, le virus de la grippe aviaire H5N1 (en rose) est transmissible directement du poulet à l'homme. Son caractère hautement pathogène fait craindre les conséquences d'une transmissibilité éventuelle d'homme à homme. *Source : OMS (Organisation Mondiale de la Santé).* A noter cependant que la virulence du virus peut changer lorsqu'il acquiert la transmissibilité interhumaine.

SOUS-TYPE VIRAL	LIEU / DATE	DESCRIPTION
H5N1	Hong Kong / 1997	1ère description d'une transmission poulet-homme; 6 décès/18 cas
H9N2	Chine et Hong Kong / 1999	2 cas non mortels (enfants)
H7N2	Virginie / 2002	1 cas dans un élevage de poulets
H5N1	Chine et Hong Kong / 2003	3 cas appartenant à une même famille; 2 décès / 3 cas
H7N7	Pays Bas /2003	89 cas, la majorité dans des élevages de poulets (1 décès)
H9N2	Hong Kong / 2003	1 cas non mortel (enfant)
H7N2	New York / 2003	1 cas non mortel, origine de l'infection non déterminée
H5N1	Vietnam et Thaïlande / 2004	32 décès / 44 cas reportés
H7N3	Canada / 2004	Chez des éleveurs de poulets, marqué par des infections oculaires
H5N1	Vietnam, Thaïlande, Cambodge, Indonésie / décembre 2004 à novembre 2005	30 décès / 78 cas

C) Structure d'une particule du virus de la grippe

Présentation générale. Le virus de la grippe se présente sous la forme d'un virion ovoïde d'environ 120 nm de diamètre et recouvert de spicules que sont les deux glycoprotéines de surface, la neuraminidase NA et l'hémagglutinine HA. C'est un virus enveloppé, il possède une bicouche lipidique d'origine cellulaire sur laquelle sont insérées les protéines virales de surface. Les coupes de virions en microscopie électronique montrent que

la face interne de l'enveloppe virale comporte une couche de protéines, celle de la protéine matricielle M1. Associées à ce tapis de M1, les segments génomiques du virus de la grippe sont étroitement empaquetés à l'intérieur de la particule virale (**Figure 2.5**).

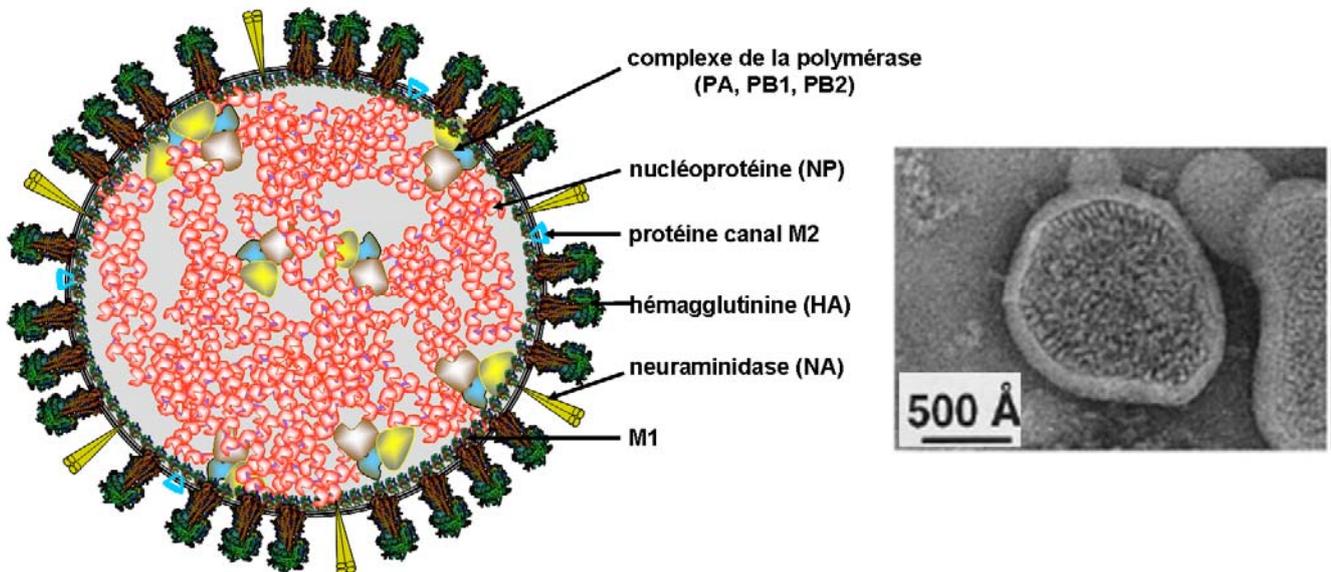


Figure 2.5. Représentation schématique (à gauche) et coupe de microscopie électronique (à droite) d'une particule virale de grippe.

Génome. L'*Influenzavirus A* est composé d'un génome divisé en huit segments qui codent pour onze protéines virales différentes au moins (**Tableau 2.2**). Certains des segments codent pour une seule protéine : le segment 1 code pour la sous-unité PB2 de la polymérase, le 3 pour la sous-unité PA de la polymérase, le 4 pour l'hémagglutinine HA, le 5 pour la nucléoprotéine NP, le 6 pour la neuraminidase NA.

Les autres segments génomiques du virus de la grippe codent pour deux protéines virales différentes. Ainsi, le segment 2 code pour la sous-unité PB1 de la polymérase et pour la protéine virale PB1-F2 découverte récemment ([Chen et al., 2001](#)) ; le segment 7 code pour la protéine matricielle M1 et la protéine canal M2 ([Lamb et al., 1981](#)) ; le segment 8 code pour la protéine non structurale NS1 et la protéine d'export nucléaire NEP anciennement appelée NS2 ([Lamb et Chopin 1979](#) ; [Inglis et al., 1979](#)). Alors que l'expression des protéines virales PB1 et PB1-F2 est basée sur une traduction alternative du segment 2 en fonction de deux cadres de lecture, celle des protéines virales M1/M2 et NS1/NS2 est liée à un épissage des transcrits codés par les segments 7 et 8 respectivement.

Tableau 2.2. Le génome du virus de la grippe est composé de huit segments, chacun codant pour une ou plusieurs protéines virales différentes (souche A/PR/8/34). (Adapté de Fields Virology, Editions Lippincott Williams et Wilkins, 2001). En encadré rose, les protéines virales étudiées dans le cadre de ma thèse.

segment	longueur (nucléotides)	longueur de l'ARNm	protéine codée	longueur de la protéine	poids moléculaire théorique (Da)	nombre de molécules par virion	remarques
1	2341	2320	PB2	759	85700	30-60	reconnaissance de la coiffe ⁷ Me-Gppp; appartient au complexe de transcription/réplication
2	2341	2320	PB1	757	86500	30-60	polymérisation; appartient au complexe de transcription/réplication
		-	PB1F2	87	10500	-	localisation mitochondriale; induit l'apoptose
3	2233	2211	PA	716	84200	30-60	appartient au complexe de transcription/réplication
4	1778	1757	HA	566	61428	500	principale glycoprotéine de surface; liaison à l'acide sialique; antigène majeur; trimère; structure cristallographique connue
5	1565	1540	NP	498	56101	1000	lie l'ARN pour former des ribonucléoprotéines; impliquée dans la synthèse de l'ARN viral
6	1413	1392	NA	454	50087	100	glycoprotéine de surface; activité neuraminidase; déterminant antigénique; structure cristallographique connue (tétramère)
7	1027	1005	M1	252	27801	3000	composant majeur du virion; tapisserait la face interne de l'enveloppe; pas d'activité enzymatique connue; serait impliquée dans l'export nucléaire des ribonucléoprotéines virales
		315 276	M2 ?	97 ? (9)	11010 -	20-60 -	protéine intégralement membranaire (tétramère); activité de canal ionique bloquée par l'amantadine
8	890	868	NS1	230	26815	-	localisée surtout dans le noyau cellulaire; inhibe l'export nucléaire des ARNm cellulaires et leur épissage; inhibe la réponse antitumorale
		395	NS2	121	14216	130-200	serait impliquée dans l'export nucléaire des ribonucléoprotéines virales

Ainsi, chacun de ces huit « mini-chromosomes » viraux comporte une molécule d'ARN simple brin de polarité négative et de longueur variable en fonction des protéines virales codées. La molécule d'ARN viral est entièrement recouverte de nucléoprotéines toutes les 24 bases environ. Les extrémités 5' et 3' se rejoignent de façon à former une structure pseudo-

hélicoïdale et l'hétéro-tri-complexe de la polymérase est localisée à la jointure de ces deux extrémités (**Figure 2.6**). On appelle l'énorme complexe ARN/NP/polymérase ainsi formé une ribonucléoprotéine virale ou vRNP.

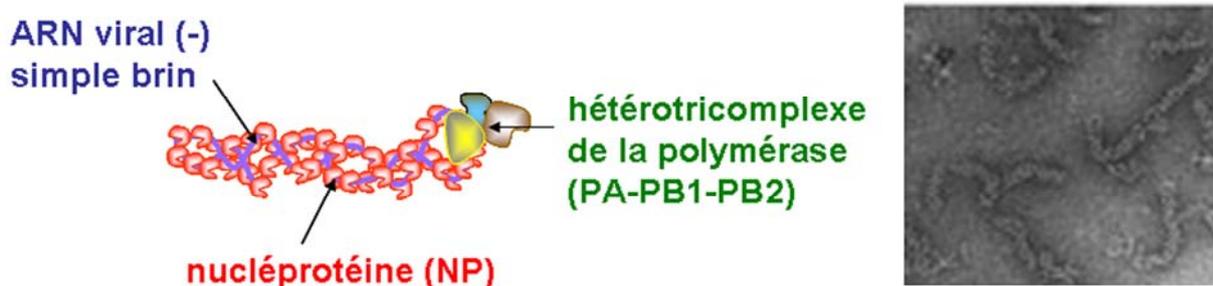


Figure 2.6. Un segment génomique du virus de la grippe : la ribonucléoprotéine virale ou vRNP. L'ARN viral simple brin négatif (en violet) est entièrement recouvert, sur son squelette ribose-phosphate, de nucléoprotéines (en rouge) tous les 24 nucléotides environ, les bases restant par ailleurs exposées au solvant (Baudin *et al.*, 1994). Les extrémités 5' et 3' de l'ARN viral se rejoignent et sont liées par l'hétéro-tri-complexe de l'ARN polymérase virale ARN-dépendante. La vRNP adopte ainsi une forme pseudo-hélicoïdale.

D) Les protéines du virus de la grippe

Les protéines du virus de la grippe peuvent être classées en deux groupes - les protéines dites externes et celles internes - en fonction de leur lieu de traduction. Les premières correspondent aux protéines virales HA (hémagglutinine), NA (neuraminidase) et le canal ionique M2 : ce sont les protéines présentes à la surface de la particule virale (**Figure 2.5**). Comme elles sont enchâssées dans l'enveloppe virale provenant de la membrane plasmique cellulaire, elles sont fabriquées par les ribosomes liés au réticulum endoplasmique. Elles empruntent ensuite le système de Golgi pour être insérées dans la membrane plasmique. HA et NA sont glycosylées lors de leur synthèse et de leur transport au travers du réticulum et de Golgi. HA, NA et M2 sont des protéines tardives, c'est-à-dire que leur synthèse commence tardivement pendant le cycle viral.

Les protéines dites internes sont celles qui sont synthétisées par les ribosomes libres dans le cytoplasme. Ce sont les protéines précoces NP, les trois sous-unités de la polymérase (PB1, PB2, PA), NS1 et les deux protéines tardives M1 et NEP.

Pour plus de clarté, on pourra se référer régulièrement au **Tableau 2.2** qui liste toutes les protéines virales avec leurs principales caractéristiques.

L'hémagglutinine HA. HA présente à la surface des virions est un homotrimère, chaque sous-unité faisant 76 kDa dans la forme initiale non clivée (HA₀). La protéine est codée par le segment 4 du génome viral. Son nom provient du fait que le virus de la grippe peut conduire à l'agglutination des érythrocytes (expériences menées au début des années 40...). Outre son rôle dans l'entrée du virus dans la cellule hôte comme nous le verrons par la suite, HA est l'antigène majeur du virus de la grippe. Elle subit, lors de sa synthèse et son transport dans le réticulum endoplasmique, des glycosylations (Ward *et al.*, 1980 ; Naim et Roth, 1993) et ajouts de résidus de palmitate (Naeve et Williams, 1990).

La neuraminidase NA. NA est codée par le segment 6 du génome viral. Cette protéine est présente à la surface du virion sous la forme d'un tétramère. Sa structure cristallographique est connue depuis longtemps, aussi bien seule (Varghese *et al.*, 1983) qu'en complexe avec de l'acide sialique (Burmeister *et al.*, 1992) ou un analogue de l'acide sialique (White *et al.*, 1995). Comme l'HA, elle est exprimée en phase tardive du cycle viral, au niveau du réticulum endoplasmique où elle subit des glycosylations, et est aussi un déterminant antigénique. NA est impliquée dans la phase finale du cycle viral, lors du relargage des virions. En clivant les acides sialiques, elle évite que les virions ne restent collés à la surface cellulaire à cause des interactions HA/acide sialique. Cette protéine est donc impliquée dans la propagation de l'infection virale. NA est la cible de l'oseltamivir (Tamiflu®, Roche) et le zanamivir (Relenza®, GlaxoSmithKline), analogues des acides sialiques couramment utilisés contre le virus de la grippe.

Le canal à protons M2. M2 est une des deux protéines codées par le segment 7, grâce à un épissage alternatif du transcrit viral (Lamb *et al.*, 1981). Elle a un poids moléculaire de 11 kDa (97 résidus) et forme un homotétramère dont une partie de la structure a été résolue par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) (Nishimura *et al.*, 2002) (**Figure 2.7**). La protéine M2 est une protéine canal à protons jouant un rôle primordial lors de l'acidification de l'intérieur du virus en phase précoce d'infection. Ce sujet sera de nouveau abordé dans la suite de l'introduction.

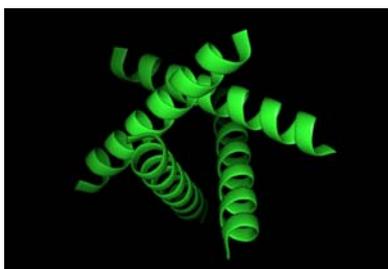


Figure 2.7. Structure en RMN du domaine transmembranaire de la protéine canal M2 (résidus 22 à 46) ; code PDB : 1NYJ (Nishimura *et al.*, 2002).

La protéine matricielle M1. Dès les premières études - en microscopie électronique notamment (Schulze, 1972) - portant sur la structure du virus de la grippe, la protéine M1 apparaît comme l'élément le plus abondant de la particule virale. M1 est une protéine de 28 kDa (252 acides aminés) (Figure 2.8) codée par le segment 7 du génome de la grippe (codant aussi pour la protéine canal M2) (Lamb *et al.*, 1981). Les nombreuses expériences menées sur M1 montrent qu'elle possède plusieurs fonctions essentielles au virus durant les différentes étapes du cycle d'infection.

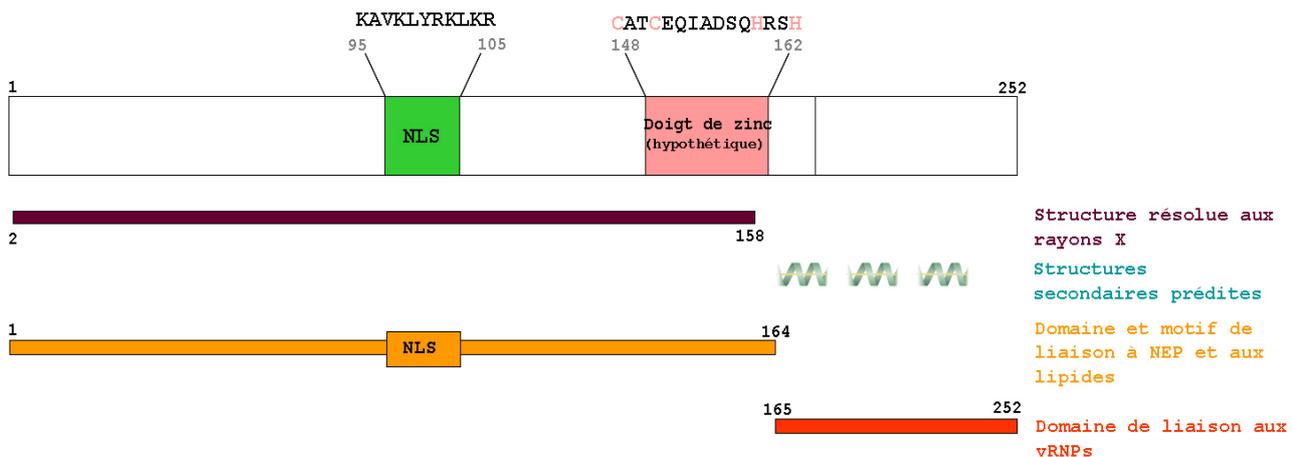


Figure 2.8. Les domaines structuraux et fonctionnels de la protéine virale matricielle M1.

Tout d'abord, M1 est une protéine structurale qui participe à l'architecture du virion. Elle tapisse toute la face interne de l'enveloppe virale (d'où son nom de protéine matricielle), interagissant ainsi d'une part avec la bicouche phospholipidique (Gregoriades *et al.*, 1980 ; Ruigrok *et al.*, 2000 ; Baudin *et al.*, 2001) et d'autre part avec les segments génomiques viraux (Ye *et al.*, 1987, 1999 ; Watanabe *et al.*, 1996). Plus précisément, il a été démontré que M1 interagissait - sans être enchâssée - avec la membrane lipidique par des interactions électrostatiques (Ruigrok *et al.*, 2000), via son domaine N-terminal (Baudin *et al.*, 2001). Quant au domaine C-terminal de M1, il semble impliqué dans la liaison aux vRNPs (Ye *et al.*, 1987 ; Baudin *et al.*, 2001). M1 participerait de cette façon à la compaction des vRNPs dans le virion et à l'architecture de celui-ci.

La structure cristallographique du domaine N-terminal [1-164] de M1 a pu être résolue (Sha et Luo, 1997 ; Arzt *et al.*, 2001) (Figure 2.9). Sha et Luo (1997) ont utilisé une M1 purifiée à partir du virus et les cristaux sont obtenus à pH 4.0, à une résolution de 2.08 Å. En

revanche, M1 cristallisée à pH 7.0 (résolution de 2.3 Å) par notre équipe est exprimée dans *E.coli* (Arzt *et al.*, 2001). Les premiers essais de cristallisation effectués dans notre laboratoire portaient sur la protéine M1 entière, mais l'espèce qui a formé des cristaux correspondait au domaine [1-164], comme pour l'équipe de Sha et Luo. Cela indique que M1 recombinante et virale possèdent toutes deux un domaine particulièrement sensible aux protéases autour de la région du résidu 164. La superposition des deux structures de M1 obtenues à des pH différents montre qu'elles sont quasi identiques, à l'exception des zones de contact protéine-protéine (Arzt *et al.*, 2001).

Une autre différence entre les deux types de M1 concerne la présence de zinc dans la M1 virale, alors que M1 recombinante n'en a pas (Elster *et al.*, 1994). La structure de M1 virale résolue par Sha et Luo (1997) ne permet pas de voir de zinc, probablement parce qu'une partie du motif hypothétique de doigt de zinc de type CCHH (Wakefield et Brownlee, 1989) susceptible de contenir l'atome de zinc n'est pas contenue dans le domaine [1-164] cristallisé. M1 est une protéine exprimée en phase tardive du cycle viral et qui est détectée dans le cytoplasme et le noyau. Bien qu'ayant un poids moléculaire de 28 kDa, et donc pouvant traverser par simple diffusion passive (voir le chapitre suivant sur le transport nucléocytoplasmique), M1 possède un signal de localisation nucléaire (NLS) constitué par les résidus R101, K102, K104 et R105 (Ye *et al.*, 1995). Ce NLS, plus les résidus K95, K98, R134, R76, R77, K47, R49, K57, R78 et R72 sont à l'origine de la formation d'une face de M1 [1-164] très positive. Cette caractéristique de charges de M1 sera traitée plus en détail dans le troisième chapitre de la partie Résultats-Discussions portant sur l'export nucléaire des vRNPs.

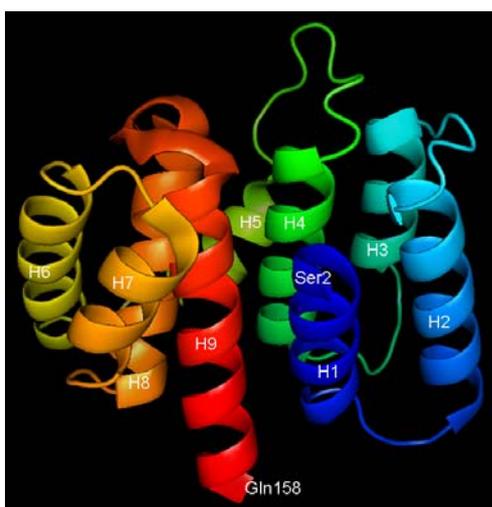


Figure 2.9. Structure cristallographique du monomère de M1 (résidus 2 à 158) à pH 7.0, code PDB : 1EA3 (Arzt *et al.*, 2001). La structure a été obtenue par remplacement moléculaire avec celle de M1 obtenue à pH 4.0 (Sha et Luo, 1997 ; code PDB : 1AA7) ; la résolution est de 2.3 Å ; les conditions de cristallisation sont le tampon Hepes pH 7.5 100 mM, isopropanol 5 % (v/v), PEG 4000 6-10 %. Représentation faite avec *Pymol* (développé par DeLano Scientific LLC).

Il faut enfin ajouter une autre propriété de M1, celle d'inhibition de la transcription virale (Ye *et al.*, 1989 ; Watanabe *et al.*, 1996). Cette propriété d'inhibition de la synthèse de l'ARN viral serait corrélée à la capacité de liaison de M1 à l'ARN. Ainsi, en fin de cycle viral, M1 entre dans le noyau où elle se fixerait aux vRNPs et aux ARN, empêchant la polymérase virale de synthétiser l'ARN.

La nucléoprotéine NP. Comme NP sera très détaillée dans le premier chapitre de la partie Résultats-Discussions portant sur le complexe NP/importine α , je n'en parlerai que brièvement ici. C'est une protéine de 58 kDa (498 acides aminés) codée par le segment 5 et qui recouvre entièrement l'ARN viral comme cela a été présenté auparavant (**Figure 2.6**). Elle possède différentes caractéristiques : elle est indispensable, comme les sous-unités de la polymérase précédemment présentées, à la transcription et réplication virales (Huang *et al.*, 1990 ; Kimura *et al.*, 1992 ; de la Luna *et al.*, 1993 ; Mena *et al.*, 1994), elle se lie à l'ARN (Baudin *et al.*, 1994 ; Albo *et al.*, 1995 ; Kobayashi *et al.*, 1994 ; Elton *et al.*, 1999a ; Medcalf *et al.*, 1999), elle polymérise pour former des structures identiques aux vRNPs natives (Ruigrok et Baudin, 1995), elle possède des signaux de localisation nucléaire (NLS, voir le chapitre suivant sur le transport nucléocytoplasmique) (Wang *et al.*, 1997 ; Neumann *et al.*, 1997).

Le complexe de la polymérase de la grippe. La polymérase virale est composée de trois sous-unités : PB1, PB2 (protéines basiques toutes les deux) et PA (protéine acide). Les trois sous-unités sont nécessaires à un cycle complet de transcription et réplication, bien que chaque sous-unité possède une fonction bien précise (**Figure 2.10**).

Brièvement, la sous-unité PB1, codée par le segment 2, possède l'activité de polymérase proprement dite et une activité d'endonucléase : elle clive les coiffes en 5' des ARNm cellulaires (Li *et al.*, 2001). PB1 serait également la sous-unité de la polymérase permettant la discrimination des vRNP(-) des cRNP (+) qui sont des intermédiaires réplicatifs en reconnaissant les promoteurs des cRNP et des vRNP par deux domaines différents (Gonzalez et Ortin, 1999).

PB2, codée par le segment, reconnaît les coiffes 5' m⁷Gppp (Shi *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2001) et permet ainsi leur clivage par PB1 (Li *et al.*, 2001).

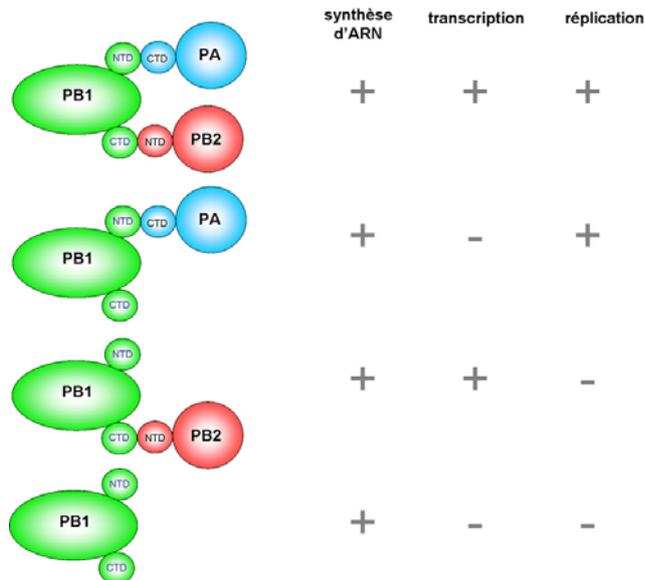


Figure 2.10. Les fonctions associées aux sous-unités et sous-unités du complexe de l'ARN polymérase du virus de la grippe (adapté de Ishihama, 1996). Synthèse des travaux de Kobayashi *et al.*, 1996 ; Toyoda *et al.*, 1996 ; Kimura *et al.*, 1992 ; Nakagawa *et al.*, 1995 et 1996. NTD : domaine N-terminal

La sous-unité PA (segment 3) est une phosphoprotéine (Sanz-Ezquerro *et al.*, 1998) impliquée dans la dégradation de certaines protéines (Sanz-Ezquerro *et al.*, 1995 et 1996). Elle appartient à la famille des sérines protéases de type chymotrypsine (Hara *et al.*, 2001). Elle peut se lier à une protéine cellulaire de type activateur de transcription (Huarte *et al.*, 2001).

Les sous-unités de la polymérase, avec NP, sont les quatre protéines virales indispensables pour les étapes de transcription et réplication dans le noyau (Huang *et al.*, 1990 ; Kimura *et al.*, 1992 ; de la Luna *et al.*, 1993 ; Mena *et al.*, 1994). On dispose d'une reconstruction en MET à 23 Å du complexe de la polymérase associée à une vRNP recombinante (Area *et al.*, 2003) (Figure 2.11).

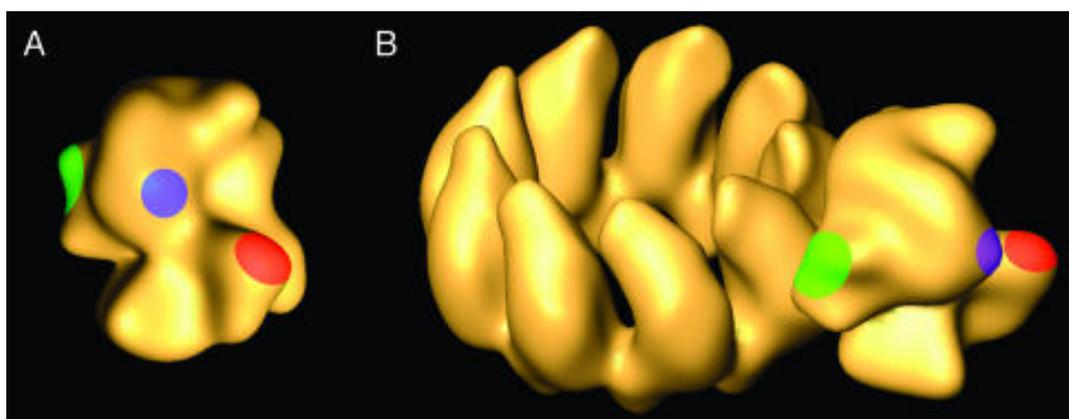


Figure 2.11. Modèle 3D de la polymérase du virus de la grippe (Area *et al.*, 2003). Les zones colorées indiquent la position de domaines spécifiques aux sous-unités : en rouge, le domaine N-terminal de PB2 ; en bleu, le domaine C-terminal de PA ; en vert, le domaine C-terminal de PB1. (A) Modèle obtenu par reconstruction 3D à partir des images de microscopie. (B) Position des sous-unités de la polymérase dans le contexte de la structure d'une vRNP.

La protéine non structurale NS1. Comme NEP, NS1 est aussi codée par le plus petit segment du génome viral, le segment 8 (Lamb et Chopin 1979 ; Inglis *et al.*, 1979), grâce à un épissage alternatif du transcrit viral (comme pour M1 et M2 codées par le segment 7). Son nom de protéine non structurale vient du fait qu'elle est exprimée dans les cellules infectées mais n'est pas présente dans la particule virale. C'est une protéine de 230 résidus et faisant 27 kDa. Elle a de nombreuses fonctions dans le cycle viral, plus particulièrement en ce qui concerne l'inhibition de la réponse antivirale cellulaire (Hatada *et al.*, 1999 ; Bergmann *et al.*, 2000, Garcia-Sastre *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2000), l'inhibition de la maturation et de l'export nucléaire des ARNm cellulaires en se fixant sur les protéines cellulaires CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) et PABII (Poly(A) binding Protein II) (Chen *et al.*, 1999 ; Nemeroff *et al.*, 1998) (**Figure 2.12**), l'augmentation de la traduction des ARNm viraux (Enami *et al.*, 1994 ; de la Luna *et al.*, 1995 ; Salvatore *et al.*, 2002).

NS1A PROTEIN

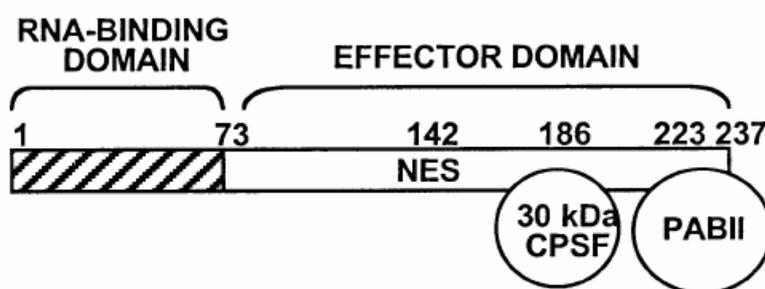


Figure 2.12. Les différents domaines de liaison de NS1 (Krug *et al.*, 2003).

La structure du domaine de liaison à l'ARN, dans la partie N-terminale, a par ailleurs été résolue aux rayons X (Liu *et al.*, 1997) (**Figure 2.13**) et par RMN (Chien *et al.*, 1997).

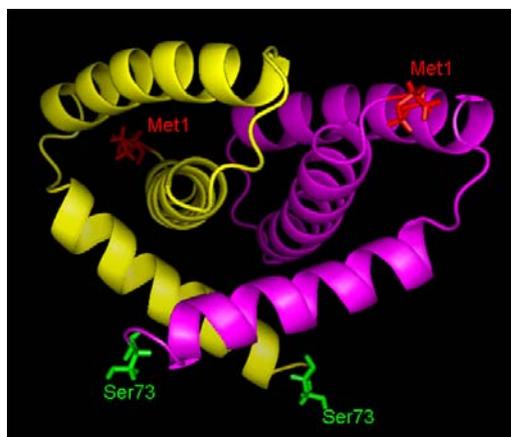


Figure 2.13. Structure cristallographique du dimère de NS1 correspondant aux résidus 1 à 73 (code PDB : 1NS1, Liu *et al.*, 1997). Représentation faite avec Pymol.

La protéine d'export nucléaire NEP (anciennement appelée NS2). En comparaison de M1, il existe relativement peu de données sur les caractéristiques fonctionnelles et structurales de NEP. Bien qu'elle porte à l'origine le nom de protéine non structurale (NS2), NEP est présente en plusieurs exemplaires (100-230) dans une particule virale (Richardson et Akkina, 1991 ; Yasuda *et al.*, 1993). C'est une petite protéine de 14 kDa (121 acides aminés) (Figure 2.14) produite par un épissage alternatif du segment 8 du génome viral, segment qui code aussi pour NS1 (Inglis *et al.*, 1979 ; Lamb et Chopin, 1979).

Comme M1, NEP est une protéine tardive qui n'a pas de localisation intracellulaire précise, elle est détectée dans le noyau et le cytoplasme. Son domaine allant des résidus 59 à 116 a été cristallisé et sa structure résolue par notre équipe (Akarsu *et al.*, 2003) (code PDB : 1PD3).

Ainsi que son nom l'indique, NEP est une protéine qui se lie à l'exportine cellulaire CRM1 (Chromosome Maintenance Protein 1, voir le chapitre suivant de l'introduction sur le transport nucléocytoplasmique) grâce à son motif d'export nucléaire NES. Avec M1, NEP joue un rôle fondamental dans l'export nucléaire du génome viral (O'Neill *et al.*, 1997 ; Neumann *et al.*, 2000 ; Akarsu *et al.*, 2003). Toute cette partie sera mieux détaillée dans le troisième chapitre de la partie Résultats-Discussion portant sur l'export nucléaire des vRNPs, essentiellement présentée sous forme d'article (Akarsu *et al.*, 2003).

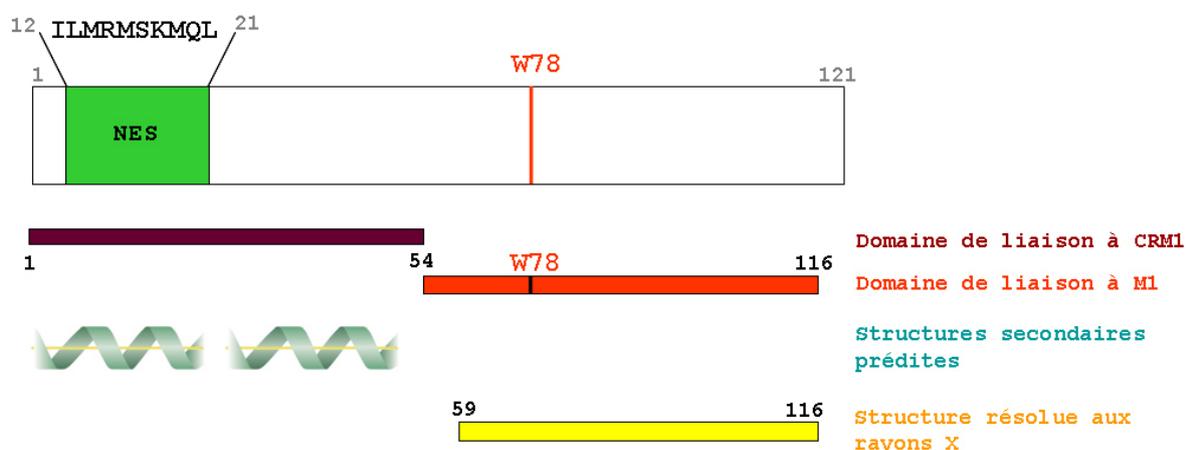


Figure 2.14. Les domaines structuraux et fonctionnels de la protéine virale NEP.

Outre la fonction de NEP dans la sortie des vRNPs du noyau, il faut en ajouter une deuxième : tout comme M1 (Ye *et al.*, 1989 ; Watanabe *et al.*, 1996), NEP semble avoir un effet inhibiteur dans la synthèse des ARN viraux (Bullido *et al.*, 2001), dans le but éventuel de faciliter l'assemblage des vRNPs pour leur sortie. Mais ces résultats n'ont pas été étudiés plus en détail par d'autres travaux.

E) Le cycle d'infection du virus de la grippe (Figure 2.17)

Rôle de l'HA dans la fixation du virus sur la cellule hôte et dans la virulence. Le virus de la grippe commune a pour cibles les cellules épithéliales du système respiratoire. Le cycle d'infection débute par la liaison spécifique de la particule virale à des récepteurs (glycoprotéines, gangliosides, glycolipides) situés à la surface de la membrane plasmique de la cellule, les acides sialiques. Ces derniers sont reconnus de façon spécifique par la glycoprotéine de surface virale HA, bien que l'interaction reste faible (de l'ordre de 10^{-3} M, mais cela est compensé par la densité de récepteurs cellulaires). HA est certainement la protéine du virus de la grippe la mieux caractérisée. C'est une protéine de 76 kDa, qui subit ensuite de nombreuses modifications structurales tout au long de sa synthèse et du cycle viral : fabriquée dans le réticulum endoplasmique, HA se présente d'abord sous la forme d'un précurseur (HA_0) ; puis elle est clivée en deux sous-unités (HA_1 et HA_2) (Skehel et Waterfield, 1975) à l'extrémité N-terminale de sa région appelée « peptide de fusion », ces deux domaines restant liés par un pont disulfure (Skehel et Waterfield, 1975). Lors de l'adoption de la conformation native de HA, il se forme d'autres ponts disulfures, de nombreuses glycosylations (Ward *et al.*, 1980 ; Naim et Roth, 1993) et une trimérisation de la protéine. C'est cette structure clivée, trimérique et contenant des modifications post-traductionnelles qui est présente à la surface des virus infectieux.

Il est important de noter que le clivage de l'HA est un des mécanismes majeurs impliqués dans la virulence et le tropisme du virus de la grippe. En effet, ce clivage est indispensable au caractère infectieux du virus (Lazarowitz et Choppin, 1975) et il confère toutes ses propriétés structurales et fonctionnelles à l'HA (liaison au récepteur cellulaire, fusion des membranes virale et endosomale comme on le verra par la suite). L' HA_0 possède un site de clivage particulier caractérisé par un (site monobasique) ou plusieurs résidus basiques (site polybasique) (Bosch *et al.*, 1981 ; Garten *et al.*, 1981 ; Kawaoka et Webster, 1988). Dans les souches virales peu virulentes et limitées au tractus respiratoire chez l'homme (intestinal chez les oiseaux), ce site consiste en général à une unique arginine (ex : HA_1 -PSIQVR-GL- HA_2). En revanche, dans les souches aviaires très pathogènes, ce site de clivage consiste en plusieurs résidus basiques, formant ainsi une séquence consensus de type R-X-K/R-R.

Différentes protéases reconnaissent des séquences monobasiques et clivent HA_0 en HA_1 et HA_2 (Klenk et Garten, 1994). L'une d'entre elles serait la tryptase Clara (protéase

extracellulaire), probablement la protéase la plus importante dans l'activation des virus de la grippe humaine dans leur environnement naturel, à savoir le tractus respiratoire (Kido *et al.*, 1992). Des protéases bactériennes, impliquées dans des pneumonies causées par la grippe en co-infection, pourraient aussi cliver l'HA₀ au niveau d'une séquence monobasique (Tashiro *et al.*, 1987).

Les HAs à sites multibasiques seraient en revanche clivables par des protéases ubiquitaires comme la furine (protéase intracellulaire présente dans l'appareil de Golgi) (Stieneke-Gröber *et al.*, 1992), ce qui conduit à un tropisme bien plus vaste du virus à l'origine d'une grave infection systémique. La haute pathogénicité de certaines souches pourrait aussi être provoquée par le recrutement du plasminogène par NA : le plasminogène, protéine également ubiquitaire, une fois modifié en plasmine pourrait activer une HA à site de clivage monobasique (Lazarowitz *et al.*, 1973 ; Murakami *et al.*, 2001).

Ainsi, les sites de clivage monobasiques sont reconnus par des protéases extracellulaires (ex : tryptase Clara), alors que les séquences polybasiques sont reconnues, elles, par des protéases intracellulaires comme la furine.

La structure cristallographique de l'HA est connue depuis presque 25 ans désormais (Wilson *et al.*, 1981) et elle a permis de mieux comprendre certains points du fonctionnement du virus de la grippe, comme les mécanismes d'interaction avec le récepteur cellulaire et l'entrée du virus dans la cellule grâce aux changements conformationnels de HA (**Figure 2.15**). Ainsi, HA possède un domaine antigénique (tête globulaire, plus une partie de la tige) très variable qui comprend par ailleurs le domaine de liaison à l'acide sialique (domaine constant): ceci expliquerait pourquoi la liaison HA/acide sialique est faible, tout en restant spécifique. Une interaction faible entre l'antigène et le récepteur est également importante pour le relargage des particules virales lors du bourgeonnement : une interaction trop forte rendrait difficile le relargage des virions et gênerait la propagation virale.

Par ailleurs, dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire de l'homme, l'HA reconnaît l'acide sialique qui est sous une conformation de type α -(2,6). La nature du récepteur, à savoir la conformation de l'acide sialique, est à l'origine de la spécificité des hôtes des différents virus de la grippe (Carroll *et al.*, 1981 ; Roger et Paulson, 1983). En effet, dans le tractus respiratoire de l'homme, l'acide sialique a une conformation de type α -(2,6), alors que dans les cellules intestinales d'oiseaux, il possède une conformation de type α -(2,3). Chez le porc, les deux types de conformation de l'acide sialique - α -(2,3) et α -(2,6) - co-existent, ce qui fait de cet animal un lieu de recombinaison possible entre des gripes aviaire et humaine pouvant déboucher sur des pandémies.

Endocytose. Une fois fixé sur la cellule hôte grâce aux nombreuses interactions HA/acide sialique formées, le virus de la grippe entre dans la cellule hôte par endocytose via des vésicules à clathrine (Lazarovits et Roth, 1988).

L'intérieur de l'endosome s'acidifie du fait des pompes à protons cellulaires, conduisant à une modification tridimensionnelle de l'HA qui permet la fusion des membranes virale et endosomale (**Figure 2.16**). Cette acidification intra-endosomale active les canaux à protons du virion, c'est-à-dire les protéines virales M2. L'intérieur du virion s'acidifie à son tour, provoquant la dissociation des vRNPs de la couche de protéine matricielle M1 qui tapisse la face interne de la membrane virale. Ces deux événements pH dépendants - fusion des membranes virale et endosomale via l'HA et dissociation de M1 des vRNPS - permettent la libération des 8 segments génomiques dans le cytoplasme.

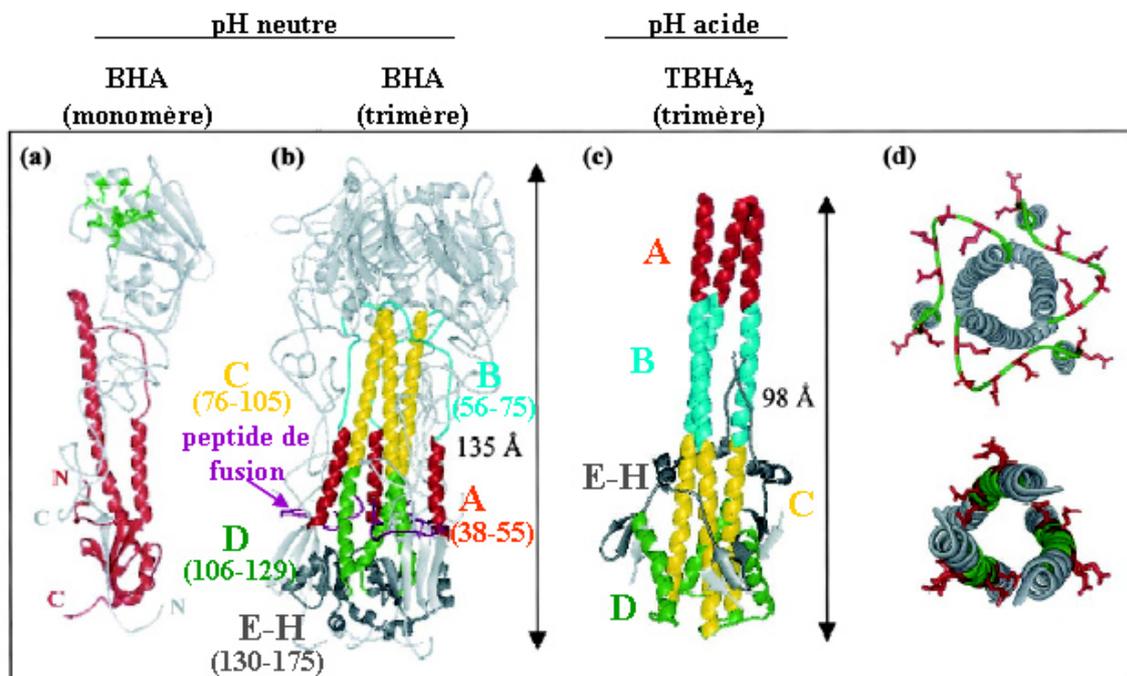


Figure 2.15. Différentes conformations de l'hémagglutinine du virus de la grippe. (a) chaînes HA₁ (gris) et HA₂ (rouge) d'un monomère de HA protéolysé à la bromolaine à pH neutre (BHA) (Weis *et al.*, 1990 ; code PDB : 2HMG). (b) Structure trimérique de HA sous la même forme à pH neutre et en (c) structure trimérique de HA composée de la chaîne HA₂ (résidus 38 à 175) liée par un pont disulfure à la chaîne HA₁ (résidus 1 à 27) à pH acide (TBHA₂) (Bullough *et al.*, 1994 ; code PDB : 1HTM). Dans (a), les extrémités N- et C-terminales des deux chaînes sont indiquées, et les résidus de liaison au récepteur sont en vert. Les peptides de fusion de chaque monomère sont en violet dans la figure (b). Dans (b) et (c), les segments HA₂ colorés en rouge (hélice A, résidus 38-55), bleu (coil dans (b) et hélice B dans (c), résidus 56-76), vert (hélice D, résidus 106-129) et gris sombre (hélices E-H, résidus 130-175) subissent un changement conformationnel important à pH acide. La partie en jaune (hélice C, résidus 76-105) conserve sa conformation d'origine (coiled-coil α -hélicoïdal gauche). En (d), vue supérieure de la conformation de HA₂ dans BHA (en haut) et TBHA₂ (en bas). Les glutamates jouent un rôle important dans la stabilisation de l'hélice B de TBHA₂.

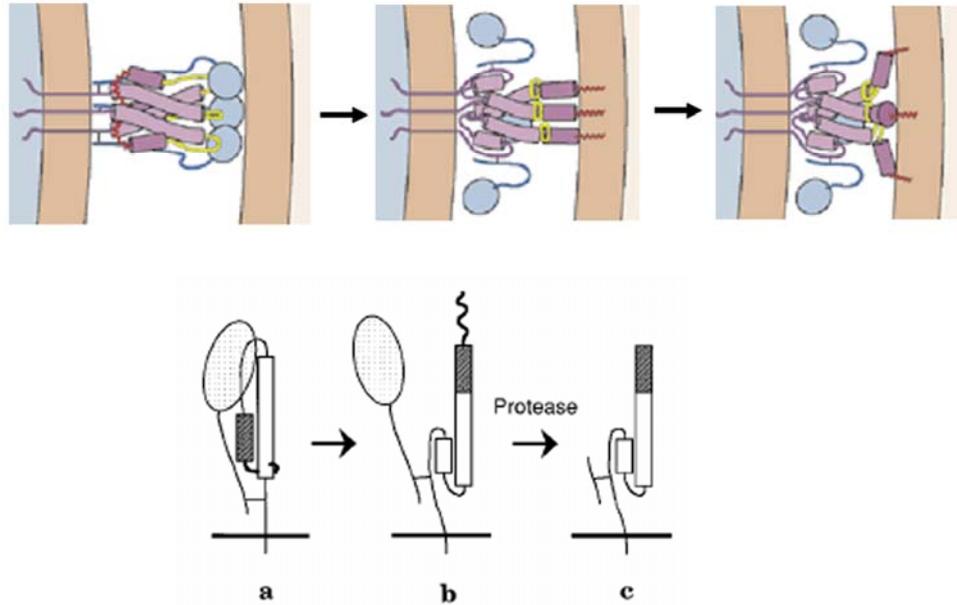


Figure 2.16. Modèle de fusion des membranes virale et endosomale. En haut (Enquist *et al.*, in *Principles of Virology : Molecular Biology, Pathogenesis and Control*): l'enveloppe virale (dessous) est juxtaposée à la membrane de l'endosome (dessus). Dans sa conformation native, le trimère d'HA facilite l'attachement du virus à la membrane endosomale via les sous-unités HA₁ (boules grises). Sous l'effet du pH acide de l'endosome, les sous-unités HA₁ se dissocient, les régions en boucles (jaune) deviennent hélicoïdales et se juxtaposent aux domaines coiled coil HA₂ (violet); les régions peptides de fusion (rouge) s'insèrent dans la membrane endosomale. La fusion membranaire proprement dite ne requiert que les domaines HA₂. En bas (d'après Carr *et al.*, 1997): a) le monomère d'HA native (HA₀) est résistant à la protéolyse; b) le changement conformationnel: HA₁ se dissocie de HA₂ et le peptide de fusion est propulsé vers le haut de la molécule; c) protéolyse de la forme fusogénique: une partie de HA₁ et le peptide de fusion de HA₂ sont dégradés, laissant la majorité de HA₂ lié par le pont disulfure à un fragment de HA₁.

Import actif du génome viral dans le noyau cellulaire. Les vRNPs ainsi libérées dans le cytoplasme de la cellule hôte, en phase précoce d'infection virale, doivent ensuite gagner le noyau pour y être transcrites et répliquées. Pour cela, le génome viral emprunte le système d'import nucléaire spécifique des importines α/β qui nécessite la présence d'un signal de localisation nucléaire, le NLS. Cette étape sera détaillée plus en détail dans les chapitres à venir. Brièvement, deux points sont à retenir dans cette étape: d'une part, la dissociation de M1 des vRNPs pH-dépendant est indispensable à leur translocation nucléaire (Martin et Helenius, 1991). D'autre part, le composant de la vRNP impliqué dans l'import nucléaire n'a pas encore été clairement identifié: la nucléoprotéine (NP) (Wang *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1998) et chacune des trois sous-unités de la polymérase virale (Nieto *et al.*, 1994; Nath et Nayak, 1990; Mukaigawa et Nayak, 1992) sont connues

pour posséder au moins un NLS. Le NLS leur permet d'entrer dans le noyau après leur synthèse dans le cytoplasme. En revanche, on ne sait toujours pas quel NLS est impliqué dans le transport d'une vRNP complète en début d'infection virale.

Transcription et réplication virales dans le noyau. L'hétérotricomplexe de la polymérase et la NP sont les protéines indispensables à ces activités (Huang *et al.*, 1990 ; Kimura *et al.*, 1992 ; Mena *et al.*, 1994). Dès que les vRNPs atteignent le noyau, commence la transcription des ARNm viraux (De la Luna *et al.*, 1993). Une particularité du virus de la grippe est la capture des ARNm cellulaires coiffés et polyadénylés. Après fixation des coiffes m⁷Gppp et clivage des ARN environ dix bases après la coiffe, ces fragments d'ARN servent d'amorces à l'initiation de la synthèse des ARNm viraux par la sous-unité PB1 de la polymérase (Bouloy *et al.*, 1978 ; Plotch *et al.*, 1979 et 1981 ; Krug *et al.*, 1979). PB1 clive les coiffes m⁷Gppp des ARNm cellulaires grâce à son activité d'endonucléase dépendant de trois acides aminés essentiels (Li *et al.*, 2001). Les ARNm viraux sont polyadénylés en 3' (comme la plupart des ARNm cellulaires) grâce à une séquence riche en uridines proche de l'extrémité 5' de l'ARNv matrice (Robertson *et al.*, 1981 ; Luo *et al.*, 1991). Alors que l'ARNv des vRNPs et l'ARNc (intermédiaire réplcatif de polarité positive) sont recouverts de nucléoprotéines, l'ARNm viral ne l'est pas.

Il existe une régulation temporelle de la transcription virale car les produits de la synthèse des ARNm viraux varient au cours de l'infection. Par exemple, en phase précoce, les ARNm de NS1, NP et des sous-unités de la polymérase sont majoritaires ; puis ce sont ceux de HA, NA, M1 et NEP qui prédominent.

Alors que l'utilisation des coiffes cellulaires est une activité présente aussi chez d'autres virus à ARN simple brin négatif comme les *Arénaviridae* et les *Bunyaviridae* (*Mononegavirales* avec un cycle entièrement cytoplasmique), le virus de la grippe, lui, utilise les coiffes des ARNm cellulaires présents dans le noyau. Je reparlerai de ce mécanisme dans la partie Résultats-Discussion.

En ce qui concerne la réplication du virus de la grippe, il s'agirait d'un processus qui ne serait pas régulé comme sa transcription. Elle passe par un intermédiaire, l'ARNc (+), qui est la copie complémentaire exacte du ARNv. Il est recouvert de NP et est associé à l'hétérotricomplexe de la polymérase (cRNP). On ne sait toujours pas cependant comment se fait la discrimination entre les cRNP et vRNP lors de l'export nucléaire de ces derniers, les cRNP restant strictement nucléaires. D'après de récentes études (Vreede *et al.*, 2004), les ARNc seraient produits très tôt, en même temps que les ARNm viraux. Mais du fait de la

quantité encore insuffisante de polymérase virale, les ARNc seraient rapidement dégradés par les nucléases cellulaires.

Dans le noyau de la cellule infectée, les vRNPs nouvellement produites sont étroitement associées à la matrice nucléaire (Bukrinskaya *et al.*, 1979 ; Lopez-Turiso *et al.*, 1990): une extraction à hauts sels est nécessaire pour dissocier les vRNPs de la chromatine de la cellule (Bui *et al.*, 2000). Cela permet ainsi au génome viral d'être proche de la machinerie transcriptionnelle cellulaire et de dérober les coiffes des ARNm cellulaires avant que ceux-ci ne soient pris en charge par CBP (Cap Binding Protein).

Cette partie sera discutée plus en détail plus tard, dans la deuxième partie de Résultats et Discussion (Garcia-Robles *et al.*, 2005).

Export nucléaire des vRNPs. Une fois synthétisées, les nouvelles vRNPs doivent sortir du noyau pour être encapsidées au niveau de la membrane plasmique où a lieu le bourgeonnement des particules virales. La sortie des vRNPs se fait au travers du pore nucléaire, via le système d'export spécifique CRM1 (Chromatin Maintenance Protein 1) (Elton *et al.*, 2001 ; Ma *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2001). Le système d'export cellulaire sera abordé plus en détail dans la section sur le transport nucléocytoplasmique de la cellule. Deux protéines virales tardives, NEP (Nuclear Export Protein) et M1 semblent jouer un rôle clef dans cette étape. Ce mécanisme est traité dans la troisième partie de Résultats et Discussions (Akarsu *et al.*, 2003).

Assemblage des segments génomique au niveau de la membrane plasmique et bourgeonnement. On connaît peu de choses sur l'assemblage de la particule virale. Il semblerait que les vRNPs soient incorporées seulement lorsque le virion commence à prendre forme. Le bourgeonnement se fait au niveau de domaines bien particuliers : les radeaux lipidiques (Scheiffele *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2000). Ce sont des zones de membrane plasmique cellulaire où sont assemblées les protéines de surfaces virales HA, NA et M2, et la protéine M1. HA, NA et M2 sont enchassées dans la membrane plasmique, alors que M1 forme une couche protéique sur la face cytoplasmique de la bicouche lipidique (Ruigrok *et al.*, 2000). Le modèle couramment formulé est l'association préalable de M1 avec la bicouche lipidique, suivie du recrutement des HA et NA dont les queues cytoplasmiques sont reconnues par M1. Puis M1 permettrait la fixation des vRNPs et leur incorporation dans la particule en formation.

3 - LE TRANSPORT NUCLEOCYTOPLASMIQUE

A) Le complexe du pore nucléaire (NPC)

Le NPC : voie de passage des échanges nucléocytoplasmiques. Dans la cellule eucaryote, l'existence de différentes organelles nécessite un adressage spécifique et une régulation fine de la translocation des molécules. Le noyau en est une illustration : l'enveloppe nucléaire impose une barrière qui contrôle l'accès à l'ADN. Alors que la synthèse des ARN se fait dans le noyau, celle des protéines a lieu dans le cytoplasme, d'où le transport intense et sélectif de ces molécules dans les deux sens à travers les complexes du pore nucléaire ou NPC.

En ce qui concerne les protéines, le noyau se distingue des autres compartiments cellulaires (mitochondrie, péroxysome, réticulum endoplasmique) en ceci qu'elles sont transportées au niveau de la membrane nucléaire sous une conformation native (cette forme native étant acquise durant la translocation dans le cas des autres organelles). Outre cette particularité de permettre le passage de molécules natives, le trafic nucléocytoplasmique se caractérise aussi par la bidirectionnalité du transport des cargos à travers le même NPC (Feldherr *et al.*, 1984 ; Nachury et Weis, 1999).

Il en existe une centaine par noyau, leur nombre dépendant du type cellulaire et de la progression dans le cycle cellulaire. Le NPC peut permettre le passage de 500 à 1000 macromolécules par seconde (Ribbeck et Görlich, 2001 ; Smith *et al.*, 2002). Les molécules de poids moléculaire inférieur à 40 KDa environ peuvent passer à travers les canaux nucléaires par simple diffusion passive. En revanche, les macromolécules de diamètre supérieur à cette limite de diffusion sont importées/exportées de façon active et sélectivement via un mécanisme signal-dépendant (Dingwall *et al.*, 1982). Le NPC permet ainsi le passage d'éléments pouvant aller jusqu'à 39 nm (Panté et Kann, 2002)

Structure du NPC. Chaque NPC est un gigantesque assemblage protéique d'environ 125 MDa composé d'une centaine de protéines (chez les Eucaryotes supérieurs) appelées nucléoporines (Nups). Il a été récemment démontré que des facteurs impliqués dans l'export des ARN messagers (Hodge *et al.*, 1999) et la mitose (Iouk *et al.*, 2002) pourraient aussi s'associer au NPC. La structure du NPC a été affinée tout au long des années grâce aux progrès de la microscopie électronique et cinq reconstructions tri-dimensionnelles (3D) ont

révélé une architecture fine du NPC (Hinshaw *et al.*, 1992 ; Akey et Radermacher, 1993 ; Yang *et al.*, 1998 ; Stoffler *et al.*, 2003 ; Beck *et al.*, 2004) (**Figure 3.1**).

Il est ainsi établi qu'un NPC, de symétrie axiale 8 perpendiculaire à la membrane nucléaire (Kirschner *et al.*, 1977), comprend 3 sous-structures principales : des queues cytoplasmiques longues de 35 nm environ (Beck *et al.*, 2004), un corps central et un panier nucléaire.

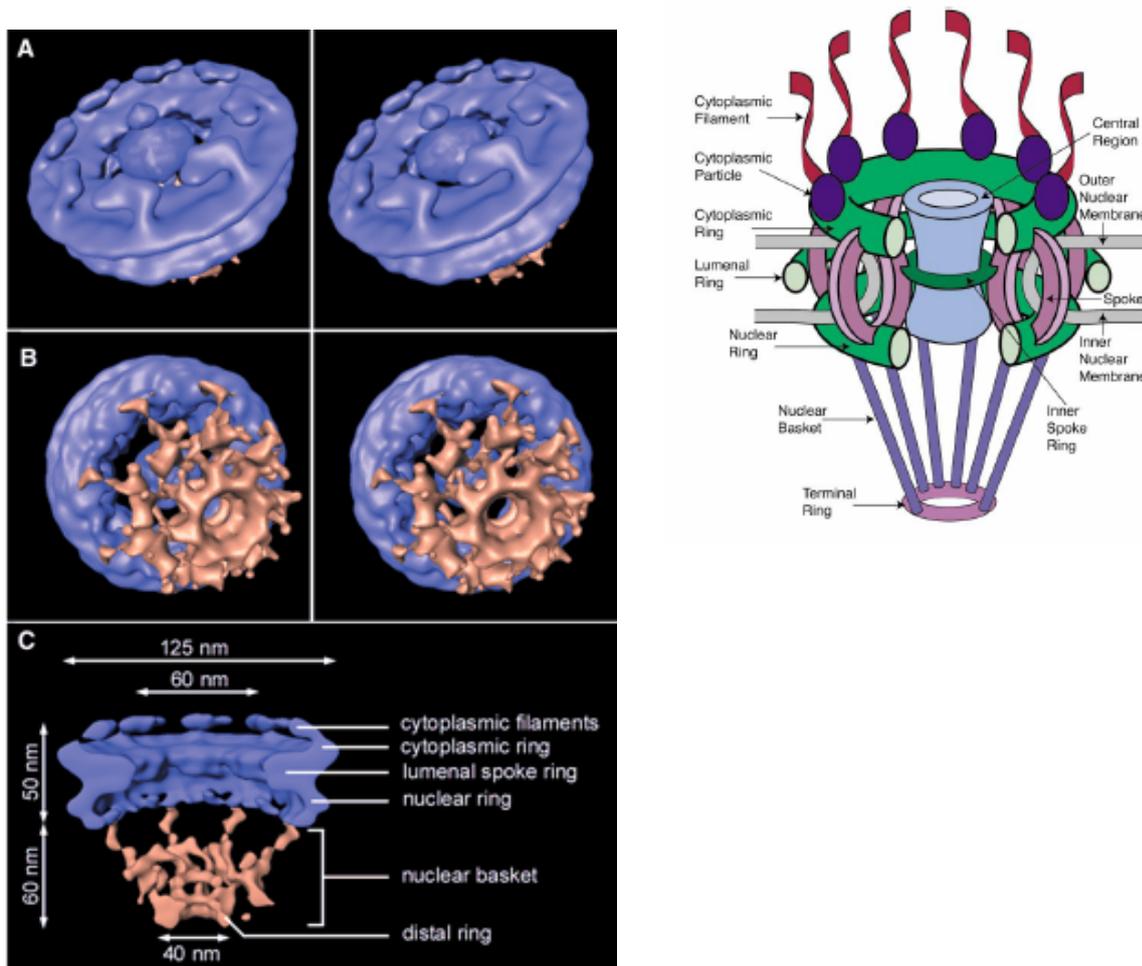


Figure 3.1. A gauche : structure du NPC de *Dictyostélium* (d'après Beck *et al.*, 2004). (A) Vue stéréo de la face cytoplasmique du NPC. Les filaments cytoplasmiques, recourbés, sont arrangés autour du canal central . (B) Vue stéréo de la face nucléaire du NPC. L'anneau distal du panier (représenté en marron) est connecté à l'anneau nucléaire par les filaments nucléaires. (C) Coupe longitudinale du NPC. Les dimensions des principaux éléments sont indiquées. A droite : diagramme schématisé des composants du NPC (d'après Suntharaligam *et al.*, 2003). La structure a une symétrie apparente d'axe 8 perpendiculaire au plan de la membrane nucléaire. Certaines portions ont été enlevées dans ce diagramme pour montrer l'architecture de la région centrale. Toutes les structures présentes dans les NPC des vertébrés sont représentées, avec la face cytoplasmique vers le haut. Adaptation du modèle de Rout et Wente, 1994.

Le corps central du NPC est composé de 8 rayons retenus par un anneau nucléaire et un anneau cytoplasmique. Les queues cytoplasmiques sont attachées à l'anneau cytoplasmique,

alors que les fibrilles issues de l'anneau nucléaire (environ 100 nm de long) sont reliées entre elles aux extrémités distales pour former le panier nucléaire. Ces structures filamenteuses seraient les sites d'ancrage des complexes de transport.

Les dernières études portant sur la structure du NPC montrent que c'est une structure dynamique et non figée dans un état donné (Beck *et al.*, 2004 ; Rabut *et al.*, 2004) : certaines Nups peuvent se lier au cargo et l'escorter durant le transport nucléaire. Il existerait ainsi trois classes de Nups : les Nups d'échaffaudage très stables et peu dissociables, les Nups adaptatrices qui sont mobiles et les Nups dynamiques très mobiles (Rabut *et al.*, 2004).

Mécanisme de translocation dans le NPC. La translocation du cargo à travers le NPC est basée sur l'interaction entre le transporteur du cargo et des motifs spécifiques présents sur certaines Nups localisées sur chaque face du NPC et dans le corps central (Fahrenkrog *et al.*, 2000). Ce sont des motifs répétés glycine-leucine-phenylalanine-glycine GLFG, F-FG, et/ou FG séparés par des séquences polaires de longueur variable (Rout et Wentz, 1994). Ces domaines FG sont non structurés et composés d'enroulements aléatoires (Denning *et al.*, 2003). Ils forment ainsi un réseau de filaments qui empêchent le passage de molécules qui ne reconnaissent pas ces motifs spécifiques FG.

Trois modèles de translocation nucléaire sont proposés actuellement (**Figure 3.2**) : le premier est basé sur une probabilité de passage augmentée par les interactions entre le complexe transporteur/cargo et les motifs FG, le déplacement progressif au travers du canal se faisant tout simplement par une diffusion aléatoire de type brownien (Rout *et al.*, 2000). Le second modèle repose sur le principe d'exclusion de phase : les domaines FG interagissent faiblement entre eux pour former un réseau hydrophobe qui exclue les macromolécules hydrophiles, l'interaction entre le complexe transporteur/cargo et les motifs dissocie localement ce réseau au fur et à mesure de son avancée (Ribbeck et Görlich, 2001). Le troisième modèle de translocation nucléaire suggère une distribution des Nups FG le long du canal sous forme de gradient d'affinité directionnelle (Ben-Efraim et Gerace, 2001 ; Macara *et al.*, 2001).

Depuis la dernière décennie, les connaissances concernant les processus de transport des macromolécules à travers la membrane nucléaire se sont accrues. Ainsi, une vingtaine de transporteurs impliqués dans l'import et l'export nucléaires a déjà été répertoriée chez les eucaryotes supérieurs (**Figure 3.3**). Un grand nombre de ces transporteurs, appelés karyophérines, appartiennent à une famille de protéines appelée superfamille des importines

β , du fait de leur homologie avec l'importine β , protéine de 97 KDa identifiée comme étant l'élément de liaison au NPC (Adam et Adam, 1994 ; Chi *et al.*, 1995).

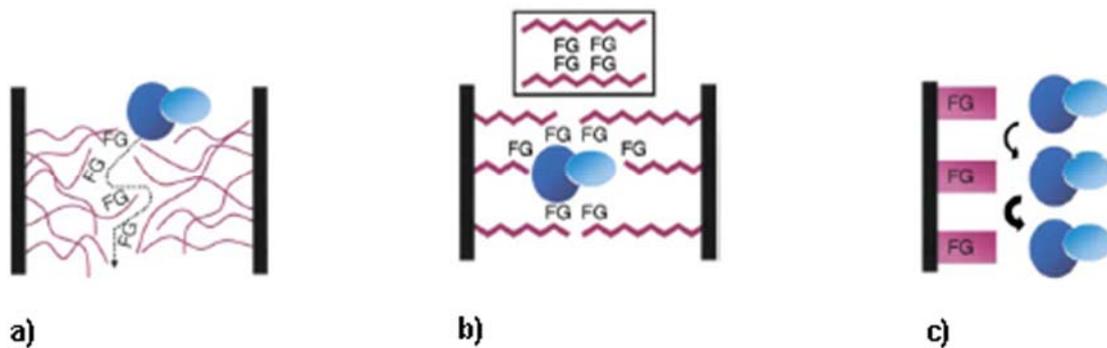


Figure 3.2. Les trois modèles de translocation nucléaire au travers du complexe du pore nucléaire (d'après Suntharalingam *et al.*, 2003). a) Modèle basé sur une diffusion aléatoire de type brownien (Rout *et al.*, 2000) ; b) modèle de l'exclusion de phase (Ribbeck et Görlich, 2001) ; c) modèle de gradient d'affinité directionnelle (Ben-Efraim et Gerace, 2001 ; Macara *et al.*, 2001).

La classification des karyophérines est rendue difficile par l'absence d'une nomenclature internationale unifiée du fait, entre autres, de travaux menés en parallèle dans différents organismes modèles. De plus, une même karyophérine peut transporter différentes sortes de cargos et un même cargo peut emprunter différentes karyophérines, ce qui rend impossible une classification basée sur la spécificité de substrat.

B) L'import nucléaire

Présentation. La première voie de transport nucléaire des macromolécules mise en évidence, dite «classique», fait intervenir l'hétérocomplexe importine α / importine β (Adam et Adam, 1994 ; Moroianu *et al.*, 1995 ; Görlich *et al.*, 1995 ; Imamoto *et al.*, 1995 ; Radu *et al.*, 1995). L'importine α fixe les cargos (Adam *et al.*, 1989 ; Adam et Gerace., 1991) et joue de ce fait le rôle de molécule « adaptatrice », alors que l'importine β se fixe au NPC : l'interaction de l'importine α liée au cargo, avec l'importine β aboutit à la translocation de l'hétérotricomplexe du cytoplasme vers le noyau. L'importine β est aussi appelée pour cette raison « récepteur d'importine ».

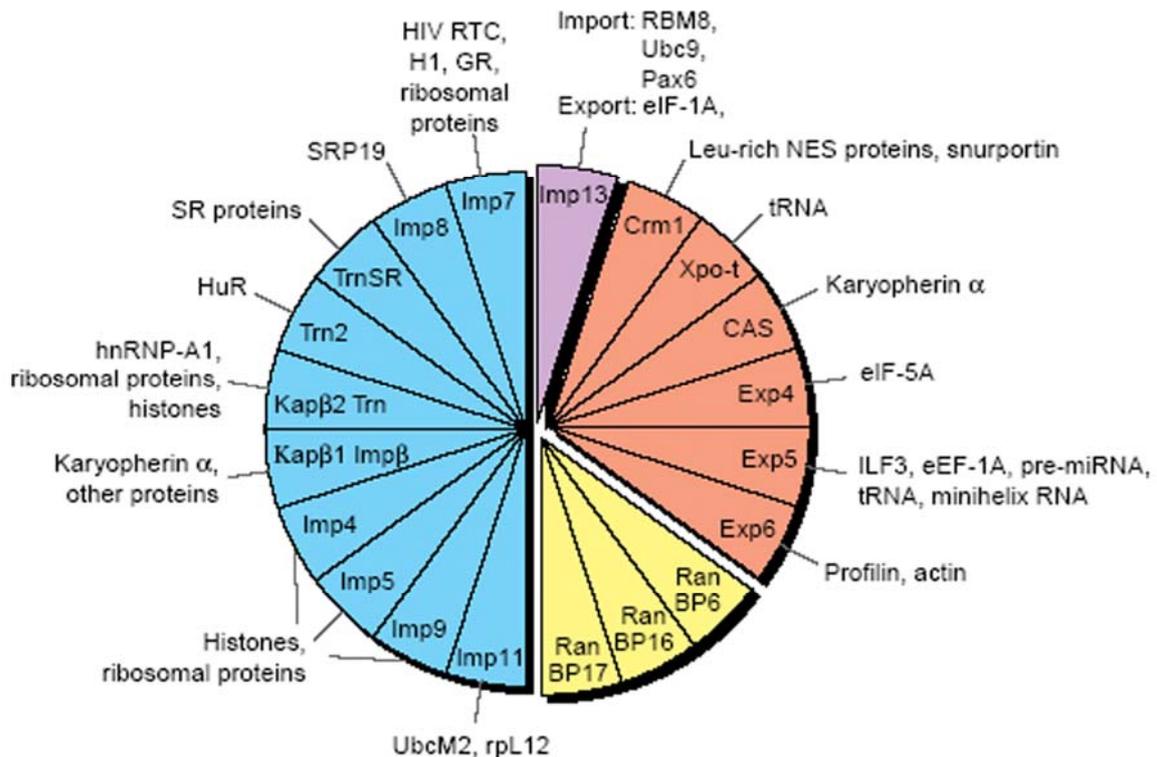


Figure 3.3. La superfamille des importines β de mammifère (Mosammaparast et Pemberton, 2004). Liste des karyophérines connues de mammifère et cargos qui leur sont associés. En bleu, les karyophérines de l'import ; en rouge, celles de l'export ; en violet, les karyophérines impliquées dans l'import et dans l'export ; en jaune, celles dont la fonction reste encore à déterminer. Les cargos connus sont notés à côté de chaque karyophérine.

L'import nucléaire médié par l'importine α peut être divisé en 4 étapes principales : (i) d'abord, le complexe ternaire cargo - importine α - importine β se forme dans le cytoplasme ; (ii) ensuite le complexe ternaire se fixe à des sites d'ancrage sur la face cytoplasmique du NPC ; (iii) l'ensemble est transloqué à travers le NPC grâce aux interactions importine β /nucléoporines ; (iv) la fixation de RanGTP sur l'importine β dissocie le complexe ternaire dans le noyau (**Figure 3.4**).

L'importine α est ensuite recyclée dans le cytoplasme grâce à l'exportine CAS - RanGTP ; l'hydrolyse de RanGTP conduit à la dissociation du complexe d'export et au relargage de l'importine α libre dans le cytoplasme.

Ce schéma simplifié n'est pas le seul moyen d'import nucléaire actif (Miyamoto *et al.*, 1997) mais est un modèle très répandu dans la littérature et le génome du virus de la grippe emprunterait aussi cette voie. Il existe par exemple le transporteur NTF2 (Nuclear Transport

Factor 2) qui permet l'import nucléaire de RanGDP. D'autres molécules, comme la β caténine, peuvent interagir directement avec le NPC, sans avoir recours aux importines α et β . D'autres encore, comme le facteur de transcription SREBP-2, se fixent à l'importine β directement (**Figure 3.4**).

Les choses se compliquent encore lorsqu'on sait que certains cargos peuvent emprunter différents transporteurs, ou encore que des cargos sans signaux spécifiques requis peuvent quand même être pris en charge par les importines (**Figure 3.5**). Cela montre simplement qu'il existe encore de nombreux mécanismes de transport nucléaire à découvrir.

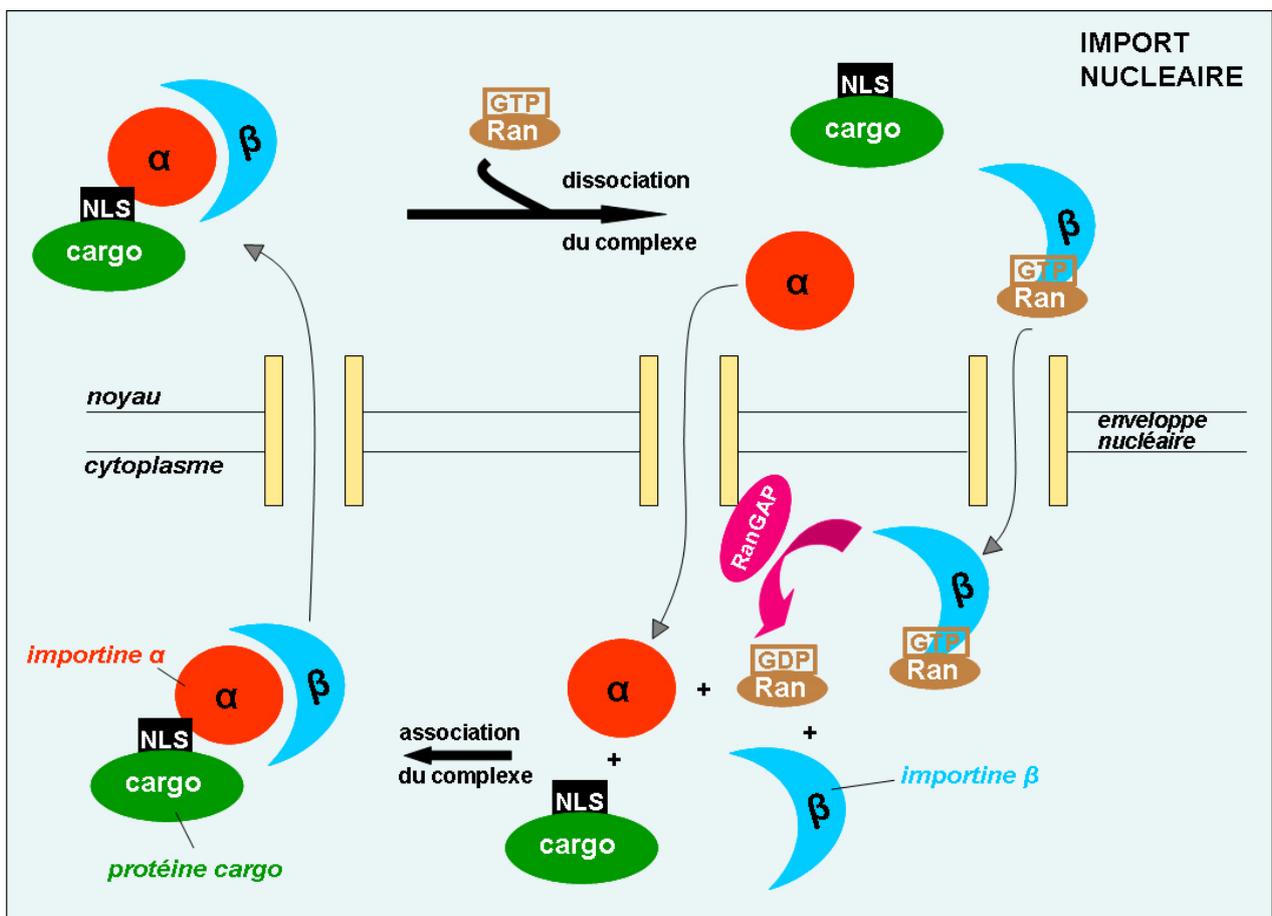


Figure 3.4. Le cycle de l'import nucléaire. L'importine α reconnaît le NLS du cargo et fixe l'importine β dans le cytoplasme ; l'ensemble est transloqué dans le noyau via le NPC. La fixation de RanGTP à l'importine α permet le relargage du cargo dans le noyau. Les karyophérines libres peuvent sortir du noyau pour un nouveau cycle d'import de cargo.

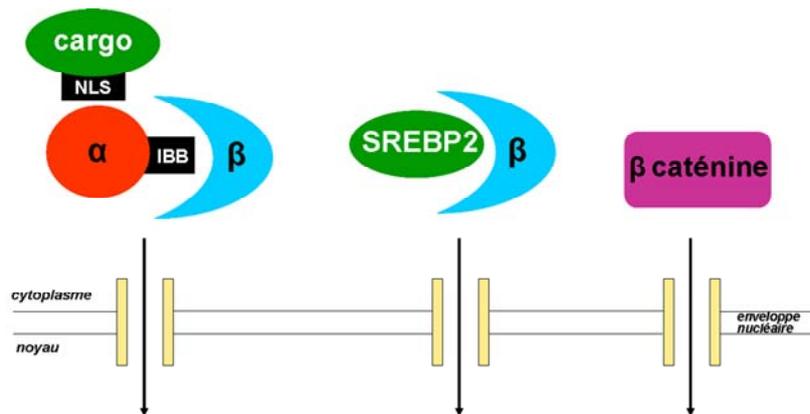


Figure 3.5. Les différentes voies d'import nucléaire. L'import nucléaire dit « classique » fait intervenir deux karyophérines : l'importine α qui sert d'adaptateur entre le cargo et l'importine β ; celle-ci se fixe au NPC. Certains cargos comme SREBP2 (Sterol Regulatory Element-Binding transcription factor 2, protéine de 62 kDa sous sa forme mature) peuvent se fixer directement à l'importine β . En revanche, la β -caténine (protéine de 92 kDa impliquée dans l'adhésion cellulaire par les cadhérines et dans la signalisation du facteur de croissance Wnt/Wingless) n'a pas besoin de karyophérine, elle est transloquée directement dans le noyau.

L'importine α . D'après les données de la littérature, l'import nucléaire d'une grande quantité de protéines fait intervenir l'importine α , adaptateur qui fait le lien entre le cargo et l'importine β (Moroianu *et al.*, 1995 ; Görlich *et al.*, 1995 ; Imamoto *et al.*, 1995 ; Radu *et al.*, 1995). La reconnaissance du cargo par l'importine α se fait par l'intermédiaire d'une séquence très particulière située sur le cargo : le signal de localisation nucléaire ou NLS (Nuclear Localisation Signal) (Weis *et al.*, 1995). Le NLS est composé d'un patch de plusieurs acides aminés basiques (arginine R, lysine K) (Nadler *et al.*, 1997 ; Hodel *et al.*, 2001). Il existe des NLS dits classiques de séquence consensus KK/RxK, et d'autres qui sont bipartites, de type 2K/R 10-12x 3K/R.

Le domaine structuré de l'importine α de levure a pu être cristallisé (Figure 3.6) en complexe avec le peptide NLS de l'antigène T de SV40 T, prototype du NLS classique monopartite (Conti *et al.*, 1998), et aussi en complexe avec le peptide NLS de la nucléoplasmine, prototype du NLS bipartite (Conti et Kuriyan, 2000). La forme entière de l'importine α de souris a également été résolue peu après (Kobe, 1999).

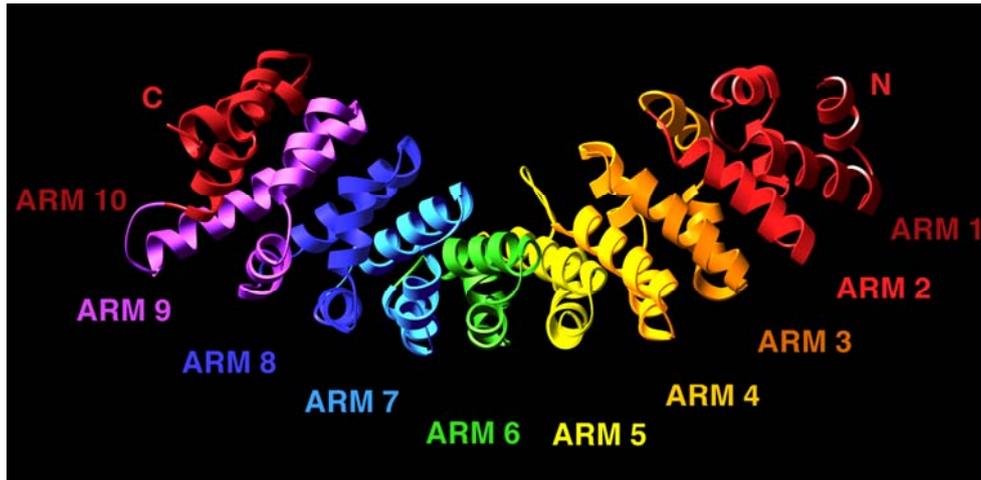


Figure 3.6. Structure cristallographique de l'importine α de levure (Conti *et al.*, 1998). La molécule contient 10 motifs ARM répétés en tandem. Excepté le premier motif, chaque ARM est composé de trois hélices α (H1, H2, H3). L'axe superhélicoïdal de la molécule est vertical. La représentation faite avec le programme *ViewerLite* (développé par Accelrys/Discovery Studio ViewerPro).

La structure ainsi obtenue montre que l'importine α est constituée de dix motifs répétés en tandem appelés « armadillo » (ARM) (Figure 3.7). Chaque armadillo est lui-même composé de la succession de trois hélices, ce qui donne une forme légèrement courbée et hélicoïdale à l'importine α .

Par ailleurs, l'importine α possède deux sillons de liaison au NLS, un majeur (les ARM 1 à 4) et un mineur (les ARM 7 et 8). La présence de deux sites de liaison au NLS suggère un mécanisme de reconnaissance des NLS de type bipartite.

Outre un site de liaison au NLS du cargo, l'importine α présente également un domaine de liaison à l'importine β dit « IBB » (Importin β Binding domain) localisé à l'extrémité N-terminale, composé d'environ 40 résidus très conservés et riche en acides aminés basiques (Görlich *et al.*, 1996 ; Weis *et al.*, 1996). Cet IBB est un domaine très flexible interagissant en *trans* avec l'importine β (Cingolani *et al.*, 1999), et en *cis* avec le domaine de liaison du NLS du cargo (Kobe, 1999). Riche en résidus basiques comme le NLS et flexible, le domaine IBB est un inhibiteur compétitif régulant la fixation du NLS du cargo à son site de liaison sur l'importine α . En absence d'importine β , le NLS peut quand même se fixer, mais plus faiblement, dans le sillon de liaison de l'importine α (Fanara *et al.*, 2000 ; Catimel *et al.*, 2001).

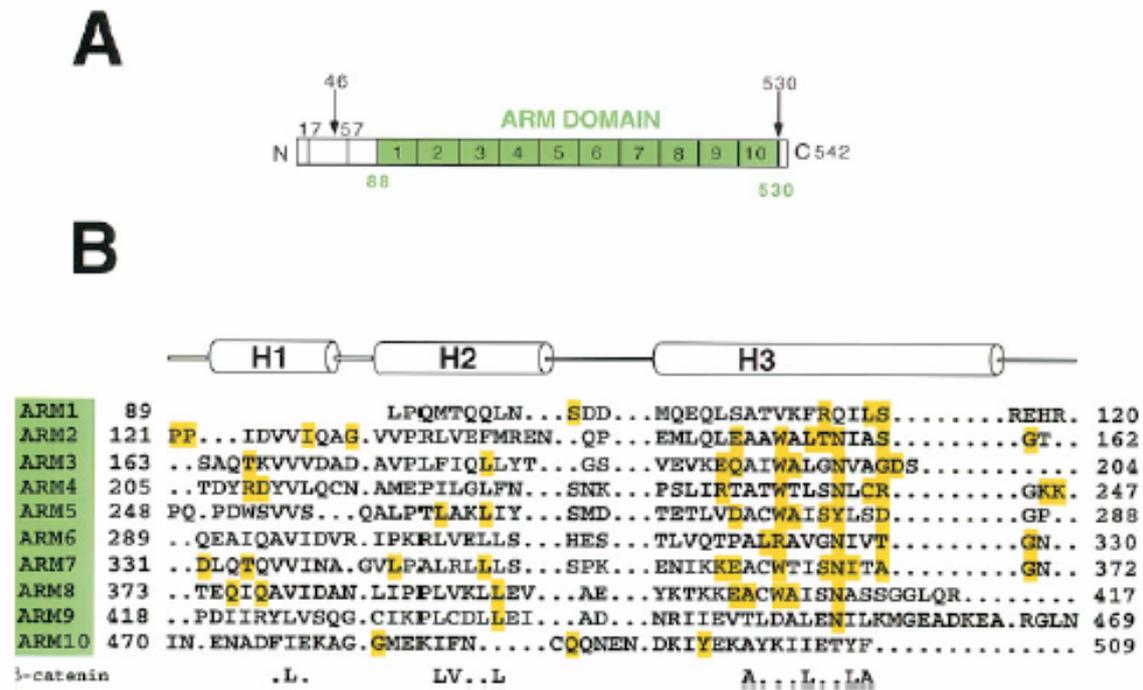


Figure 3.7. Structures primaire et secondaire de l'importine α de levure (Conti *et al.*, 1998). (A) Schéma du domaine structural avec les positions du domaine conservé N-terminal (résidus 17-57) et le grand domaine de répétitions du motif ARM (résidus 88-530). Les flèches indiquent les positions des sites de clivage par la subtilisine donnant des produits stables. La portion en vert représente la construction utilisée pour la détermination de structure. Les motifs répétés ARM sont numérotés de 1 à 10. (B) Alignement de séquence des dix motifs répétés ARM de l'importine α de levure, basé sur la structure. La ligne du dessus indique les éléments structuraux d'un motif répété, les hélices H1, H2 et H3. Les acides aminés strictement conservés dans les séquences des 13 importines α sont surlignés en orange.

Une fois le complexe ternaire cargo/importine α /importine β -RanGDP formé, il est transporté dans le noyau : la fixation de RanGTP sur l'importine β dissocie celle-ci du complexe cargo/importine α ; puis l'interaction de l'importine α avec son facteur d'export nucléaire CAS et la nucléoporeine Nup2p (Solsbacher *et al.*, 2000 ; Gilchrist *et al.*, 2002), en association avec l'effet autoinhibiteur du domaine IBB (Kobe, 1999), permet la libération du cargo dans le noyau.

L'importine β . L'importine β est une protéine de 97 KDa qui se lie à différents partenaires cellulaires : au domaine IBB de l'importine α (Figure 3.8) (Görlich *et al.*, 1996 ; Weis *et al.*, 1996), au NPC (Chi et Adam, 1997) et plus précisément aux motifs FG du NPC (Bayliss *et al.*, 2000), à RanGTP (Chi *et al.*, 1997), directement à la molécule à transloquer dans le noyau comme SREBP2, ou encore à d'autres facteurs de transport comme RanBP7 (importine 7) pour l'import de l'histone H1 (Görlich *et al.*, 1997 ; Jäkel *et al.*, 1999).

La structure de l'importine β en complexe avec le peptide IBB de l'importine α a été résolue par cristallographie aux rayons X (Cingolani *et al.*, 1999) (**Figure 3.8**). Elle montre que l'importine β est composée d'une succession de 19 motifs répétitifs (deux hélices) appelés motifs HEAT.

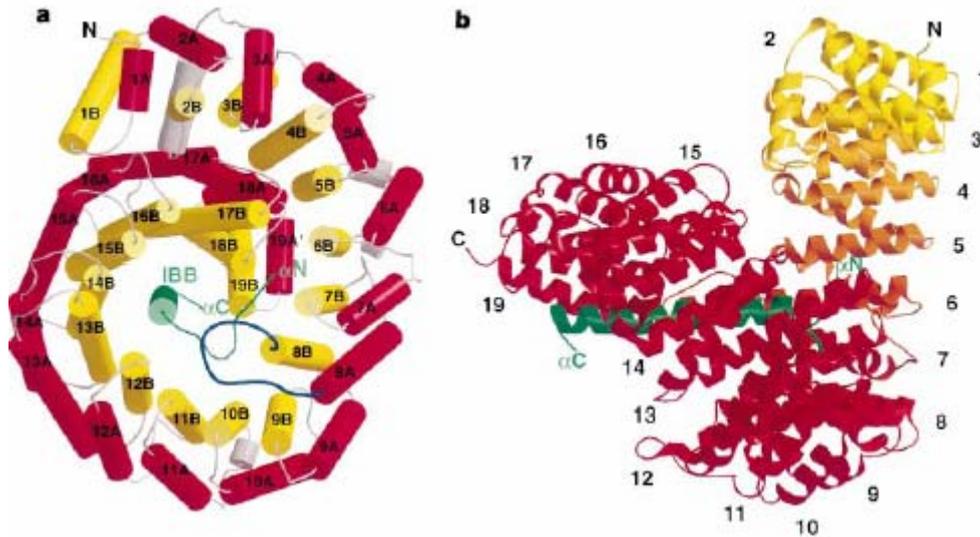


Figure 3.8. Structure cristallographique de l'importine β humaine, en complexe avec le domaine IBB de l'importine α humaine (Cingolani *et al.*, 1999). a) Vue suivant l'axe superhélicoïdal : les hélices A et B sont représentées en rouge et jaune respectivement, avec les résidus de connexion en gris. En vert, le domaine IBB de l'importine α . b) Vue latérale : rotation de 90° suivant un axe vertical par rapport à a).

L'importine β est une molécule flexible dont la conformation varie en fonction de la protéine associée (**Figure 3.9**). Ainsi, la liaison de l'importine β à RanGTP ou RanGDP est une étape cruciale dans l'import nucléaire du cargo. En effet, dans le complexe ternaire d'import, l'importine β est liée à RanGDP. Puis dans le noyau, RCC1 (ou RanGEF) - facteur d'échange de nucléotide lié à la chromatine (Dasso *et al.*, 1992 ; Nemerlut *et al.*, 2001) - maintient une concentration élevée de RanGTP par rapport à RanGDP. La liaison de RanGTP à l'importine β (Rexach et Blobel, 1995) conduit à un changement conformationnel de l'importine β (Vetter *et al.*, 1999 ; Weis, 2003) et à la dissociation de l'importine β du complexe importine α /cargo (Gilchrist *et al.*, 2002).

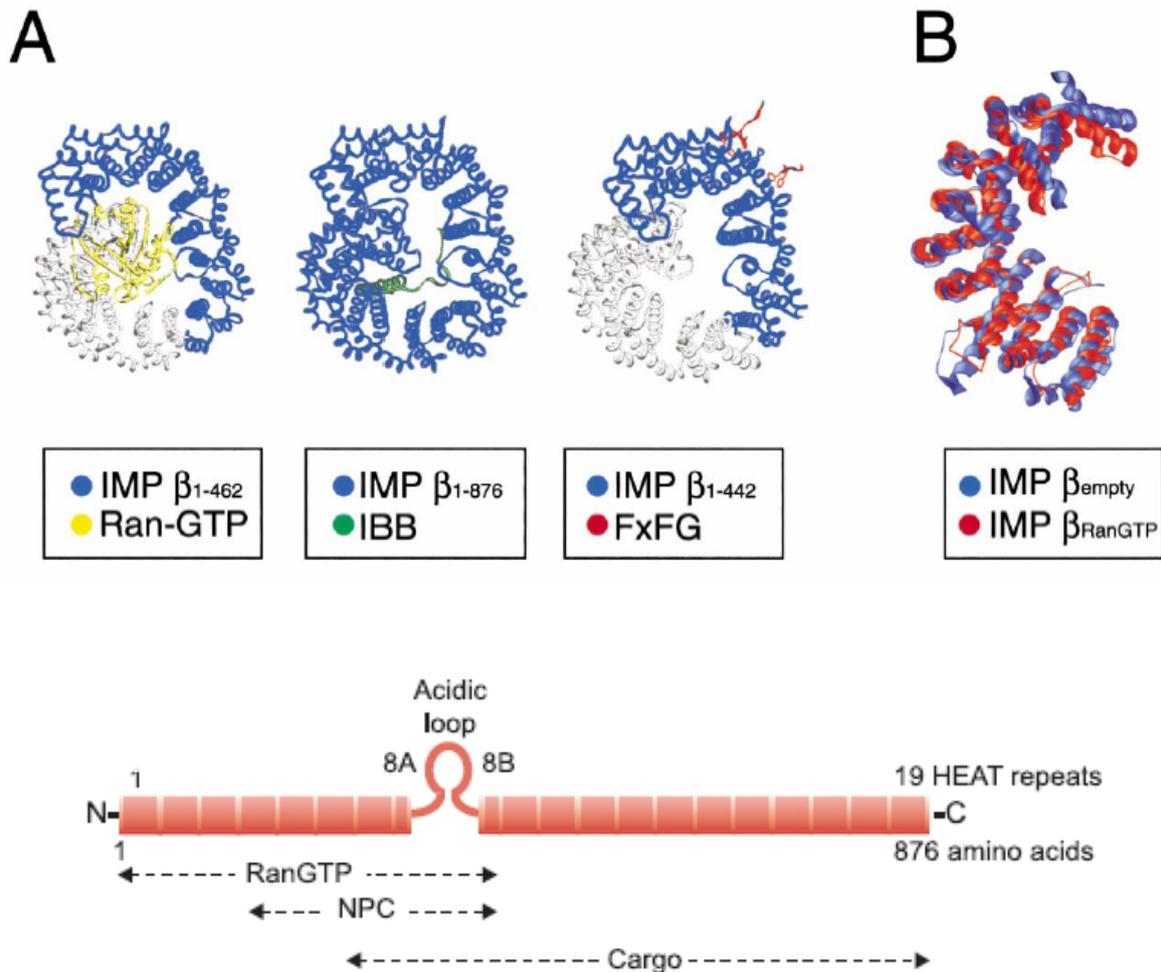


Figure 3.9. Les différentes conformations de l'importine β (Weis, 2003, revue). (A) Alignement structural de l'importine β (1-462) liée à Ran (Vetter *et al.*, 1999), de l'importine β entière liée au fragment IBB de l'importine α (Cingolani *et al.*, 1999), et l'importine β (1-442) liée à des peptides contenant des motifs FXFG (Bayliss *et al.*, 2000). Alors que Ran et IBB se lient sur la face concave de l'importine β , l'interaction avec les composants du NPC se fait sur la face convexe de la superhélice. La structure de l'importine β est indiquée en bleu et la trace hypothétique du domaine C-terminal manquant dans les structures de liaison à Ran et aux motifs FG est représenté en gris. (B) Superposition des structures N-terminales de l'importine β seule (bleu) ou liée à Ran (rouge) pour montrer les changements conformationnels dans les deux formes. L'importine β est flexible et la liaison à RanGTP induit une modification dans l'arrangement des motifs répétés HEAT. **En bas** : les domaines fonctionnels de l'importine β (d'après Ström et Weis, 2001).

C) L'export nucléaire

Introduction. Plusieurs exportines ont été découvertes, chacune impliquée dans le transport d'un cargo particulier (**Tableau 3.1**) (pour les revues, voir, entre autres, Ossareh-Nazari *et al.*, 2001 ; Cullen, 2003). Ainsi, la protéine CAS, appelée aussi Exportine 2, permet le recyclage de l'importine α entrée dans le noyau lors de l'import des cargos à NLS, en association avec l'importine β .

L'Exportin-t, elle, est responsable de la sortie du noyau des ARN de transfert.

Quant à l'export nucléaire des ARNm cellulaires, il dépend de TAP (Transporter Associated Protein) : les ARNm polyadénylés et épissés sont recouverts des facteurs du spliceosome (UAP 56, REF et le complexe de jonction EJC) qui permettent la fixation de TAP et ainsi la sortie des ARNm cellulaires.

Enfin, il existe une autre exportine qui semble jouer un rôle très important dans l'export des molécules hors du noyau, et plus précisément des protéines possédant un signal d'export nucléaire (NES) : CRM1 (Chromatin Maintenance protein 1), ou Exportine 1.

Tableau 3.1. Les différentes protéines d'export nucléaire identifiées et leurs cargos associés.

Exportine	Cargo exporté
CRM1/Exp1	protéines contenant des NES riches en leucines, snurportine 1
CAS	Importine- α
Exp-t/Xpo-t	tRNAs
Exp4	eIF5A
Exp5	Pré-mARNi, ARNt, minihélices d'ARN, eEF1A, JAZ
Exp6	Profiline-actine
Exp7	p50RhoGAP, 14-3-3 sigma
Imp13	eIF1A

CRM1. CRM1 appartient à la superfamille des importines β , c'est une exportine empruntée par de nombreuses molécules nucléaires (Fornerod *et al.*, 1997 ; Fukuda *et al.*, 1997 ; Stade *et al.*, 1997). Pour être prises en charge par CRM1, les protéines cargos doivent posséder un signal d'export nucléaire (NES). L'export nucléaire de certains ARN via CRM1 nécessite la présence d'un ou plusieurs adaptateurs. Ainsi, Rev permet l'export nucléaire des ARNm du VIH en utilisant la voie cellulaire CRM1 (Neville *et al.*, 1997). Le virus de la grippe emprunte également CRM1 lors de l'export de son génome en phase finale d'infection nucléaire. Les U snRNA (U-rich small nuclear RNA) ont comme adaptateur PHAX, certains

ARNms cellulaires passent aussi par CRM1 grâce aux adaptateurs APRIL et NXF3 (**Figure 3.10**).

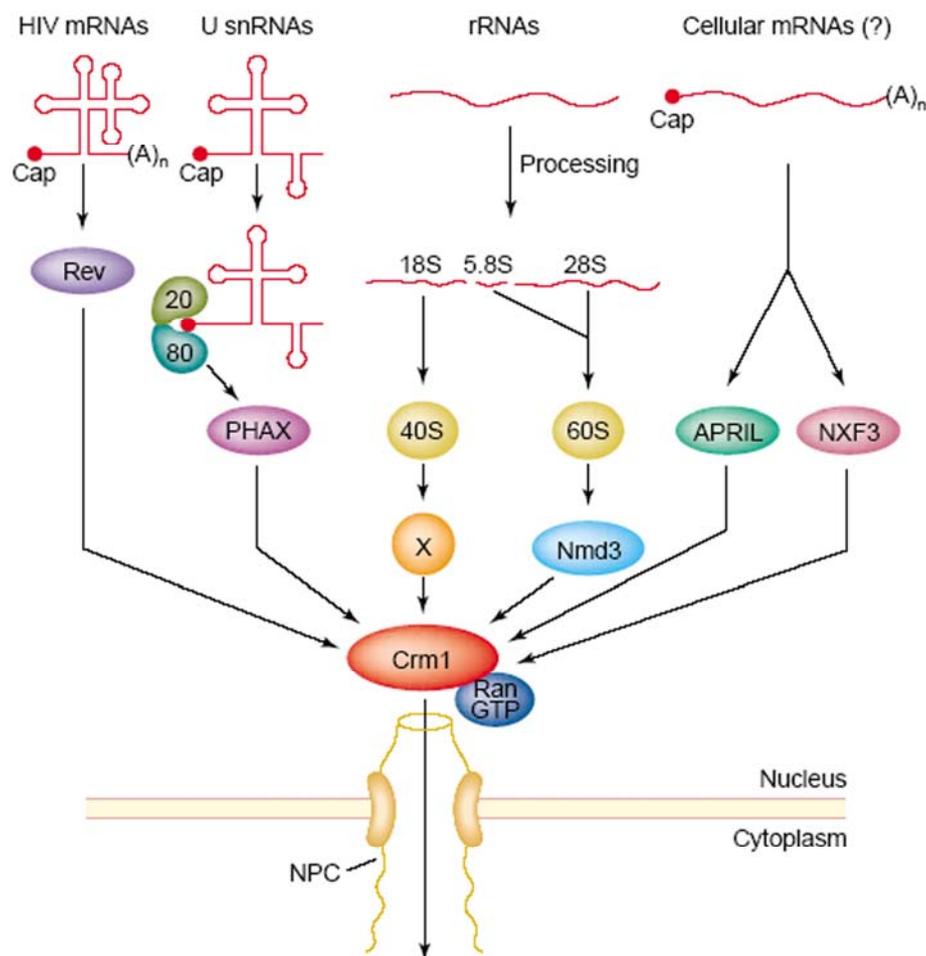


Figure 3.10. CRM1 est un facteur clef dans l'export nucléaire des ARN (Cullen, 2003, revue). CRM1 - membre de la famille karyophérine des facteurs de transport nucléocytoplasmique – interagit avec une grande variété de protéines nucléaires contenant un NES et transporte ces protéines dans le cytoplasme via le NPC. La liaison au cargo nécessite la forme GTP de Ran et le relargage du cargo dans le cytoplasme est induite par l'hydrolyse de RanGTP en RanGDP. Plusieurs protéines qui se lient à CRM1 agissent comme des adaptateurs pour différents types de cargo ARN, comme la protéine Rev pour les ARNm du VIH-1 possédant un RRE (Rev Response Element), l'adaptateur phosphorylé pour l'export des ARN (PHAX) pour les U snRNA (U-rich small nuclear RNA) ou encore la protéine adaptatrice Nmd3 pour l'export des ARN ribosomiaux (rRNA) des sous-unités 60S. L'adaptateur des sous-unités ribosomiales 40S reste inconnu (X), bien que l'export de ces dernières reste CRM1-dépendant. Il a été proposé que les protéines NXF3, APRIL et pp32 (toutes contiennent un NES) pourraient être des adaptateurs pour l'export CRM1-dépendant de certains ARNm cellulaires.

CRM1 est une protéine qui reconnaît et fixe, en présence de RanGTP (Ossareh-Nazari *et al.*, 1997 ; Askjaer *et al.*, 1999), des signaux spécifiques d'export nucléaire (NES) portés par les

molécules cargo (Ossareh-Nazari *et al.*, 1997 ; Fornerod *et al.*, 1997 ; Fukuda *et al.*, 1997 ; Stade *et al.*, 1997). Ces NES sont des séquences consensus riches en acides aminés hydrophobes, essentiellement des leucines. Tout comme l'hétérocomplexe des importines α/β sert d'adaptateur entre le cargo et le nucléopore durant l'import nucléaire, CRM1 fait l'intermédiaire entre le cargo et le pore nucléaire lors de l'export nucléaire (Figure 3.11). Le recyclage de CRM1, une fois le complexe d'export dissocié dans le cytoplasme, n'est pas encore très bien caractérisé. Il semble que le ré-import de CRM1 ne requiert ni de l'ATP, ni la présence de Ran, ni une hydrolyse de GTP Ran-dépendante (Zhang *et al.*, 2003). Par ailleurs, CRM1 serait transloqué dans le noyau via un mécanisme similaire à celui de l'importine β , c'est-à-dire grâce à des interactions avec les motifs FG des nucléoporines.

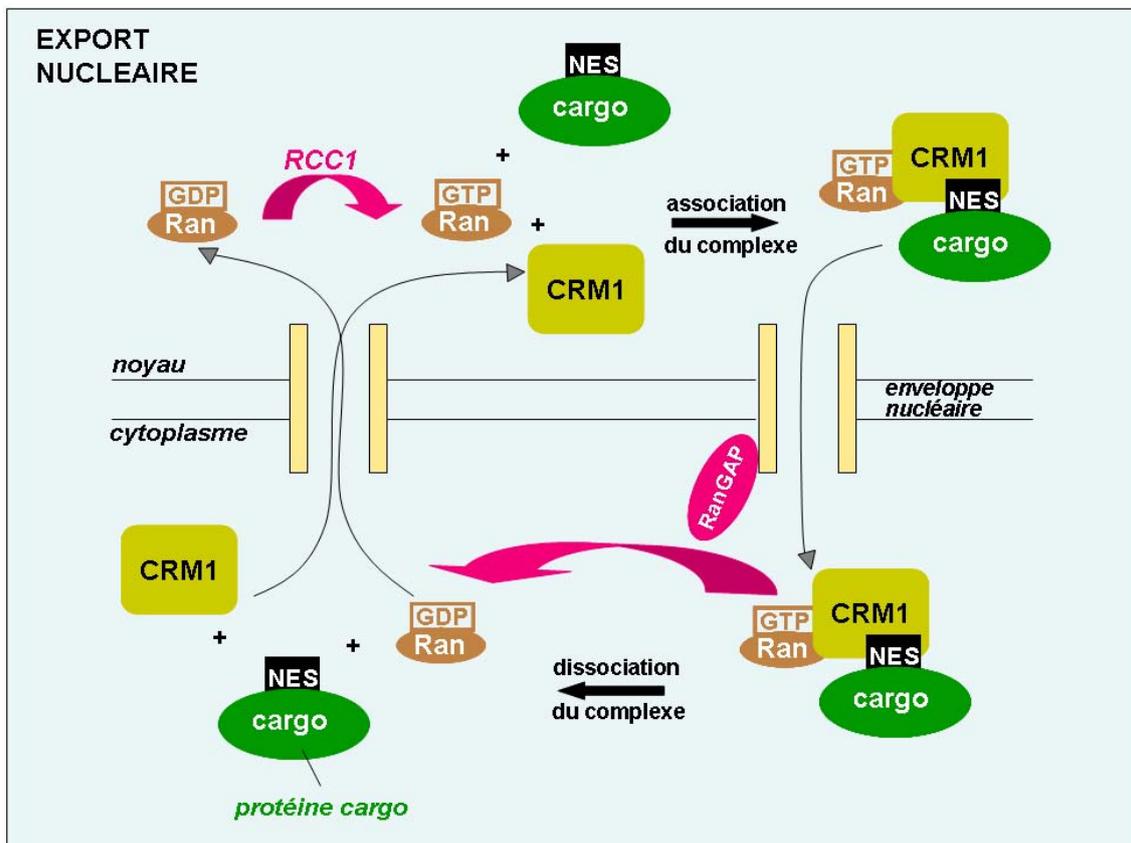


Figure 3.11. Export nucléaire. Dans le noyau, CRM1 associé à RanGTP reconnaît le NES du cargo; l'ensemble est transloqué dans le cytoplasme. L'hydrolyse de RanGTP en RanGDP par RanGAP (en association avec RanBP2, cf figure suivante) permet la dissociation du complexe d'export et le relargage du cargo dans le cytoplasme. CRM1 est ensuite recyclée par un mécanisme encore inconnu.

L'export nucléaire via CRM1 est inhibé par la leptomycine B (LMB), acide gras qui se lie de façon covalente à la cystéine 528 (Kudo *et al.*, 1999) et bloque ainsi stériquement le site de liaison au NES (Petosa *et al.*, 2004).

Gradient de RanGTP et directionnalité du transport nucléocytoplasmique. Un même pore nucléaire permet le passage des molécules dans les deux sens entre le noyau et le cytoplasme (Feldherr *et al.*, 1984 ; Nachury et Weis, 1999). Cette bidirectionnalité du NPC pose le problème de la conservation des différences de composition entre le noyau et le cytoplasme. Pour surmonter ce problème, la cellule eucaryote possède un système de régulation basée sur la distribution asymétrique, entre le noyau et le cytoplasme, de la protéine Ran (Ras-related Nuclear protein).

Ran bascule d'un état lié au GTP à celui lié au GDP, en fonction de la présence de l'enzyme RanGAP qui active sa propriété de GTPase, et donc l'hydrolyse du GTP, et de la présence de RCC1 (RanGEF) qui est un facteur d'échange de nucléotide (**Figure 3.12**).

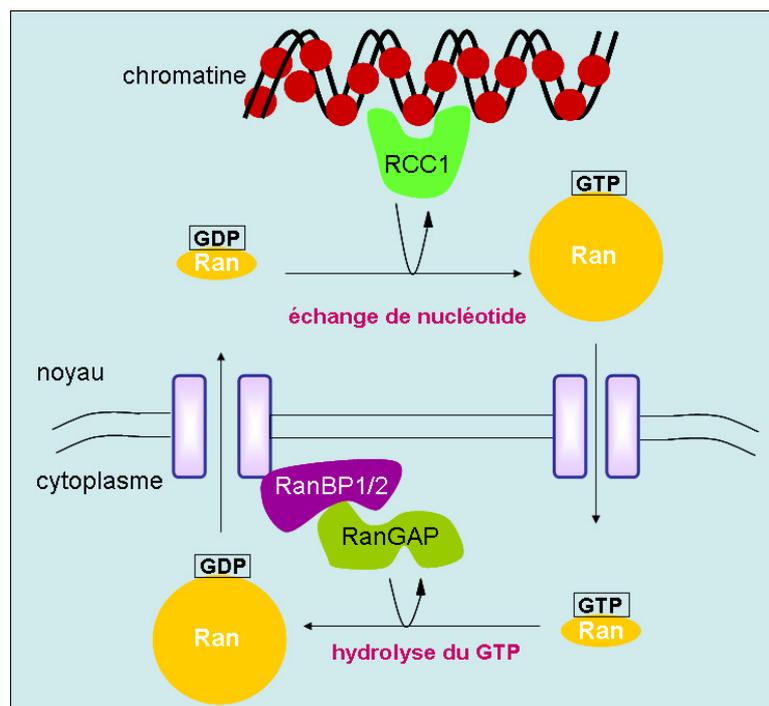


Figure 3.12. La liaison de Ran aux différents nucléotides détermine l'identité des compartiments cytoplasmique et nucléaire. La RanGTPase peut se lier soit au GTP, soit au GDP. L'activité d'hydrolyse du GTP par Ran est stimulée par l'action concertée de RanGAP (RanGTPase-activating protein) et RanBP1/2 (Ran Binding Protein) localisées sur la face cytoplasmique du NPC. Ce qui conduit à une Ran liée principalement à du GDP. La conversion de RanGDP en RanGTP nécessite RCC1/RanGEF (Ran Guanine nucleotide Exchange Factor). Comme RCC1 est liée à la chromatine, la Ran nucléaire est essentiellement sous la forme RanGTP.

La localisation strictement cytoplasmique de RanGAP et nucléaire de RCC1 est à l'origine de l'état RanGDP majoritaire dans le cytoplasme, et RanGTP majoritaire dans le noyau (Dahlberg et Lund, 1998 ; Mattaj et Englmeier, 1998 ; Kuersten *et al.*, 2001).

Ainsi, l'import nucléaire du le complexe ternaire cargo/importine α /importine β implique la liaison de l'importine β à RanGDP, et la dissociation de ce complexe ternaire dans le noyau est liée au remplacement de RanGDP par RanGTP. En revanche, l'export nucléaire du complexe cargo/CRM1 est lié à l'association de CRM1 à RanGTP, la dissociation du complexe d'export dans le cytoplasme se produisant lorsque RanGTP est hydrolysé par RanGAP présente sur la face cytoplasmique des NPC.

4 - OBJECTIFS DE TRAVAIL

Durant mes trois années de thèse, je me suis concentrée sur l'étude des mécanismes de transport nucléaire du génome du virus de la grippe, et son devenir dans le noyau. Nous avons étudié les caractéristiques fonctionnelles et structurales des différentes protéines virales et cellulaires susceptibles d'être impliquées dans le transport nucléaire du génome viral et l'association de celui-ci à la chromatine. Travaillant dans un laboratoire de biochimie tourné vers des techniques structurales, nous avons simplifié notre approche de ces étapes d'entrée dans le noyau, d'association à la chromatine et de sortie du noyau. Une fois les différents partenaires et leur mode d'interaction identifiés, nous avons tenté de faire des complexes stables en vue d'une co-cristallisation.

Complexe NP/importine α . Je commencerai par présenter d'abord les résultats portant sur l'import nucléaire de la protéine NP. La NP de la grippe est une protéine très conservée entre les différentes souches de virus de la grippe (Shu *et al.*, 1993). C'est une protéine précoce, pivot de la transcription et réplication du virus (Honda *et al.*, 1988 ; Huang *et al.*, 1990) et dans l'architecture de la vRNP (Baudin *et al.*, 1994). Elle pourrait par ailleurs contenir le signal d'import de la vRNP (O'Neill *et al.*, 1995 ; Cros *et al.*, 2005), bien que cela ne soit pas encore déterminé de façon claire, les sous-unités de la polymérase possédant aussi des signaux d'import (Nath et Nayak, 1990 ; Mukaigawa et Nayak, 1992 ; Nieto *et al.*, 1994). L'importance de NP dans le cycle d'infection du virus de la grippe et sa conservation entre les différentes souches virales en font un candidat idéal pour la mise au point de drogues antivirales. La seule structure cristallographique connue de nucléoprotéine de virus à ARN négatif est celle du Bornavirus (virus à ARN (-) simple brin, non segmenté) (Rudolph *et al.*, 2003). La NP du virus de la grippe est une protéine qui s'oligomérisse pour former des dimères, trimères jusqu'à donner des structures ressemblant aux vRNPs natives (Ruigrok et Baudin, 1995). L'hétérogénéité de NP en solution rend donc difficiles les essais de cristallogénèse. Afin de palier à ce problème, nous avons mis NP en complexe avec l'importine α 5 humaine : on obtient un complexe de stoechiométrie 1 :1 plus facile à étudier et potentiellement cristallisable. Ensuite, nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission (MET) pour obtenir une structure à basse résolution du complexe NP/importine α .

Interaction de M1 et des vRNPs avec la chromatine. La partie suivante des résultats concerne l'étape de localisation nucléaire des vRNPs. Lorsque les vRNPs sont libérées dans le cytoplasme en phase précoce d'infection virale, elles gagnent rapidement le noyau pour leur transcription et réplication, grâce à un ou plusieurs signaux d'import porté(s) éventuellement par NP. Une fois dans le noyau, les vRNPs s'associent très étroitement avec la chromatine (Bukrinskaya *et al.*, 1979 ; Lopez-Turiso *et al.*, 1990 ; Bui *et al.*, 2000). Après amplification, les vRNPs doivent quitter le noyau et M1 semble jouer un rôle majeur lors de cette étape: elle pourrait favoriser la dissociation des vRNPs en interagissant avec les histones (Zhirnov *et al.*, 1997). C'est ce que nous avons essayé de déterminer en étudiant les interactions de M1, des NP et des vRNPs avec les nucléosomes (Garcia-Robles *et al.*, 2005).

Export nucléaire des vRNPs. Enfin, je finirai par l'étude du mécanisme d'export nucléaire des vRNPs. Une fois le génome viral transcrit et amplifié, il doit ressortir du noyau pour être encapsidé au niveau de la membrane plasmique. Pour sa sortie, le génome viral utilise le système d'export nucléaire de la cellule, CRM1-RanGTP (Elton *et al.*, 2001 ; Ma *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2001). Les protéines virales M1 et NEP jouent un rôle prépondérant dans cet export, en particulier NEP qui interagit directement avec CRM1 (Akarsu *et al.*, 2003 ; Neumann *et al.*, 2000 ; O'Neill *et al.*, 1998). Je présenterai plus en détail les caractéristiques fonctionnelles et structurales de NEP.

II – RESULTATS/DISCUSSIONS

1 - COMPLEXE NP/IMPORTINE α

A) Introduction

Généralités. Beaucoup de virus dépendent de facteurs de la cellule hôte pour la transcription/réplication de leur génome et, pour les virus qui ont une étape nucléaire lors de leur transcription/réplication, le génome viral doit entrer dans le noyau, ce qui ajoute une complexité supplémentaire dans la régulation de leur cycle (Whittaker et Helenius, 1998). Dans le cas de cellules en division, le génome viral, comme celui du rétrovirus de la leucémie murine (MLV), peut être inclus dans le noyau lors de la reconstitution de celui-ci en phase tardive de télophase de mitose (Roe *et al.*, 1993). Pour infecter des cellules qui ne se divisent pas - comme par exemple les cellules épithéliales du tractus respiratoire dans le cas du virus de la grippe – d'autres virus doivent développer des stratégies qui leur permettent d'adresser leur génome dans le noyau à travers le pore nucléaire. En général, les stratégies impliquent plusieurs étapes après l'entrée du virus dans la cellule (**Figure 1.1**) : la structure subvirale contenant le génome (capside ou complexe génome-protéines) doit se diriger vers le noyau, s'attacher au NPC et être transportée à travers le canal central du NPC. Les molécules plus grosses que 40-50 kDa (Luby-Phelps, 1994), ne peuvent pas diffuser librement à travers le NPC, c'est pourquoi elles dépendent de mécanismes de transport actif pour atteindre le noyau.

Les vRNPs de la grippe contiennent l'information nécessaire à leur import nucléaire. Dans le cas du virus de la grippe, on ne sait toujours pas comment se fait exactement l'import nucléaire des vRNPs en début d'infection virale. Pour être importées dans le noyau, les vRNPs doivent être dissociées de M1 (Martin et Helenius, 1991 ; Whittaker *et al.*, 1996 ; Bui *et al.*, 1996), et ce transport est un mécanisme actif (Martin et Helenius, 1991).

Les vRNPs contiennent l'information nécessaire pour leur import nucléaire car des vRNPs purifiées injectées seules dans le cytoplasme de cellules de mammifère sont rapidement accumulées dans le noyau (Kemler *et al.*, 1994 ; Martin et Helenius, 1991). Mais on ne sait pas quel élément de la vRNP est impliqué directement dans l'import nucléaire de celle-ci.

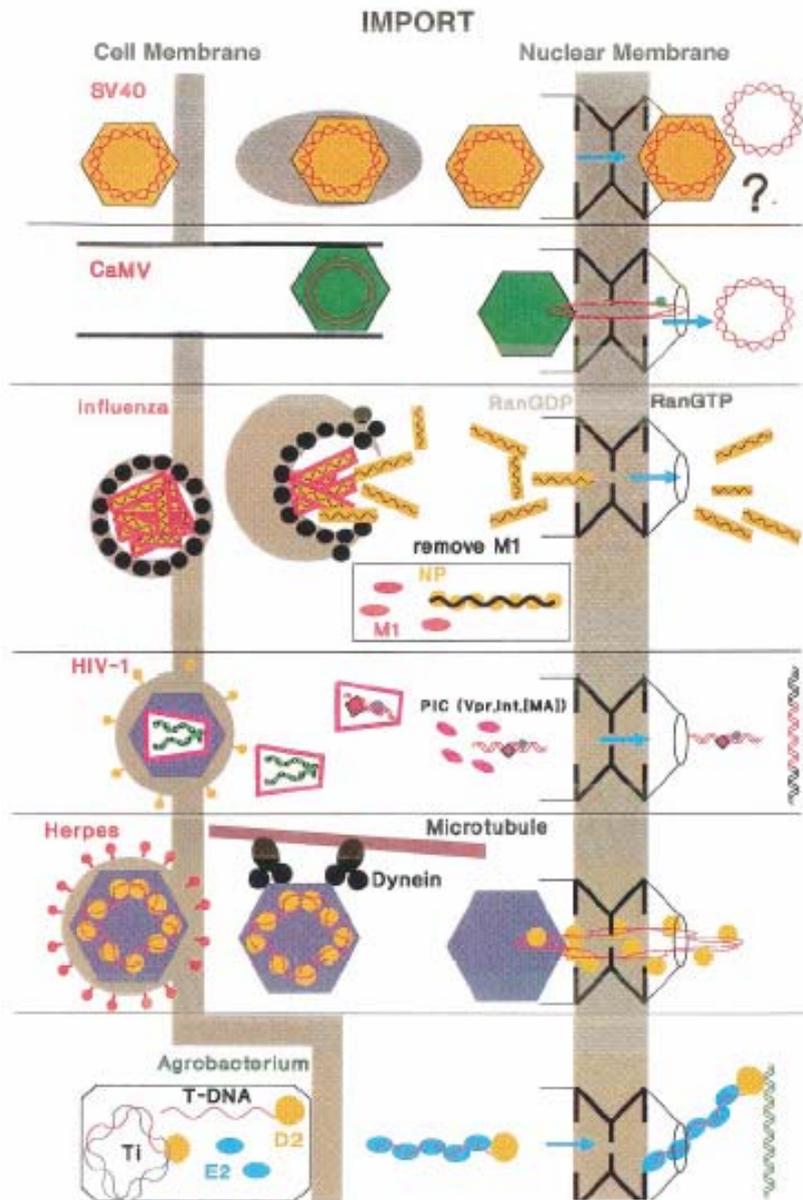


Figure 1.1. Import nucléaire de génomes viraux et bactériens (Izaurre et al., 1999). Beaucoup de virus comme le virus de la grippe, les Hepadnavirus, les Lentivirus et les Herpesvirus, entrent dans la cellule par endocytose. Les Lentivirus comme le VIH-1, libèrent leurs nucléocapsides dans le cytoplasme où se produit la transcription inverse. Les nucléocapsides sont ensuite dissociées et il se forme les complexes de pré-intégration (PICs) composés d'ADN et des protéines Vpr (Viral protein), IN (Intégrase) et MA (Matrix). Les protéines coopèrent dans l'adressage nucléaire et IN intègre le génome viral dans l'ADN cellulaire. Les capsides des Herpesvirus sont transportées grâce à la dyneïne le long des microtubules vers le noyau où le génome est relargué, complexé aux protéines virales de type histones. L'*Agrobacterium* s'arrime à des entailles des cellules végétales. Sous l'effet de signaux provenant de la plante, un set de protéines virales est produit. Celles-ci sont impliquées dans l'excision de l'ADN-T simple brin du plasmide Ti (Tumor inducing) et dans le transport de ce dernier dans la cellule. Un complexe d'ADN-T et des protéines de virulence VirE2 et VirD2 liées de façon covalente est envoyé dans le noyau et intégré dans l'ADN cellulaire.

Une vRNP est composée d'une molécule d'ARN simple-brin complexée à des NP et à la polymérase hétérotrimérique. Il existe donc plusieurs candidats potentiels portant les signaux d'import de la vRNP. Ainsi, les sous-unités PA (Nieto *et al.*, 1994), PB1 (Akkina *et al.*, 1987 ; Nath et Nayak, 1990) et PB2 (Jones *et al.*, 1986 ; Mukaigawa et Nayak, 1992) de la polymérase possèdent un NLS nécessaire à leur import nucléaire pour entrer dans la composition des vRNPs en cours de synthèse dans le noyau. Il est possible qu'au moins l'un de ces signaux soit celui qui permette la translocation des vRNPs, aucune étude n'a encore été menée dans ce domaine.

La NP, composant majoritaire de la vRNP, pourrait aussi être le porteur du signal d'entrée des vRNPs dans le noyau. La NP seule est suffisante à l'entrée des ARN viraux dans le noyau de cellules perméabilisées à la digitonine (O'Neill *et al.*, 1995) et le NLS non conventionnel est indispensable à l'import nucléaire (dans des cellules perméabilisées à la digitonine) des complexes NP-ARN reconstitués *in vitro* (Cros *et al.*, 2005).

Le rôle potentiel de NP dans l'import nucléaire des vRNPs (O'Neill *et al.*, 1995 ; Cros *et al.*, 2005) et la condition *sine qua non* de sa présence pour les activités de transcription/réplication (Huang *et al.*, 1990 ; Kimura *et al.*, 1992 ; de la Luna *et al.*, 1993 ; Mena *et al.*, 1994) montrent l'importance des études sur NP. Et plus particulièrement celles portant sur sa structure cristallographique, encore indéterminée à ce jour, dans l'optique de la mise au point de drogues antivirales.

NP possède plusieurs NLS. La NP interagit *in vivo* avec l'importine α 5 (O'Neill et Palese, 1995 ; Wang *et al.*, 1997) et l'importine α 1 (Wang *et al.*, 1997) et *in vitro* avec les importines α 1, α 5 (O'Neill *et al.*, 1995 ; Melen *et al.*, 2003) et α 3 (Melen *et al.*, 2003). La liaison de NP à une importine α est possible grâce aux motifs spécifiques de reconnaissance portés par NP, les NLS (**Figure 1.2**).

Les nombreuses études menées sur les signaux de transport de NP ont mis en évidence la présence de plusieurs de ces séquences sur NP: un NLS dit « non conventionnel » dans la séquence N-terminale [1-13] (Wang *et al.*, 1997 ; Neumann *et al.*, 1997) qui reconnaît les importines α 1 et 5 (Wang *et al.*, 1997), et un NLS classique bipartite [198-216] ($_{198}\text{KR13xKTR}_{216}$) (Weber *et al.*, 1998). D'après ces derniers, la délétion du NLS non conventionnel ou du NLS bipartite n'inhibe pas l'import nucléaire de NP *in vivo*, suggérant que chacun des deux NLS compense la délétion de l'autre. Le NLS bipartite de NP ressemble beaucoup à celui de la nucléoplasmine.

Les travaux de Wang et ses collègues (1997) définissent dans le NLS non conventionnel de NP une séquence $_3\text{SxGTKRSYxxM}_{13}$ qui se lie à l'importine $\alpha 5$, et une séquence $_6\text{TKRSxxxM}_{13}$ qui se lie à l'importine $\alpha 1$.

Par ailleurs, les premières études utilisant le système du Xénope avaient mis en évidence la présence d'une séquence dite d'accumulation/rétention nucléaire (NAS/NRS) entre les acides aminés 327 à 345 (Davey *et al.*, 1985). Cette NAS/NRS serait plus précisément située aux acides aminés 336 à 345 (Weber *et al.*, 1998). Sans être un NLS, elle serait impliquée dans l'interaction de NP avec certains composants (viraux ou cellulaires) conduisant à l'accumulation de NP dans le noyau. La NAS participerait ainsi à la localisation intracellulaire de NP.

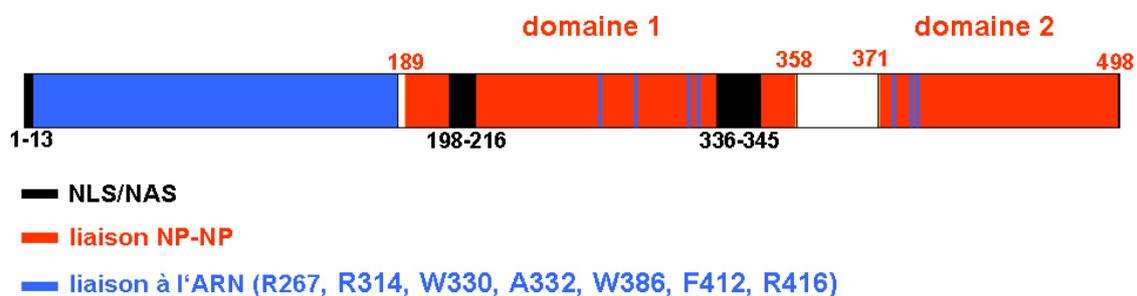


Figure 1.2. Les domaines fonctionnels de la NP du virus de la grippe (A/PR/8/34) (adapté de Portela et Digard, 2002). En bleu, région et acides aminés impliqués dans la liaison à l'ARN (Albo *et al.*, 1995 ; Kobayashi *et al.*, 1994 ; Elton *et al.*, 1999a ; Medcalf *et al.*, 1999) ; en rouge, domaines impliqués dans les interactions NP-NP (Elton *et al.*, 1999b). En noir, motif [1-13]: NLS non conventionnel (Wang *et al.*, 1997 ; Neumann *et al.*, 1997) ; motif [198-216]: NLS bipartite (Weber *et al.*, 1998) ; motif [336-345]: NAS/NRS (Weber *et al.*, 1998).

En ce qui concerne la NP du virus de la grippe de type B, elle n'a pas d'homologie avec la région correspondant aux deux premiers NLS de la NP de la grippe de type A (Cros et Palese, 2003) (Figure 1.3). La délétion des résidus 1 à 69 de la NP du virus de la grippe de type B n'a pas de conséquences sur la localisation de NP (Stevens et Barclay, 1998). Cela suggère donc que le (ou les NLS) de NP de la grippe de type B est situé ailleurs dans la protéine.

La présence de plusieurs signaux de localisation nucléaire sur NP du virus de la grippe de type A pourrait être due à une utilisation de l'un et/ou l'autre de ces signaux, suivant qu'il s'agit de l'import nucléaire d'une vRNP en phase très précoce d'infection virale, ou alors de l'import nucléaire de la NP libre surexprimée dans le cytoplasme. Ainsi, dans une vRNP, la

NP est associée à sa voisine par des zones de contacts comme le montre la reconstruction tridimensionnelle en cryo-microscopie électronique d'une vRNP recombinante (Martin-Benito *et al.*, 2001 ; Area *et al.*, 2004): l'enchaînement des NP les unes à côté des autres pourrait masquer certains domaines de la NP.

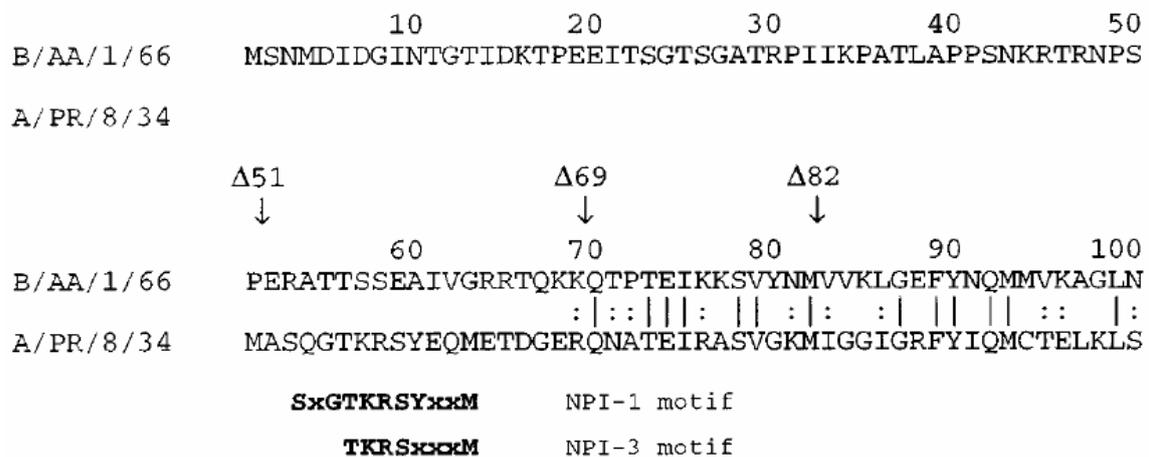


Figure 1.3. Alignement des extrémités N-terminales des NP de virus de la grippe A/PR/8/34 et B/AA/1/66 (Stevens et Barclay, 1998).

Il faut savoir aussi que la présence de plusieurs NLS est une caractéristique assez répandue dans les protéines virales ou cellulaires allant dans le noyau. Dans certains cas, les NLS multiples peuvent coopérer pour renforcer l'import nucléaire (par exemple, les récepteurs de l'oestrogène et la progestérone, Ylikomi *et al.*, 1992), ou alors ils peuvent agir indépendamment comme ceux de NS1 (Greenspan *et al.*, 1988) ou de NP de la grippe.

Une autre remarque importante est à faire en ce qui concerne la position des NLS dans la NP : les deux NLS encadrent le domaine de liaison à l'ARN de NP (Figure 1.2). Une telle orientation spatiale de ces domaines serait courante et reflèterait une relation fonctionnelle, une évolution convergente ou un besoin de relier les deux fonctions (LaCasse et Lefebvre, 1995).

Il est à noter qu'il existerait un autre point important de régulation du transport de NP - et donc potentiellement des vRNPs - lié à la phosphorylation de NP (Neumann *et al.*, 1997 ; Bui *et al.*, 2002). En effet, l'inhibition de la phosphorylation (par des inhibiteurs de la protéine kinase C) conduit à l'accumulation nucléaire de NP, ce qui suggère une importance de la phosphorylation et/ou de certaines protéines cellulaires dans le transport de NP. Cette phosphorylation de NP concernerait la sérine en position 3 située dans le NLS non conventionnel du domaine N-terminal de NP (Arrese et Portela, 1996).

Bullido et ses collègues (2000) montrent que la phosphorylation de la sérine 3 du NLS non conventionnel [1-13] n'a pas d'effet sur la localisation intracellulaire de la NP entière (le NLS bipartite prenant peut-être le relais). En revanche, ils pensent que cette même phosphorylation diminuerait l'affinité du NLS non conventionnel [1-13] pour les importines α .

La phosphorylation pourrait aussi être un facteur de régulation du transport de NP en intervenant dans le cadre de la densité cellulaire où des kinases activées par des contacts cellule-cellule phosphoryleraient NP (Bui *et al.*, 2002).

D'autres études indiquent le rôle crucial de la phosphorylation dans l'import nucléaire des vRNPs en phase précoce d'infection virale (Root *et al.*, 2000) : l'inhibition de la phosphorylation par un inhibiteur de la protéine kinase C (bisindolylmaleimide) empêche l'entrée des vRNPs dans le noyau. Cette inhibition pourrait intervenir au niveau du relargage des vRNPs après fusion des membranes endosomale et virale. On ne sait cependant pas sur quel(s) élément(s) (quelle(s) protéine(s), quel(s) acide(s) aminé(s) ?) se fait cette phosphorylation.

La phosphorylation est donc une modification essentielle au transport de NP et des vRNPs, mais le mécanisme mis en jeu est loin d'être clair pour l'instant.

Tous ces travaux sur les signaux de transport de NP montrent que la régulation du trafic intracellulaire de NP est très complexe et semble dépendre essentiellement du contexte de l'infection virale, de son état d'oligomérisation, ou peut-être même de sa structure. Lors des différents travaux cités précédemment, les auteurs ne font pas mention des conséquences des mutations sur la structure de NP.

Nous voulons obtenir la structure de NP en complexe avec une importine α humaine, la structure d'aucune des deux n'ayant été encore à ce jour résolue. La détermination de la structure de NP, potentiellement réalisable grâce à la formation du complexe avec l'importine α humaine, pourra nous donner des informations capitales quant au fonctionnement du virus. En effet, NP est une protéine pivot dans le cycle d'infection du virus de la grippe : elle pourrait être l'élément impliqué dans l'import nucléaire des vRNPs, elle est indispensable à la transcription et la réplication des vRNPs, elle recouvre entièrement l'ARN viral. De ce fait, elle est potentiellement une cible idéale pour la mise au point de drogues thérapeutiques dans la lutte contre le virus de la grippe.

B) Purification du complexe NP/importine α 5 humaine et essais de cristallogénèse

Nous avons choisi dans notre laboratoire de travailler sur la NP en complexe avec l'importine α 5 humaine. Différents travaux ont montré l'interaction de NP avec cette importine (O'Neill et Palese, 1995 ; O'Neill *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 1997 ; Melen *et al.*, 2003).

Seule en solution, NP a tendance à former des oligomères qui vont des dimères et trimères à de larges structures qui ne peuvent pas être distinguées des vRNPs natives (Ruigrok et Baudin, 1995). Ces interactions NP-NP auraient un K_d d'environ 200 nM (Elton *et al.*, 1999b). Deux domaines de NP sont impliqués dans l'oligomérisation : le domaine [189-358] et le domaine [371-465] (Elton *et al.*, 1999b).

Toutes ces espèces sont difficilement séparables, donc la NP seule en solution ne peut pas être cristallisée telle quelle. En revanche, nous avons pu la monomériser une fois complexée à l'importine α 5 humaine : on obtient un complexe de stoechiométrie 1 :1, utilisable pour des essais de cristallogénèse (**Figure 1.4**).

La purification du complexe sur Superdex 200 (Pharmacia/Amersham) permet d'éliminer toutes les différentes formes d'oligomères de NP élués dans le volume mort de la colonne, soit environ 7 ml (**Figure 1.4a, 1^{er} pic**). D'après la courbe d'étalonnage de la colonne Superdex 200 (non présentée), le volume d'élution du complexe NP/ importine α sur Superdex 200 (14.6 ml) correspond bien à la taille attendue du complexe : 59 kDa pour NP recombinante et 52 kDa pour l'importine α recombinante, soit environ 110 kDa au total. Le gel dénaturant SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine confirme également que l'on a un complexe 1 :1 (**Figure 1.4a et c**). On obtient ainsi un complexe NP/importine α de stoechiométrie 1 :1 et de poids moléculaire de 110 kDa environ.

Le complexe natif NP/ α purifié sur Superdex 200 ne donnant pas de cristaux, nous avons décidé d'effectuer des protéolyses limitées afin d'éliminer les parties flexibles qui pourraient gêner le processus de cristallisation du complexe natif.

Pour cela, le complexe natif NP/importine α purifié sur Superdex 200 est protéolysé à l'élastase. Le complexe NP/importine α protéolysé est purifié de nouveau sur Superdex 200 pour éliminer les fragments de protéolyse et l'élastase (protéine de 26 kDa environ). Le volume d'élution du complexe protéolysé ne varie pas de façon significative par rapport à celui du complexe natif (14.6 et 14.5 ml respectivement), ce qui indique que le complexe a

relativement peu changé de poids moléculaire après la protéolyse (**Figure 1.4b**). Dans notre cas, la Superdex 200 ne permet pas de séparer le complexe entier du complexe protéolysé.

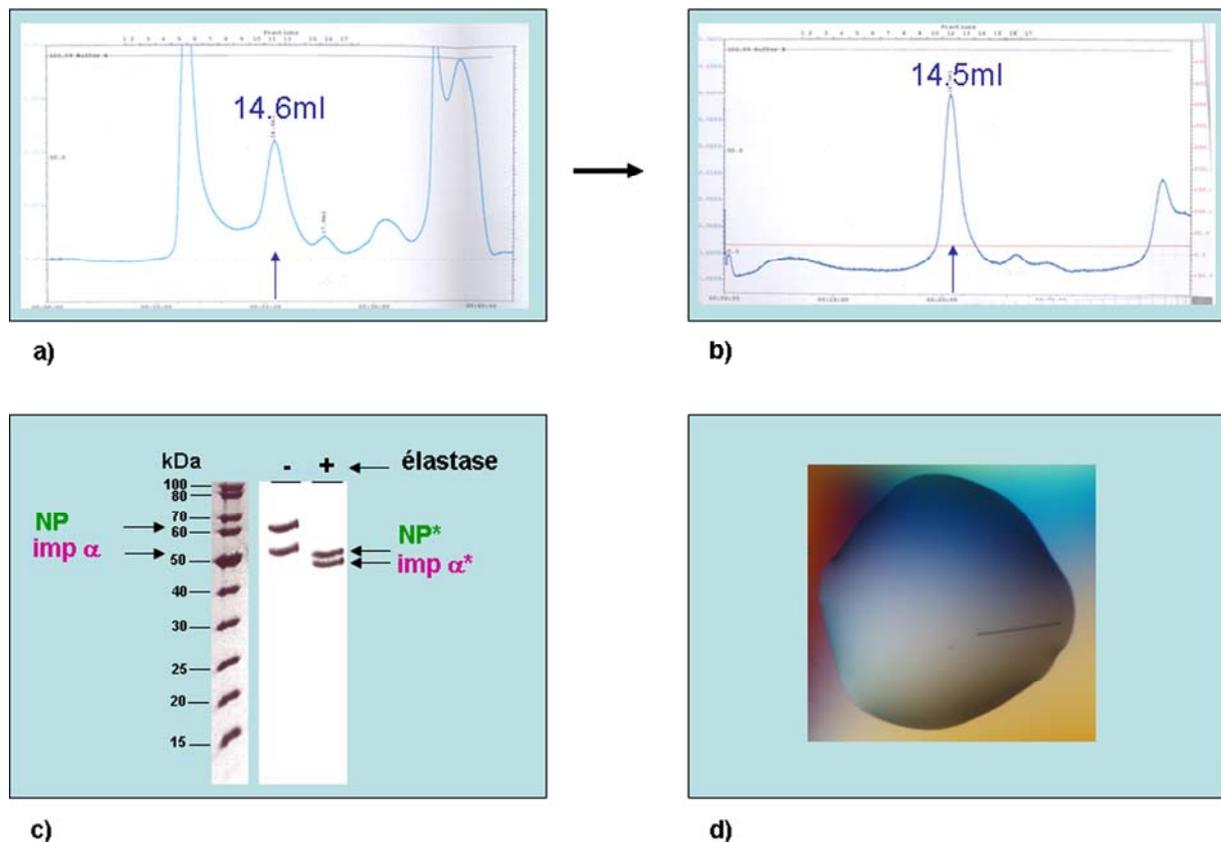


Figure 1.4. Purification et cristallogénèse du complexe NP/importine α 5 humaine. **a)** Profil d'élué du complexe natif NP/ α 5 sur Superdex 200, dans le tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM. Le premier pic élué correspond à des polymères de NP ; le complexe NP/importine α est élué vers 14.6 ml. **b)** Profil d'élué du complexe sur Superdex 200, après digestion à l'élastase. Le complexe NP/importine α protéolysé est aussi élué vers 14.5 ml, comme le complexe natif. **c)** Analyse des fractions éluées sur Superdex 200 par SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine. La NP entière est une protéine de 59 kDa et l'importine α 5 entière, de 52 kDa. Après protéolyse à l'élastase, NP* fait 51 kDa environ, et l'importine α^* , environ 48 kDa. **d)** Cristal du complexe protéolysé. Dans ce cas, il s'agit d'une aiguille obtenue à 20°C dans les conditions Na/K 1 M pH 6.9, avec le robot de cristallisation de l'EMBL/Grenoble.

Le gel dénaturant SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine donne plus d'informations quant au devenir des composants du complexe (**Figure 1.4c**). L'identification des bandes protéolysées à l'élastase a été effectuée par séquençage N-terminal. La bande à 51 kDa environ correspond à la NP protéolysée (59 kDa avant protéolyse), alors que la bande à 48 kDa environ correspond à l'importine α 5 protéolysée (52 kDa avant protéolyse). La NP et l'importine α 5 en complexe ont perdu plusieurs kDa, le poids moléculaire du complexe passe de 111 kDa à environ 101 kDa. La différence de poids moléculaire entre le complexe natif et celui

protéolysé n'est cependant pas suffisant pour modifier leur volume d'éluion sur Superdex 200.

Le complexe NP/importine α protéolysé à l'élastase et purifié sur Superdex 200 est ensuite utilisé pour faire des essais de cristallogénèse grâce au robot de l'EMBL. Ce dernier permet de tester de nombreuses conditions de cristallisation à la fois, avec très peu d'échantillon protéique (200 nl par goutte assise). En effet, on dispose de 576 conditions différentes de base, et on peut utiliser trois échantillons différents par condition de cristallisation, ce qui fait 1728 gouttes différentes au total.

On a obtenu des cristaux dans les conditions centrées autour du screen Na/K. Malheureusement, aucun de nos cristaux n'a diffracté à ce jour. Cela peut être dû tout d'abord à la taille trop petite des cristaux. Les cristaux sont reproductibles en mode manuel, mais leur taille ne varie guère par rapport à celle obtenue avec le robot.

On peut penser aussi que l'on a en réalité un pseudo-cristal : les molécules sont empilées de façon suffisamment ordonnée pour former un objet cristallin, mais à l'échelle microscopique, l'organisation des molécules est trop désordonnée pour permettre une diffraction constructive. Le projet de cristallisation du complexe NP/importine α 5 humaine est néanmoins poursuivi par un autre membre de l'équipe.

En parallèle de ces essais de cristallogénèse, nous avons décidé de déterminer la structure à basse résolution du complexe NP/importine α 5 natif, par microscopie électronique à transmission, en coloration négative au silicotungstate de sodium (SST). Il faut noter qu'une reconstruction en microscopie électronique à transmission (MET) sur un complexe de 110 kDa n'est pas chose courante car on atteint les limites de résolution du microscope.

C) Détermination d'une structure à basse résolution du complexe NP/importine α 5 humaine par microscopie électronique à transmission (MET)

Sélection et isolement des particules. Ce travail constitue la première étape du traitement informatique. Nous avons utilisé le programme *x3d* (Conway *et al.*, 1999) pour extraire les particules de la micrographie d'origine (**Figure 1.5**) à l'aide d'une sélection circulaire d'un rayon de 31 pixels, entourée d'un masque doux décroissant de 3 pixels. Nous avons sélectionné environ 6500 particules.

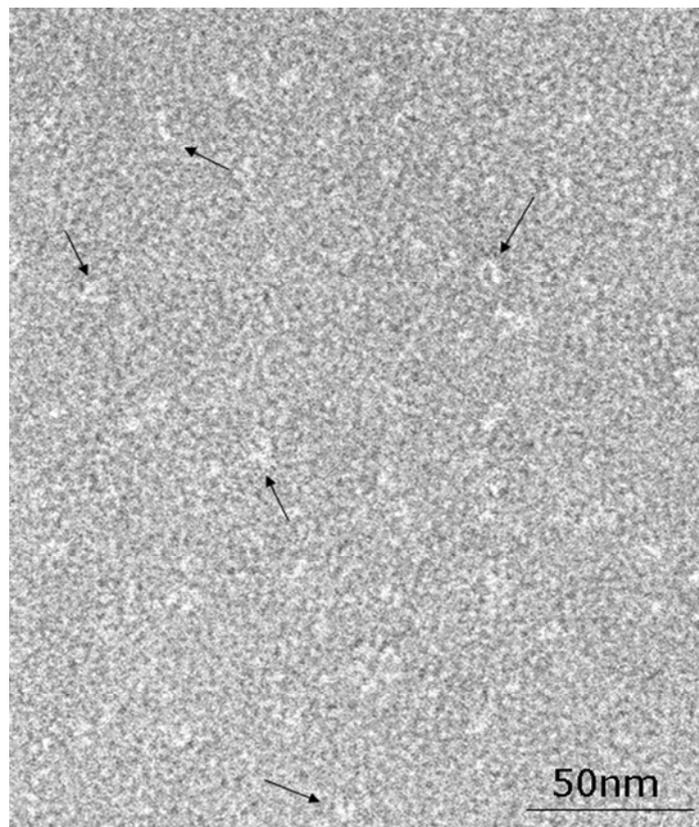


Figure 1.5. Cliché de microscopie électronique à transmission du complexe NP/importine α 5 humaine. Coloration négative au silicotungstate de sodium (SST). Le microscope utilisé est un JEOL 1200 EX II, sous une tension d'accélération de 100 KV et un grossissement nominal de 40000 x. La source d'électrons du microscope est un filament de tungstène. Le complexe protéique (indiqué par une flèche) a un diamètre d'environ 8 nm.

Modélisation et correction de la fonction de transfert de contraste (CTF). La CTF est responsable d'une perte d'informations dans l'image (**Figure 1.6**), il a donc fallu estimer et corriger la CTF de chaque micrographie selon la méthode décrite par [Conway et ses collègues \(1999\)](#). Cette étape est indispensable pour améliorer la résolution de la reconstruction finale. Le programme *SumPS* calcule à partir de nombreuses zones sélectionnées dans une micrographie (particules de complexe NP/importine ou une autre zone quelconque) un spectre de puissance moyen. Les amplitudes de ce spectre, moyennées radialement, sont utilisées pour modéliser la CTF avec le logiciel *Kaleidagraph*. En utilisant les minima de la CTF, on calcule la défocalisation à laquelle la prise de vue s'est effectuée avec le programme *Ctfzeros* pour corriger la CTF modélisée avec *Kaleidagraph*. La valeur de la défocalisation attendue est comprise entre 1 et 3 μm .

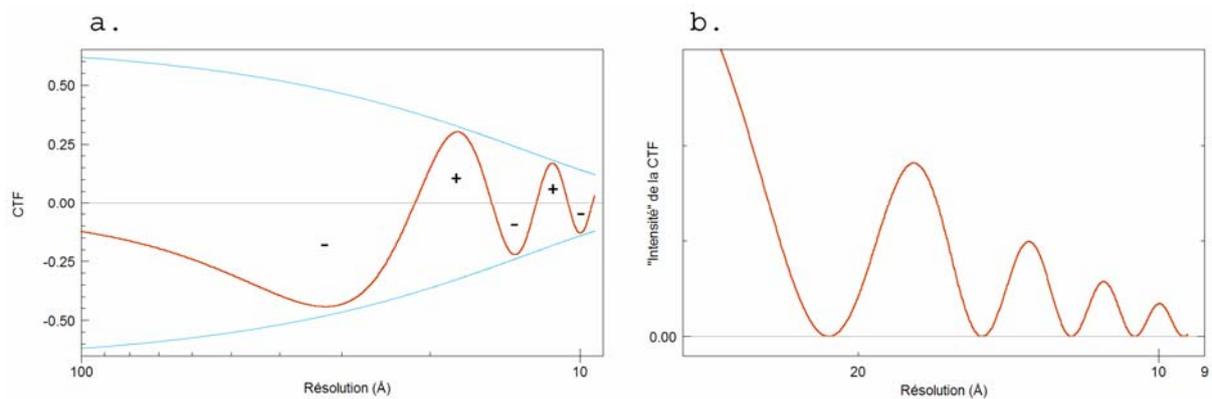


Figure 1.6. La Fonction de transfert de contraste. (a) La CTF théorique. L'amplitude du signal varie en fonction des fréquences spatiales dans l'image. L'amortissement des hautes fréquences et l'inversion de phase à chaque passage par 0 (symbolisée par les signes + et -) sont responsables de la perte d'informations. **(b)** Une CTF expérimentale partiellement corrigée. Cette courbe représente la variation des amplitudes du spectre de puissance corrigées par la gaussienne en fonction de la résolution de l'image. Les minima représentent la position des inversions de phase.

Reconstruction du modèle du complexe NP/importine α 5 humaine. Une fois la correction de la CTF déterminée, on crée en parallèle deux groupes de fichiers d'images au format PIF grâce au programme *Ctfmix* : un premier où l'image est phasée pour déterminer l'orientation de l'objet, et un second où l'image est totalement déconvoluée pour faire la reconstruction.

La reconstruction du modèle se fait dans *SPIDER* (Frank *et al.*, 1996), au moyen d'un script développé dans notre groupe par le Dr Guy Schoehn (IVMS).

Modèle du complexe NP/importine α 5 humaine. Après 8 cycles de reconstruction (168 projections à chaque cycle), on obtient une reconstruction tridimensionnelle (3D) du complexe protéique (**Figure 1.7**).

L'objet obtenu possède une surface complexe : on pourra éventuellement insérer, à l'intérieur de cette densité, la structure cristallographique de l'importine α de levure (Conti *et al.*, 1998) (code PDB : 1BK5) et la densité d'un monomère de NP extraite de la reconstruction d'une vRNP recombinante (Martin-Benito *et al.*, 2001 ; Area *et al.*, 2003) (**Figure 1.8**). Cette densité de NP nous a été donnée par le Pr J. Ortin, du Centre National de Biotechnologie de Madrid, en Espagne.

La reconstruction du complexe une fois obtenue, nous avons commencé par insérer dans celle-ci la structure cristallographique de l'importine α de levure (Kapa50) résolue par Conti *et al.* (1998).

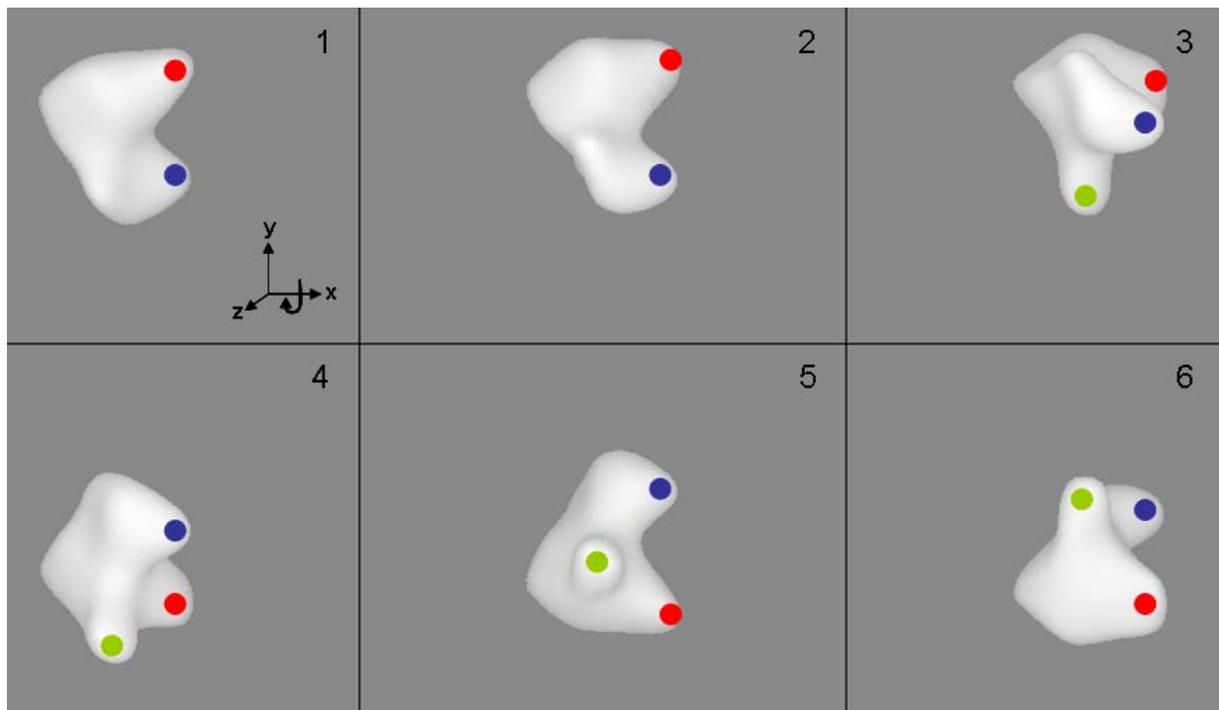


Figure 1.7. Reconstruction tridimensionnelle du complexe NP/importine α 5 humaine en microscopie électronique à transmission (coloration négative). Paramètres : environ 6500 particules sélectionnées, 8 cycles de 168 projections avec des pas de 10° , résolution de 30 \AA environ ($3.5 \text{ \AA}/\text{pixel}$). Echelle : la densité du complexe a un diamètre d'environ 9 nm (déterminé avec *Web*). Les pastilles servent de points de repère pour l'orientation de l'objet lors des rotations successives de 30° autour de l'axe des x.

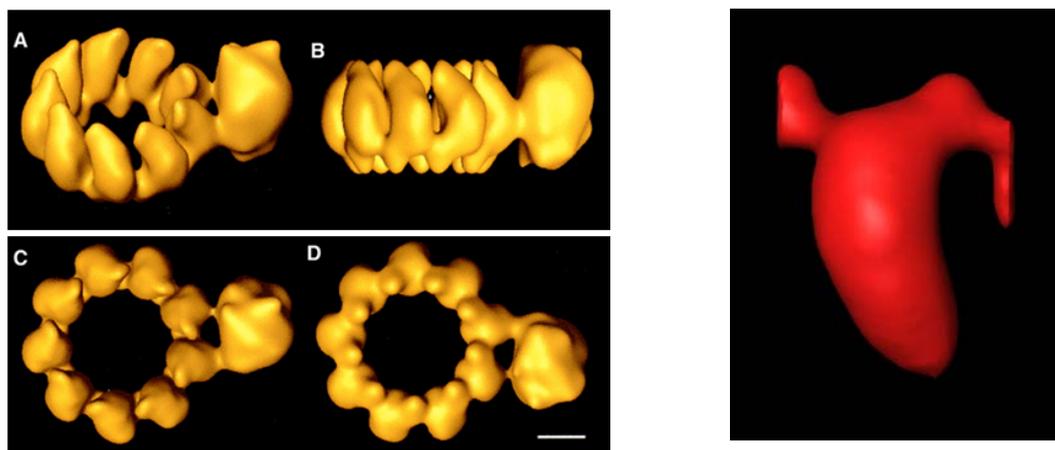


Figure 1.8. Reconstruction tridimensionnelle d'une vRNP recombinante du virus de la grippe par MET (Martin-Benito *et al.*, 2001). **A gauche.** Différentes vues du modèle de vRNP à une résolution de 27 \AA : (supérieure latérale (A), latérale (B), supérieure (C), inférieure (D)). **A droite.** Monomère de NP isolée à partir du modèle entier représenté dans la partie de gauche.

Les alignements de séquences en acides aminés des importines α humaines (programme *ClustalW* de European Bioinformatics Institute EBI/EMBL), de levure et de souris indiquent une conservation entre ces différentes protéines (non présentés). Les alignements des séquences des importines α humaines montrent qu'il existe une conservation dans la nature et la position de certains résidus, à l'origine des motifs répétés ARM (Melen *et al.*, 2003) (Figure 1.9). Les prédictions de structures secondaires (programme Profile network prediction HeiDelberg PROF sur Expasy, Rost et Sander, 1993) et tertiaires (*SwissModel*) de l'importine α 5 humaine montrent qu'elle est très semblable à l'importine α de levure (K α 50) (résultats non présentés) dont la structure a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Conti *et al.*, 1998).

Ne disposant de la structure cristallographique d'aucune importine α humaine, c'est donc la structure cristallographique de l'importine α de levure (Conti *et al.*, 1998) (code PDB : 1BK5) qui est recalée dans la densité de microscopie électronique du complexe NP/importine α 5 humaine.

Il faut préciser que notre choix de l'importine α de levure au lieu de celle de souris (dont la structure cristallographique est aussi connue, Kobe, 1999) est lié d'une part aux alignements de séquences d'acides aminés qui montrent que l'importine α 5 humaine a plus de similarité avec l'importine α de levure (score 48 sur *ClustalW*) que celle de souris (score 44 sur *ClustalW*). Et d'autre part, au fait que l'importine α 5 humaine utilisée dans le complexe avec NP est une forme tronquée en N-terminal (la séquence de la protéine correspond aux résidus 66 à 512), c'est-à-dire sans le domaine IBB.

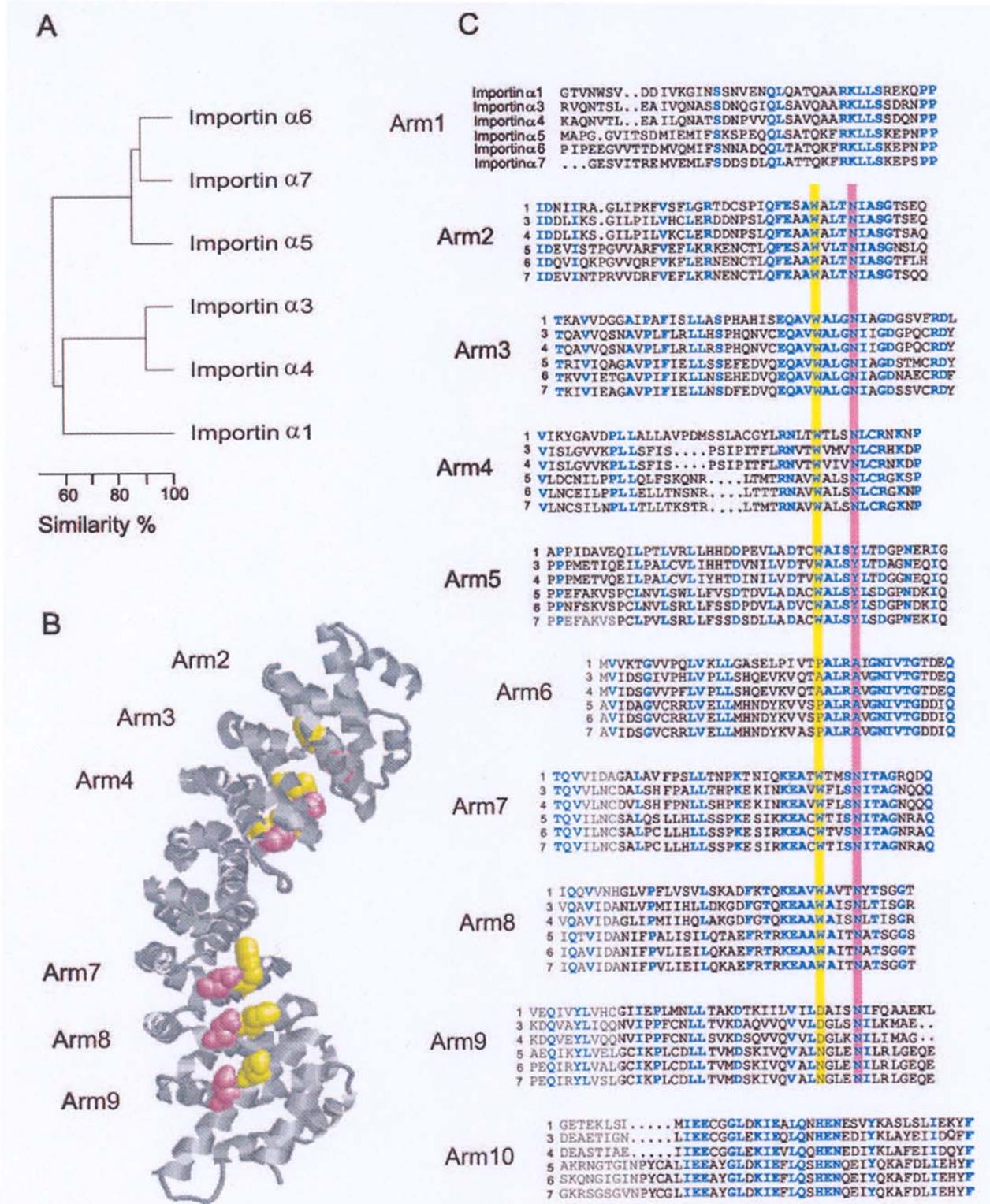


Figure 1.9. Alignement des motifs ARM des différentes importines α humaines (d'après Melen *et al.*, 2003). A) Diagramme montrant les relations entre les motifs ARM des six importines α humaines. Les numéros d'accès de la GenBank sont les suivants : importine α 1 (P52292), α 3 (O00629), α 4 (O00505), α 5 (P52294), α 6 (O15131) et α 7 (AF060543). Le diagramme et les alignements sont construits avec le programme PILEUP (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). B) Représentation de la structure de l'importine α de levure : les motifs ARM sont indiqués et les résidus impliqués dans la liaison aux peptides NLS sont représentés en rose (essentiellement des tryptophanes) et jaune (asparagines). C) Alignement des ARM des importines α humaines. Les résidus identiques sont en bleu, les tryptophanes (W) et asparagines (N) conservés de chaque ARM sont surlignés.

L'insertion de la densité provenant du fichier PDB est effectuée manuellement à l'aide du logiciel de modélisation cristallographique *O* (Jones *et al.*, 1991) (**Figure 1.10**). Le choix de l'emplacement de l'importine α dans la densité est basé sur la forme superhéliçoïdale de l'importine α , forme très caractéristique que l'on retrouve également dans la densité. Les autres régions de la densité ne permettent pas une correspondance aussi correcte avec la structure cristallographique de l'importine α .

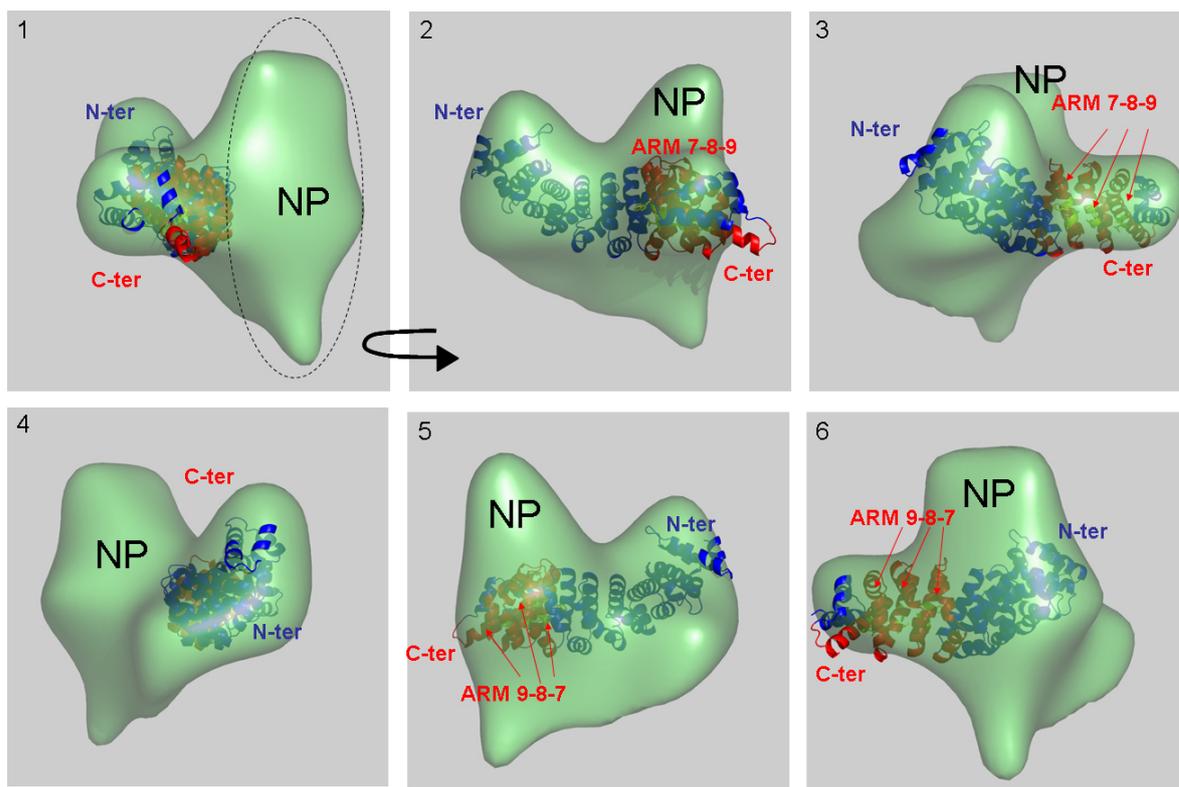


Figure 1.10. Insertion de la structure cristallographique de Kap α 50 dans la reconstruction en MET du complexe NP/ importine α 5 humaine (rotation de 90° vers la droite entre chaque image). En vert, densité obtenue à partir de la reconstruction en MET du complexe NP/importine α 5 humaine. En bleu, structure cristallographique de l'importine α de levure. En rouge sont représentées les hélices des ARM 7-8-9 et en jaune les équivalents des résidus de l'importines α 5 humaine (W360/S363/N364 de l'ARM 7, W402/N406 de l'ARM 8, N445/N449 de l'ARM 9) du sillon mineur de liaison au NLS. En pointillé, densité correspondant potentiellement à NP.

L'orientation de l'importine α (extrémités N- et C-terminales) a été choisie en fonction du pas de la superhélice d'une part, et d'après les résultats obtenus par Melen et ses collègues (2003) d'autre part. Ils étudient par mutagenèse dirigée les interactions de certaines importines α humaines avec NP et STAT. Je reprendrai plus en détail ces travaux dans la suite du texte. Brièvement, ils montrent que NP interagit avec les motifs ARM 7-8-9 des importines α 1, α 3 et α 5 humaines. Nous avons donc orienté l'importine α dans la densité du complexe de

manière à obtenir une zone de contact la plus large possible entre la densité correspondant à NP et les motifs ARM 7-8-9 de la structure cristallographique.

Le recalage de la structure cristallographique de l'importine α de levure dans la reconstruction 3D du complexe n'est bien-sûr pas une certitude, il faut que nous placions encore la densité du monomère de NP et que nous améliorions la résolution de notre reconstruction 3D.

Le recalage de la densité du monomère de NP (**Figure 1.8**) dans la densité du complexe n'est pas au point encore mais les premiers essais de superposition de la densité de NP dans celle du complexe semblent prometteurs.

On peut également noter que la NP, dans la densité du complexe avec l'importine α (**Figure 1.10**), a une forme allongée comme celle du monomère de NP dans la vRNP recombinante de [Martin-Benito et ses collègues \(2001\)](#) (**Figure 1.8**). Il faut par ailleurs préciser que le modèle de la vRNP recombinante du groupe du Pr Ortin a été obtenu en faisant pivoter légèrement la grille supportant les vRNPs (les anneaux de vRNP étaient positionnés sur leur face plane). Cela crée un artéfact dans la reconstruction du modèle, conduisant à des monomères de NP plus allongés qu'ils ne le sont en réalité.

Il faut mettre en relation nos résultats avec ceux de [Melen et ses collègues \(2003\)](#). Leurs travaux de mutagenèse dirigée sur différentes importines α humaines donnent des résultats très intéressants. Ils montrent que la liaison de NP à l'importine $\alpha 3$ semble légèrement plus faible que celle aux $\alpha 1$ et $\alpha 5$. Aucune liaison à l'importine $\alpha 7$ n'est en revanche détectée. Ces résultats sont donc cohérents avec ceux obtenus par d'autres auparavant ([O'Neill et Palese, 1995](#) ; [Wang et al., 1997](#)).

Pour déterminer les motifs ARM des importines α impliqués dans l'interaction avec NP, ils utilisent des mutants ponctuels où des alanines remplacent les résidus de liaison au NLS dans les sites majeur (ARM 2-3-4) et mineur (ARM 7-8-9).

Ils observent ainsi que les résidus W360, S363 et N364 de l'ARM 7 et les résidus W402 et N406 de l'ARM 8 de l'importine $\alpha 5$ sont indispensables dans l'interaction avec NP. Les résidus N445 et N449 de l'ARM 9 de l'importine $\alpha 5$ semblent aussi impliqués dans la liaison à NP. Cependant, une différence est observable en fonction de l'origine de NP : la NP exprimée *in vitro* peut encore se lier faiblement à l'importine $\alpha 5$ mutée dans son ARM 9, alors qu'aucune interaction n'est observée entre la NP produite en baculovirus et l'importine $\alpha 5$ mutée dans son ARM 9. Ces résultats confirmeraient le rôle de la phosphorylation dans le transport de la NP ([Neumann et al., 1997](#) ; [Bui et al., 2002](#) ; [Arrese et al., 1996](#)). Son affinité pour le transporteur nucléaire pourrait être modulée en fonction de son état de phosphorylation.

Les mutations des résidus W390 et N394 de l'ARM 8 de l'importine α 3 induisent également la perte de liaison de cette dernière à NP.

En résumé, NP se lie aux motifs ARM 7-8-9, c'est-à-dire au sillon mineur C-terminal des importines humaines α 3 et α 5. A noter cependant qu'il n'est pas fait mention des conséquences sur la structure des importines α , lorsque les tryptophanes et asparagines, résidus très conservés, sont remplacés par des alanines.

On peut s'aider de ces résultats pour orienter l'importine α dans la densité. Le domaine C-terminal de l'importine doit correspondre à la zone d'interaction avec NP, il faut donc placer l'importine de façon à garder un maximum de surface de contact avec le reste de la densité correspondant à NP.

L'importine α placée dans le modèle du complexe et la densité restant pour la NP semblent montrer un mode d'interaction à première vue inattendu entre NP et l'importine α (**Figure 1.10**). En effet, la NP, dont on retrouve dans notre modèle 3D la forme allongée décrite par l'équipe de J. Ortin dans les reconstructions en MET d'anneaux de vRNPs recombinantes (Martin-Benito *et al.*, 2001 ; Area *et al.*, 2004), semble être positionnée dans « le dos » de la courbure de l'importine α . Par ailleurs, si l'on se réfère aux résultats de Melen *et ses collègues* (2003) décrits précédemment, les résidus des ARM 7-8-9 impliqués dans l'interaction avec NP pointent du côté opposé à NP.

Si notre reconstruction 3D en MET du complexe NP/importine α 5 humaine et le recalage de l'importine α (et donc l'assignation de la densité restante à NP) sont correctes, la liaison de NP sur l'importine peut paraître différente de celle du peptide NLS monopartite de l'antigène T de SV40 (₁₂₆PKKKR₁₃₂) avec Kap α 50 (importine α de levure) (Conti *et al.*, 1998). Ou encore de celle des peptide NLS monopartite de l'antigène T de SV40 et bipartite de la nucléoplasmine (₁₅₅KRPAATKKAGQAK₁₇₀) avec l'importine α de souris (Fontes *et al.*, 2000). En effet, les structures cristallographiques portant sur une importine α tronquée en complexe avec des peptides NLS monopartite et bipartite montrent que le peptide NLS se fixe sur la courbure interne de l'importine α (Conti *et al.*, 1998 ; Fontes *et al.*, 2000) (**Figure 1.11, haut**).

Dans le cas de la liaison du peptide NLS monopartite ₁₂₆PKKKR₁₃₂ à Kap α 50, elle combine des interactions de types hydrophobiques et électrostatiques, de telle façon qu'ils ne sont compatibles que pour des lysines et arginines, composants majeurs des NLS (**Figure 1.11, bas**).

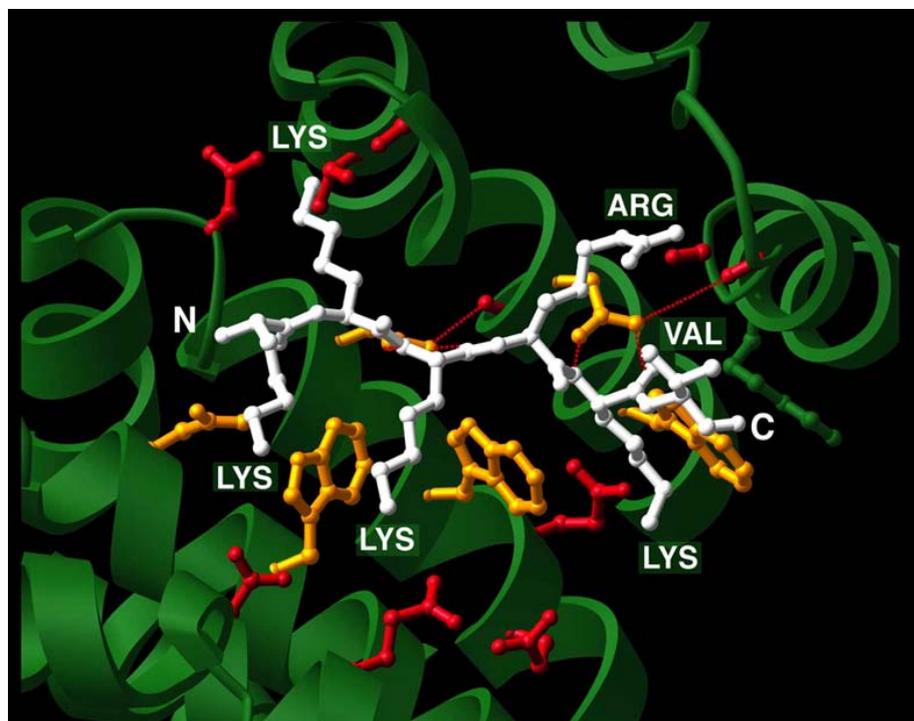
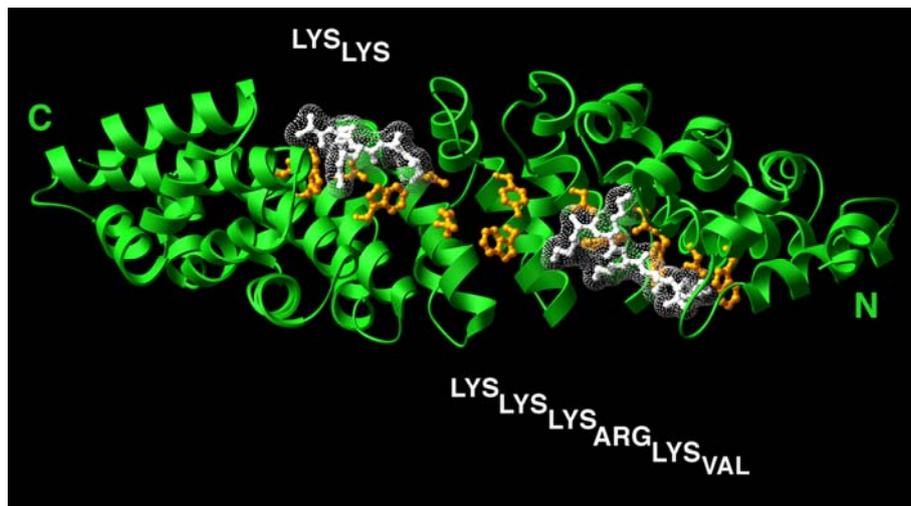


Figure 1.11. Structure cristallographique de Kap α 50 (importine α de levure) en complexe avec le peptide NLS monopartite de l'antigène SV40 (Conti *et al.*, 1998). En haut : vue générale de la liaison de deux peptides NLS aux grand et petit sillon sur le site de liaison au NLS de Kap α 50. Ces sites de liaisons sont particulièrement adaptés à la fixation de résidus chargés positivement (lysines). En bas : détail du mode d'interaction du peptide NLS avec le site de liaison sur Kap α 50. En blanc : le peptide NLS riche en lysines ; en jaune : les paires tryptophanes/asparagines ; en rouge : les résidus polaires ou chargés négativement. Représentations faites avec *ViewerLite* (développé par Accelrys/Discovery Studio ViewerPro).

Plus précisément, les chaînes latérales des asparagines (N) des sillons majeur (motifs ARM 2 à 4) et mineur (motifs ARM 7 et 8) se lient au squelette du NLS et lui imposent une direction

particulière. Les chaînes latérales des tryptophanes (W) prennent en « sandwich » les lysines du NLS, pendant que les résidus chargés négativement sur les bords des sillons de l'importine α interagissent électrostatiquement avec les résidus basiques du NLS.

Un NLS monopartite se lie à chaque sillon séparément, c'est-à-dire que deux peptides monopartites NLS se fixent sur une importine α . Le NLS bipartite ¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK₁₇₀ comme celui de la nucléoplasmine, en revanche, se fixe simultanément sur les deux sillons majeur et mineur de l'importine α . Les résidus basiques ¹⁵⁵KR se lient au sillon majeur pendant que ceux de l'extrémité C-terminale du peptide se fixent au sillon mineur. L'interaction du NLS bipartite et celle des deux NLS monopartites avec les résidus du site de liaison sur l'importine α sont donc très similaires (Fontes *et al.*, 2000).

Dans tous les cas - NLS monopartite ou bipartite en interaction avec une importine α de levure ou de souris - les structures cristallographiques de l'importine α en complexe avec un NLS montrent que le peptide NLS est positionné face aux sillons majeur et mineur de l'importine α .

On peut expliquer ces résultats par la différence des cargos mis en jeu : dans les structures cristallographiques, il s'agit de peptides de NLS de 7 résidus pour le NLS monopartite et 16 résidus pour le bipartite, alors que la NP est une protéine de 519 acides aminés. Les NLS sont des séquences d'acides aminés trop courtes pour former une structure indépendante, et doivent donc faire partie d'une séquence plus large formant un domaine structural ou globulaire. On ne sait pas comment se fait l'interaction réellement entre le NLS et l'importine α , dans le contexte d'un cargo entier.

On peut imaginer que le NLS de NP interagit effectivement comme les autres NLS avec l'importine α , le reste de la protéine NP restant à l'arrière de l'importine α : on ne connaît pas les effets de la liaison du cargo entier sur l'importine α , peut-être cette liaison induit-elle une torsion dans la structure de l'importine rendant les sillons et leurs résidus accessibles.

Il se peut également que l'on se trouve face à un type d'interaction complètement différent entre une importine et son cargo. Les résultats de Melen (2003) montrent que la NP ne se lie qu'aux motifs ARM 7-8-9 de l'importine α , c'est-à-dire au sillon mineur. Or, les structures cristallographiques citées précédemment semblent indiquer que les peptides NLS monopartites peuvent se fixer sur les deux sillons, ce qui, dans le cas d'un NLS monopartite en contexte de cargo complet, est physiquement impossible : le cargo à NLS monopartite ne

peut se lier qu'à un seul sillon à la fois. Le peptide NLS bipartite quant à lui se lie aux deux sillons en même temps.

Le fait que seul le sillon des ARM 7-8-9 soit impliqué dans la liaison à NP suggère que c'est le NLS monopartite non conventionnel en N-terminal de NP qui pourrait être utilisé dans la liaison à l'importine α . Sinon, l'autre sillon (ARM 2-3-4) aurait dû être également impliqué. Le rôle du NLS bipartite de NP, quant à lui, resterait encore à déterminer : peut-être est-il impliqué dans l'import nucléaire des vRNPs en phase précoce d'infection?

D) Conclusions et perspectives

Le modèle de NP dans la vRNP recombinante. Comme on peut le voir, les résultats de reconstruction 3D du complexe NP/importine α 5 humaine apportent plus de questions que de réponses, comme c'est souvent le cas en science. La densité du monomère de NP découpée à partir du modèle obtenu avec la vRNP recombinante (Martin-Benito *et al.*, 2001) doit encore être placée dans le modèle du complexe.

Bien-sûr, on ne sait pas si la structure de la NP en complexe avec l'importine α 5 est la même que celle de la NP dans la vRNP. Les travaux de Martin-Benito et de ses collègues (2001) portent sur une particule de vRNP recombinante (**Figure 1.8**), c'est-à-dire que les monomères (au nombre de neuf dans la vRNP recombinante) de NP sont dans un environnement complètement différent de celui de l'importine α 5 humaine. Il faut aussi noter que ces vRNPs recombinantes ont été obtenues à partir d'expression dans des cellules eucaryotes, elles sont donc potentiellement phosphorylées, alors que la NP de notre modèle en complexe avec l'importine α a été exprimée dans *E.coli*. Or, nous avons vu précédemment que la phosphorylation pouvait jouer un rôle important au niveau de la fonction et/ou adressage des protéines virales, peut-être via des modifications dans la structure de NP ?

Dans le modèle ainsi reconstruit en MET de Martin-Benito *et al.* (2001), on observe la présence de densité continue entre les monomères de NP, dans la partie inférieure de la vRNP. Cette zone de continuité correspondrait à l'ARN lié à la NP. D'après le périmètre de la vRNP recombinante (environ 400 Å) et la longueur théorique du fragment d'ARN intégré dans la vRNP recombinante (248 bases, soit environ 870 Å), Martin-Benito *et al.* (2001) déduisent que la molécule d'ARN s'enroulerait autour de chaque NP. Cette région de continuité dans la densité pourrait aussi correspondre à la zone de contact NP-NP.

Certes, les précédents résultats de mutagenèse portant sur la séquence de NP ont montré que le premier tiers N-terminal de NP interagissait avec l'ARN (Albo *et al.*, 1995), alors que les domaines d'interaction NP-NP concerneraient les deux tiers C-terminaux (Elton *et al.*, 1999b)

(Figure 1.2). Mais on ne peut pas exclure que la structure tridimensionnelle de NP ne rapproche pas dans l'espace ces deux types de domaines d'interaction (NP-ARN et NP-NP). Par ailleurs, d'autres résidus pourraient aussi être impliqués dans la liaison de NP à l'ARN, et ces résidus seraient précisément situés dans les domaines de liaison NP-NP (Kobayashi *et al.*, 1994 ; Elton *et al.*, 1999a).

Bien que paradoxal à première vue, c'est donc ce modèle de NP - reconstruit dans le contexte d'une vRNP recombinante où chaque monomère de NP semble interagir avec de l'ARN et, peut-être, aussi avec sa voisine - que nous allons intégrer dans notre modèle de NP en complexe avec l'importine α 5 humaine. En effet, nous pensons que du fait de la basse résolution de notre reconstruction (environ 30 Å), les différences conformationnelles de NP qui pourraient exister entre son état de liaison à l'ARN et à d'autres NP avec son état de liaison à l'importine α ne sont pas détectables à notre niveau. Nous préférons tout de même attendre d'avoir placé la densité de NP dans celle du complexe NP/importine α avant de faire plus d'hypothèses à ce sujet.

On espère pouvoir améliorer la résolution de notre modèle en utilisant cette fois-ci un colorant plus petit que le silicotungstate de sodium (SST). Le SST est une molécule dont le diamètre est de 10 Å environ. On pourrait utiliser à la place du SST, de l'acétate d'uranyle qui a un diamètre de 2-3 Å, permettant ainsi d'observer des détails plus fins.

L'importine α : chaperon de NP ? Lorsque NP est en complexe avec l'importine α 5 humaine, on observe une stoechiométrie de 1 :1, indiquant que NP est devenue monomérique. Cela suggère que l'importine α 5 « gêne » les domaines d'interaction NP-NP, inhibant de ce fait l'oligomérisation de NP. Le complexe NP/importine α de stoechiométrie 1 :1 très stable obtenu lors de la purification sur Superdex 200 confirme d'ailleurs cette hypothèse.

On peut faire ici un parallèle avec la nucléoprotéine N et la phosphoprotéine P des Rhabdovirus (virus à ARN négatif simple brin non segmenté et dont le cycle d'infection est entièrement cytoplasmique), cofacteur de la polymérase de ces virus. Lorsque N est exprimée seule (N⁰), elle se lie à l'ARN cellulaire de façon non-spécifique, formant des structures semblables à celles des complexes viraux N-ARN (Mavrakis *et al.*, 2002 ; Schoehn *et al.*, 2001 ; Iseni *et al.*, 1998 ; Spehner *et al.*, 1991). En revanche, quand elle est co-exprimée avec P, N⁰ forme un complexe soluble de stoechiométrie 2 :1 ne contenant pas d'ARN (Masters *et al.*, 1988 ; Peluso, 1988 ; Mavrakis *et al.*, 2003).

De la même façon que la phosphoprotéine P des Rhabdovirus, l'importine α pourrait agir comme un chaperon pour NP en empêchant celle-ci de se lier à des ARN dès sa traduction dans le cytoplasme de la cellule infectée. En effet, après son passage à travers le pore

nucléaire, la NP doit se lier aux ARN viraux répliqués dans le noyau. En complexe avec l'importine α , il se pourrait que NP ne se lie plus à l'ARN et qu'elle devienne monomérique. De là, on peut imaginer le scénario suivant : dès qu'elle est traduite dans le cytoplasme, NP serait prise en charge par l'importine α qui reconnaîtrait son NLS et la transloquerait dans le noyau. La fixation de l'importine α rendrait inaccessibles les domaines de liaison NP-NP et à l'ARN, évitant ainsi la polymérisation précoce des NP et la liaison des NP à des ARN cellulaires dans le cytoplasme. Une fois dans le noyau, la dissociation de NP de l'importine α rendrait de nouveau les domaines de liaison à l'ARN et d'oligomérisation accessibles. La concentration élevée d'ARN viraux dans le noyau privilégierait l'association de NP à ces derniers et leur polymérisation sur ceux-ci pour la synthèse de nouvelles vRNPs. Pour tester cette hypothèse - l'importine α inhibe l'oligomérisation de NP et également la liaison de NP à des ARN cellulaires du cytoplasme - il faudrait que l'on étudie si le complexe purifié NP/importine α est capable de se fixer sur des molécules d'ARN.

En complément de la reconstruction 3D en MET et pour approfondir notre étude de NP, nous souhaitons effectuer des tests d'interaction sur filtre entre la NP, l'ARN et l'importine α . En effet, la NP de la grippe est une protéine qui se lie à de l'ARN simple brin avec une affinité élevée (Kd d'environ 20 nM) et de façon non spécifique (Scholtissek et Becht 1971 ; Kingsbury *et al.*, 1987 ; Yamanaka *et al.*, 1990 ; Baudin *et al.*, 1994). Cette liaison de NP avec l'ARN se fait sur le squelette phosphate de l'ARN, les bases restant exposées vers le solvant (Baudin *et al.*, 1994).

Les NLS de NP. Les études comparatives de LaCasse et Lefebvre (1995) portant sur les NLS de protéines nucléaires pouvant se lier aux acides nucléiques montrent que les domaines NLS encadrent les domaines de liaison aux acides nucléiques dans la séquence primaire de ces protéines, comme c'est le cas pour NP (**Figure 1.2**) ou encore NS1 du virus de la grippe. L'orientation spatiale de ces motifs dans la séquence protéique suggère que cela conférerait un certain avantage du point de vue de l'évolution. Les protéines nucléaires de liaison aux acides nucléiques doivent intervenir dans le noyau où se trouve l'ADN génomique - dans le cas des protéines cellulaires (facteurs de transcription) - ou l'ARN viral amplifié dans le cas de virus comme celui de la grippe. Le NLS qui cible leur localisation nucléaire joue donc un rôle indirectement dans leur fonction.

En ce qui concerne le motif NLS bipartite de NP, on peut penser qu'il jouerait plutôt un rôle lors de l'import nucléaire des vRNPs premières. Les sous-unités de la polymérase possèdent aussi des NLS, la combinaison des NLS de NP et de la polymérase pourrait renforcer la prise

en charge des vRNPs par les importines α . En effet, une vRNP est une structure gigantesque (plusieurs millions de dalton chacune) comparée aux autres protéines nucléaires importées en temps normal. De plus, on ne sait pas si les vRNPs entrent dans le noyau (et en sortent) une par une ou « en bloc ». Dans tous les cas, la présence de plusieurs NLS sur chaque vRNP et donc la fixation à plusieurs importines α à la fois pourrait rendre l'import nucléaire des vRNPs plus efficace.

Comparaison des NP des virus à ARN négatif simple brin. Pour mieux comprendre la structure de la NP de la grippe, il faut également la replacer dans le contexte des nucléocapsides et des nucléoprotéines des autres virus à ARN négatif comme le virus de la grippe B, le bornavirus (famille des Bornaviridae), le virus de la rage, le virus de la stomatite vésiculaire VSV (famille des Rhabdoviridae, comme la rage), le virus de la rougeole (famille des Paramyxoviridae) et le virus de Sendai (famille des Paramyxoviridae) (**Tableau 1.3 dans Introduction**). A l'exception des virus de la grippe (segmenté) et le bornavirus (non segmenté), tous les autres virus cités sont non segmentés et ont un cycle d'infection entièrement cytoplasmique. Sans entrer dans les détails de toutes les connaissances accumulées sur les nucléocapsides de ces virus, je présenterai en quelques lignes (et beaucoup d'images) les différences et les similarités structurales des NP et des nucléocapsides des différents virus à ARN (-).

L'alignement des séquences en acides aminés des NP, effectué avec le programme *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994), de ces virus montre peu de similarité entre les différentes NP (**Figure 1.12**). Les prédictions de structures secondaires - prédictions consensuelles des programmes PHD (Rost *et al.*, 1994), PREDATOR (Frishman et Argos, 1997), SOPM (Geourjon et Deleage, 1994) et GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) dans NPS@ (Network Protein Sequence Analysis) (Combet *et al.*, 2000) - n'indiquent pas non plus de similarité dans les structures secondaires des NP entre les différents types de virus (**Figure 1.12**).

Il est à noter que, malgré l'absence de similarité dans les prédictions de structures secondaires, les différents modèles de NP obtenus par MET (**Figure 1.13**) et la structure de la NP du bornavirus obtenue par cristallographie aux rayons X (code PDB : 1N93) (**Figure 1.14**) indiquent une certaine conservation dans la forme tridimensionnelle des NP de ces virus. Toutes ces NP ont en effet une forme caractéristique en « haricot », avec une (dans le cas de NP de la grippe) ou plusieurs zones de contact NP-NP (pour les NP de la rage et de la rougeole).

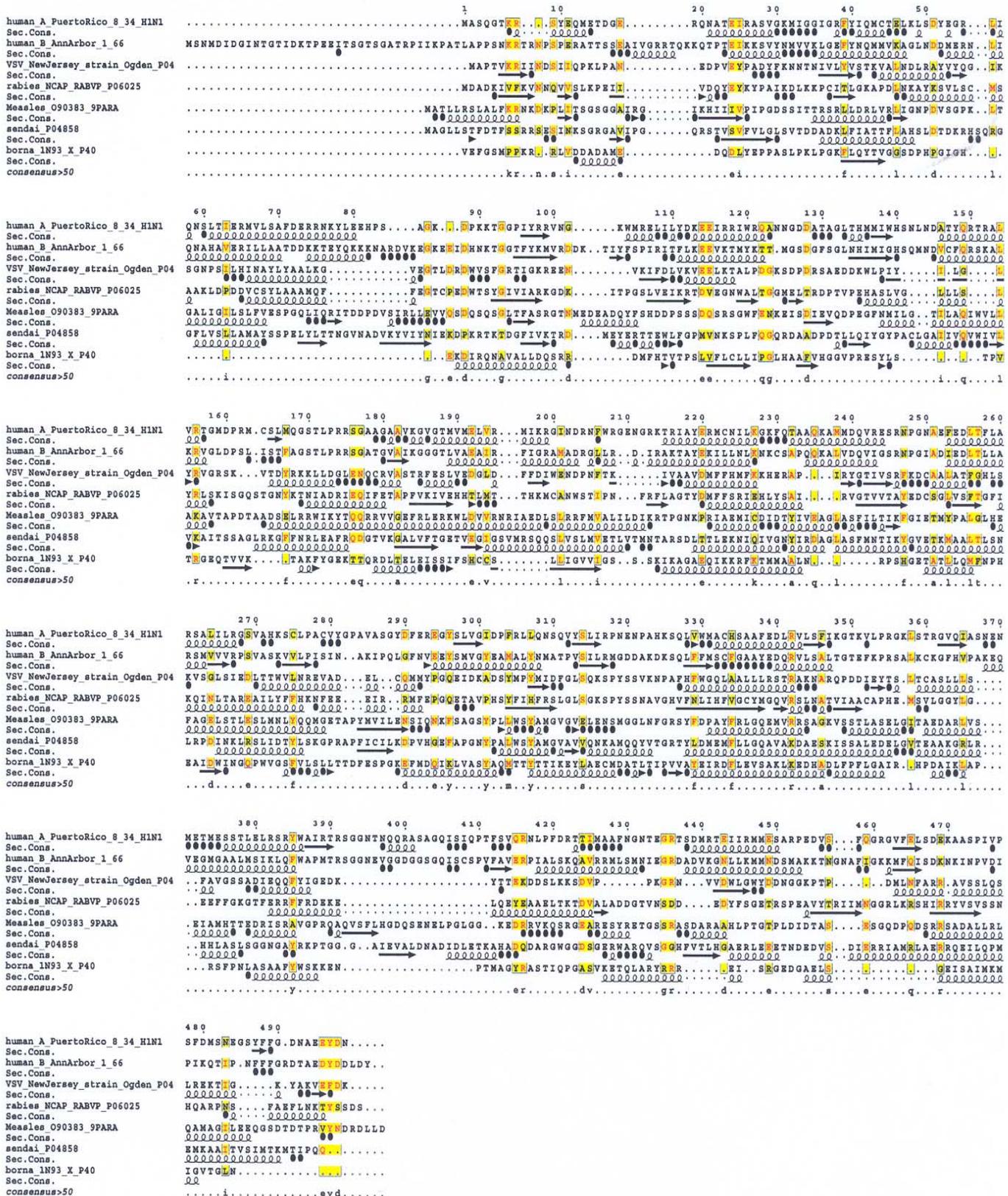


Figure 1.12. Alignements des séquences en acides aminés des NP des différents virus À ARN (-). Le programme utilisé pour les alignements est *ClustalW*. Les prédictions des structures secondaires sont les prédictions consensus des programmes PHD, PREDATOR, SOPM et GOR IV. La représentation des alignements et des prédictions de structures secondaires est effectuée dans *Esript*. Les symboles utilisés pour les structures secondaires prédites sont les suivants : les torsades représentent les hélices (alpha, 3_{10}), les flèches symbolisent les feuilletts beta, les cercles noirs pleins représentent les prédictions ambiguës (du fait de prédictions consensus à partir de 4 programmes différents).

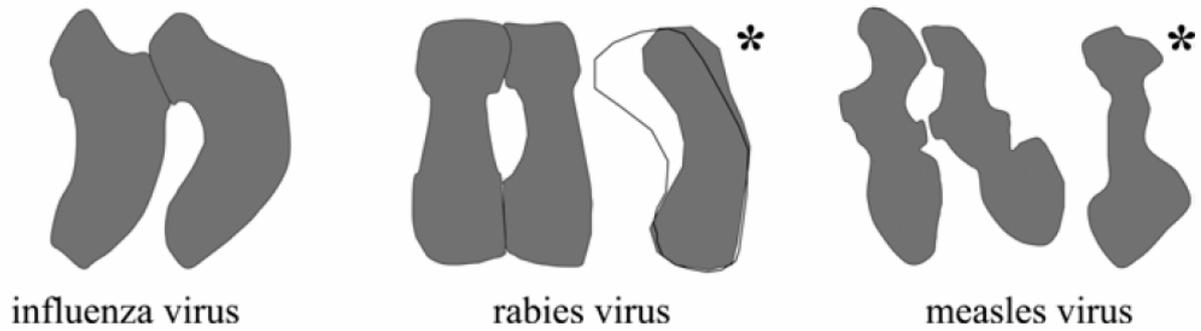


Figure 1.13. Comparaison des modèles de NP de virus à ARN négatif obtenus en MET (Schoehn *et al.*, 2004); en bas, modèles de NP obtenus après reconstruction. De gauche à droite : NP de la grippe (influenza virus), de la rage (rabies virus) et de la rougeole (measles virus). Synthèse des travaux de Martin-Benito *et al.* (2001) pour la NP de la grippe, Schoehn *et al.* (2001) pour la NP de la rage, Schoehn *et al.* (2004) pour la NP de rougeole. Les astérisques indiquent les vues latérales des NP des virus de la rage et de la rougeole, après traitement à la trypsine.

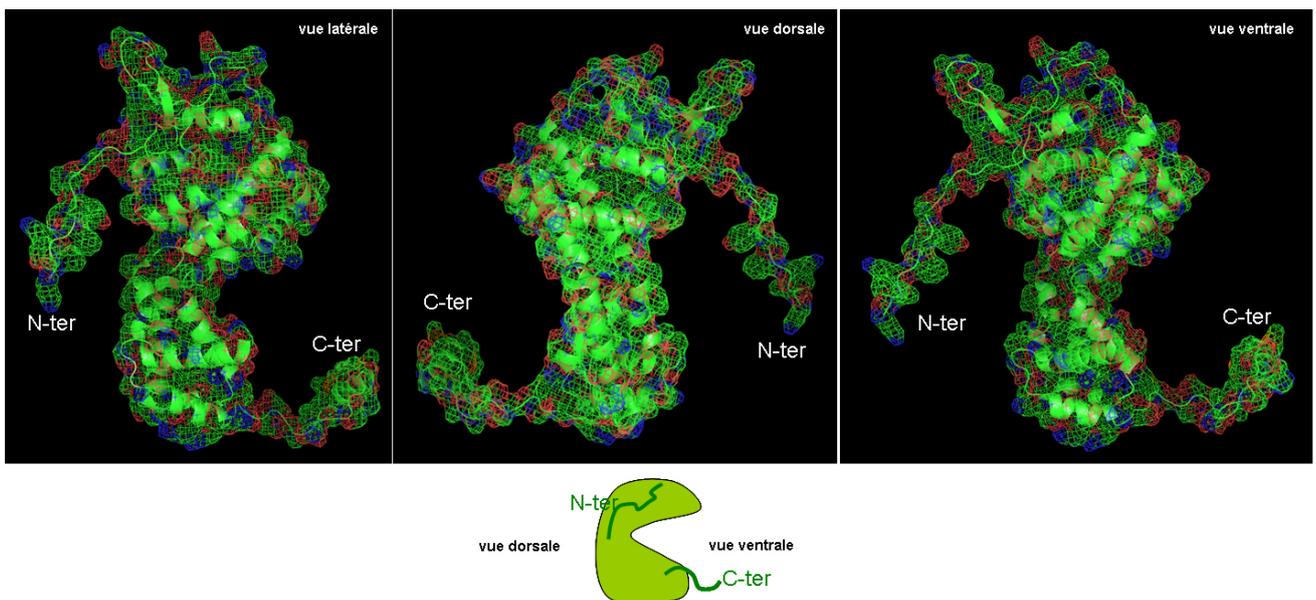


Figure 1.14. Structure cristallographique de la NP du bornavirus. Code PDB : 1N93 (Rudolph *et al.*, 2003). La NP du bornavirus a une forme en haricot caractéristique composée de deux domaines globulaires reliés par une région plus flexible. On peut noter par ailleurs que la structure cristallographique permet de voir des domaines moins organisés comme les extrémités N-terminale et C-terminale.

La structure de la NP d'un virus donné, avec les contacts NP-NP et NP-ARN qui en découlent, serait à l'origine de l'état d'organisation de la nucléocapside virale. L'enchaînement des NP et leur interaction avec l'ARN impose une certaine torsion à ce

dernier, formant ainsi une vRNP plus ou moins torsadée et compacte. Les nucléocapsides hélicoïdales des Paramyxo-, Rhabdo- et Orthomyxovirus sont très différentes. Ainsi, les vRNPs du virus de la grippe ont une forme hélicoïdale refermée (**Figures 2.6 dans Introduction et 1.14**), la nucléocapside du virus de la rage ressemble à un « ressort souple », celle du virus de la rougeole est une hélice très compacte (**Figure 1.15**), celle du virus de Sendaï est intermédiaire dans sa compaction entre les nucléocapsides de la rage et de la rougeole (non présenté). En ce qui concerne la nucléocapside du bornavirus, on ne dispose quasiment d'aucune information. Elle semblerait encore plus « relâchée » que celle des autres virus ([Kohno et al., 1999](#)).

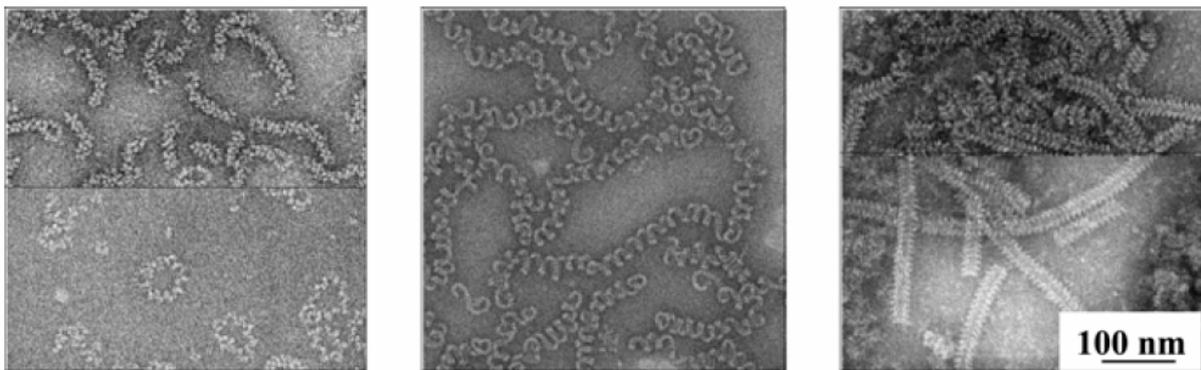


Figure 1.15. Clichés de MET en coloration négative des nucléocapsides viraux ([Schoehn et al., 2004](#)). Les nucléocapsides hélicoïdales des virus sont très différentes. De gauche à droite : NP de la grippe (Orthomyxovirus) ([Ruigrok et Baudin, 1995](#)), de la rage (Rhabdovirus) ([Schoehn et al., 2001](#)) et de la rougeole (Paramyxovirus) ([Schoehn et al., 2004](#)).

En résumé, bien que nos résultats de MET portant sur la NP en complexe avec l'importine $\alpha 5$ humaine soient extrêmement intéressants, l'idéal serait d'obtenir la structure cristallographique de NP. Nous espérons, à terme, pouvoir cristalliser la NP en complexe avec l'importine $\alpha 5$ humaine. On pourra ainsi comparer cette NP de forme monomérique avec la NP oligomérique dans les vRNPs recombinantes obtenues par l'équipe du Pr Ortin. Les études structurales portant sur les nucléoprotéines des autres virus à ARN (-) semblent indiquer une certaine flexibilité dans la structure 3D de la NP. Il semblerait que ces nucléoprotéines, dans l'ensemble, possèdent deux domaines reliés par une région flexible pouvant permettre à la nucléoprotéine d'être plus ou moins « fermée ».

2 - INTERACTION DES vRNPS ET DE M1 AVEC LA CHROMATINE

A) Introduction

Généralités. De manière générale, les virus qui ont une localisation nucléaire - mais aussi ceux qui sont purement cytoplasmiques et ont des protéines virales nucléaires - utilisent le noyau et/ou des composants nucléaires afin d'effectuer ou de faciliter leurs processus de réplication/transcription et altérer des fonctions de la cellule hôte. Le noyau des cellules de mammifères a pour fonction majeure de contenir l'information génétique, de transférer des parties de cette information en ARN, de la dupliquer en copies pour les cellules filles pendant la prolifération cellulaire (réplication) et de préserver la structure du matériel génétique (réparation). Ces différentes fonctions sont utilisées, détournées et dérégées par les virus qui ont une étape ou des protéines virales nucléaires. On peut citer l'exemple de la protéine La cellulaire, normalement nucléaire, et impliquée dans l'initiation et la terminaison de la transcription médiée par l'ARN polymérase III (Wolin et Cedervall, 2002). Elle est détournée de sa fonction principale pour réguler la traduction de nombreux génomes viraux en se fixant sur les séquences IRES (Internal Ribosome Entry Site) en 5' de ces derniers (Belsham *et al.*, 1995).

Ou bien encore, les virus ont développé de nombreuses stratégies pour inhiber l'induction de la réponse antivirale de la cellule. C'est le cas de la protéine NS1 du virus de la grippe qui inhibe l'activation de la protéine kinase PKR du système interféron (Hatada *et al.*, 1999 ; Bergmann *et al.*, 2000) et bloque les facteurs de transcription impliqués dans l'activation des gènes de protéines antivirales (Garcia-Sastre *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2000). NS1 inhibe ainsi dès en amont toute la réaction en chaîne des mécanismes antiviraux cellulaires.

Nos travaux, présentés dans cette deuxième partie de Résultats/Discussion sous la forme d'article essentiellement (Garcia-Robles *et al.*, 2005), portent sur les interactions des vRNPs, de NP et de M1 avec les composants de la chromatine.

La chromatine. La chromatine est composée de l'ADN double brin qui s'enroule autour d'une succession de complexes protéiques, les octamères d'histones. Un octamère d'histone est formé par l'association de 4 types de protéines histones : 2H2A, 2H2B, 2H3 et 2H4, composée chacune de 124, 123, 136 et 103 résidus respectivement. Les séquences en

acides aminés des histones sont très conservées au cours de l'évolution, ce qui indique leur rôle primordial dans l'organisation des chromosomes et le contrôle de l'expression des gènes. Les histones sont des protéines basiques (point isoélectrique (pI) supérieur à 10 pour chacune d'entre elles) comportant un pourcentage élevé de résidus chargés positivement, essentiellement des arginines et des lysines (9-30 %). Elles peuvent subir des modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation, isomérisation, ubiquitination) sur certains de leurs résidus situés sur les extrémités N-terminales flexibles (queues des histones). Les études qui portent sur la chromatine aujourd'hui concernent, pour une grande partie d'entre elles, sur ces modifications car elles régularaient les fonctions de la chromatine (accessibilité, transcription).

Une séquence d'ADN double brin de 147 paires de bases s'enroule autour de cet octamère d'histones, l'ensemble formant le nucléosome. Dans la chromatine, les nucléosomes sont reliés entre eux par l'histone H1 (histone de liaison).

La structure cristallographique de nucléosome recombinant a été résolue, structure où les queues des histones ne sont pas visibles par ailleurs car trop flexibles (Luger *et al.*, 1997) (**Figure 2.1**).

Certaines protéines qui interagissent avec la chromatine, comme les facteurs de transcription, ont des motifs bien particuliers, comme par exemple le motif leucine-zipper, ou encore le motif en doigt de zinc. Le motif en doigt de zinc a été découvert pour la première fois dans le facteur de transcription TFIID du Xénope (Miller *et al.*, 1985). Dans ce modèle, les paires de cystéine et d'histidine forment un site de coordination tétraédral pour un ion zinc et les acides aminés entre ces sites de coordination se présentent comme des doigts. Ces motifs sont également présents dans certaines protéines cellulaires ou virales qui lient l'ADN ou l'ARN.

Tout comme pour les mécanismes d'interaction entre certaines protéines virales et la chromatine, on ne sait toujours pas comment, structurellement, cette dernière sert de substrat pour les ADN et ARN polymérase, les enzymes de réparation et modification de l'ADN, les facteurs de transcription. Les mécanismes de réplication, transcription, réparation, reconnaissance de l'ADN dans le contexte du nucléosome et de la structure de la chromatine à un degré supérieur, ne sont pas encore élucidés.

C'est dans ce contexte de connaissance sur les interactions chromatine-protéine que nous avons essayé de comprendre comment les vRNPs et la protéine M1 de la grippe interagissaient avec la chromatine et les histones. Afin de mieux comprendre nos résultats, il est important de réunir auparavant les données qui existent sur l'étape nucléaire du virus de la grippe lors de son cycle d'infection. Je commencerai donc par présenter les différents

mécanismes mis en jeu par le virus de la grippe pendant ses phases de transcription et de réplication dans le noyau.

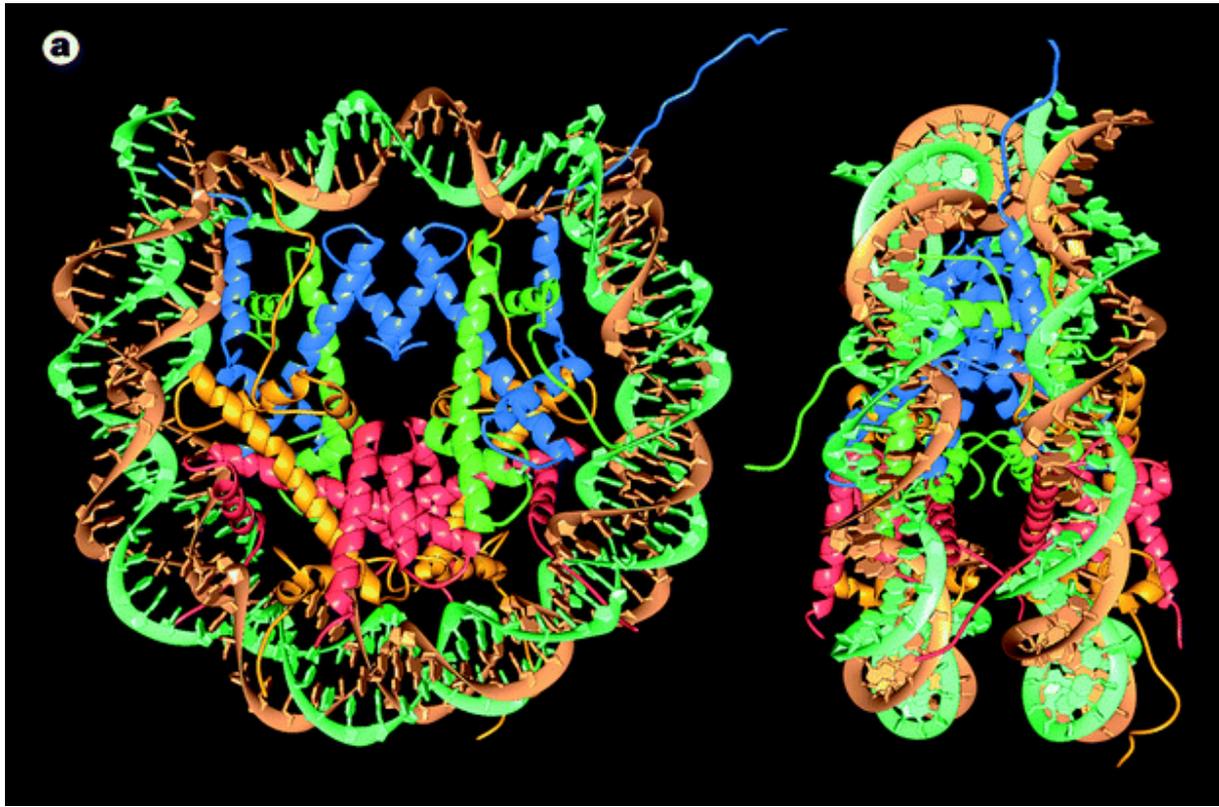


Figure 2.1. Structure du nucléosome de *Xenopus laevis* à 2.8 Å (code PDB : 1AOI) (Luger *et al.*, 1997). A l'extérieur, en marron et vert: le squelette phosphodiester de 146 paires de base de l'ADN. Au centre, en bleu: H3 ; en vert: H4 ; en jaune: H2A ; en rouge: H2B. A gauche : vue par-dessus l'axe de la superhélice d'ADN ; à droite: vue perpendiculaire à ce même axe.

NS1 de la grippe bloque le système d'épissage des ARNm. La transcription du virus de la grippe est très particulière en ce sens qu'elle fait directement appel aux mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de la cellule hôte. La protéine virale NS1 joue un rôle capital dans cette étape, outre son rôle dans l'inhibition du système de défense de la cellule hôte. Elle empêche la maturation et la polyadénylation en 3' des ARNm cellulaires en se fixant sur deux protéines du complexe de polyadénylation à la fois (Chen *et al.*, 1999): la sous-unité 30 kDa du facteur de clivage et de spécificité de polyadénylation CPSF (Nemeroff *et al.*, 1998) et la protéine de liaison au poly(A) PABII (Chen *et al.*, 1999), toutes deux nucléaires.

CPSF se lie au signal de polyadénylation AAUAAA situé 10-13 nucléotides en amont du site de clivage du pré-ARNm et cette protéine est nécessaire à la fois au clivage et à la

polyadénylation des pré-ARNm (Colgan et Manley, 1997). La sous-unité 30 kDa de CPSF est impliquée dans la spécificité de liaison au signal AAUAAA (Barabino *et al.*, 1997). PABII intervient après le clivage en 3' et est nécessaire à l'élongation de la chaîne poly(A) par la poly(A) polymérase cellulaire (PAP).

Lorsque NS1 bloque ces deux facteurs du complexe de polyadénylation, les ARNm cellulaires non maturés restent bloqués dans le noyau (Nemeroff *et al.*, 1998), puisque seuls les ARNm possédant une queue poly(A) sont exportés. En revanche le virus, lui, continue de faire la polyadénylation de ses ARNm viraux car il possède son propre mécanisme de synthèse des poly(A) (Robertson *et al.*, 1981 ; Luo *et al.*, 1991 ; Li *et al.*, 1994 ; Zheng *et al.*, 1999).

La rétention des ARNm cellulaires dans le noyau a donc deux avantages pour le virus de la grippe : elle permet d'une part de bloquer les ARNm qui codent pour des protéines antivirales. Cela permet de bloquer en aval la réponse immune médiée par la PKR citée auparavant. D'autre part, la rétention des ARNm cellulaires dans le noyau permet d'y maintenir une concentration élevée en ARNm cellulaires. De cette façon, le virus de la grippe a à sa disposition une grande quantité de coiffes 5' m⁷Gppp cellulaires nécessaires à l'initiation de la transcription par la polymérase virale.

Le vol des coiffes 5' m⁷Gppp des ARNm cellulaires. C'est le mécanisme par lequel la synthèse des ARNm du virus de la grippe est initiée (Bouloy *et al.*, 1978 ; Plotch *et al.*, 1979 et 1981). L'endonucléase, intrinsèque à la polymérase virale, clive les ARNm cellulaires coiffés dans le noyau pour générer des fragments d'ARN de 10-13 nucléotides de long et possédant une coiffe 5' m⁷Gppp. Ces fragments d'ARN cellulaires coiffés servent d'amorce à la synthèse des ARNm viraux, la polymérase virale n'étant pas capable de faire seule une initiation de la transcription (**Figure 2.2**).

Plus précisément, l'extrémité 5' de l'ARN viral se lie aux arginines 571 et 572 de PB1 (Li *et al.*, 1998). Cette liaison active deux autres sites du complexe de la polymérase : le site de liaison de PB2 à la coiffe et le site de liaison de PB1 à l'extrémité 3' de l'ARN viral (Li *et al.*, 1998 et 2001). La fixation de l'extrémité 3' de l'ARN viral active l'endonucléase PB1 qui clive les ARNm fixés à la polymérase par leur coiffes 10-13 nucléotides en aval de leur extrémité 5' (Hagen *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 2001).

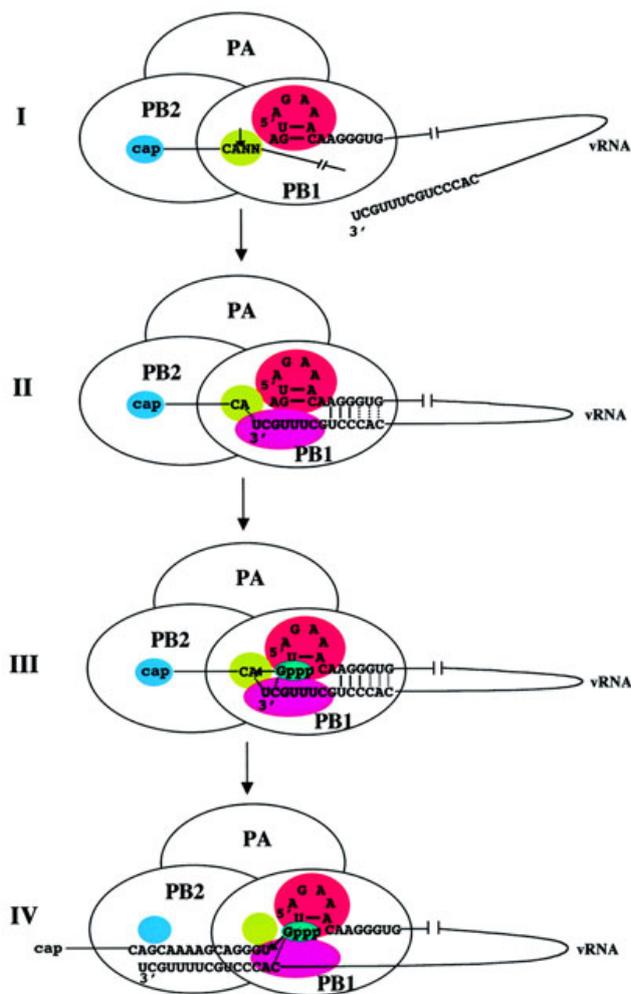


Figure 2.2. Modèle du mécanisme du vol des coiffes (Rao *et al.*, 2003). L'activation de la polymérase par l'ARN viral, le clivage par l'endonucléase virale de fragments d'ARN coiffés comportant le motif CA en 3' et l'initiation de la synthèse des ARN viraux sont couplés. La structure en épingle à cheveu à l'extrémité 5' de l'ARN viral matriciel et la complémentarité entre les bases 11-13 en 5' avec les bases 10-12 en 3' sont indispensables au clivage et à l'initiation.

Il a été proposé que le complexe de la polymérase serait susceptible d'interagir avec des facteurs de transcription (Huarte *et al.*, 2001) concentrés dans les zones actives transcriptionnellement. En parallèle, PA protéolyserait (Sanz-Ezquerro *et al.*, 1995 et 1996) les facteurs de transcription impliqués dans la mise en place d'une réponse antivirale, renforçant ainsi les effets de NS1.

Tous ces résultats vont dans le sens de l'idée d'une interférence entre les protéines virales et les protéines cellulaires, plus particulièrement les protéines nucléaires.

Liaison des vRNPs, de NP et de M1 à la chromatine. La structure des vRNPs et les mécanismes moléculaires à l'origine de leur transcription et répllication dans le noyau sont relativement bien documentés. Il faut savoir qu'il existe en revanche très peu de données (seulement quatre articles !) sur la localisation précise des vRNPs à l'intérieur du noyau durant ces phases de transcription/répllication.

Des travaux d'extraction de vRNPs à partir de cellules infectées indiquent que les vRNPs sont très étroitement liées à la chromatine (Bukrinskaya *et al.*, 1979 ; Bui *et al.*, 2000). Une concentration élevée en sels est nécessaire pour séparer les vRNPs de la chromatine (Bui *et al.*, 2000). D'autres travaux indiquent la présence des ARN viraux sous forme de complexes insolubles dans la fraction de matrice nucléaire, dès une heure après l'infection (Lopez-Turiso *et al.*, 1990). Cette interaction est un obstacle à l'export nucléaire des vRNPs.

En ce qui concerne l'intérêt biologique de la localisation des vRNPs au niveau de la chromatine, on peut imaginer que cela leur permettrait d'être proches des régions nucléaires très actives transcriptionnellement (**Figure 2.3**), afin d'avoir accès aux coiffes des pré-ARNm cellulaires.

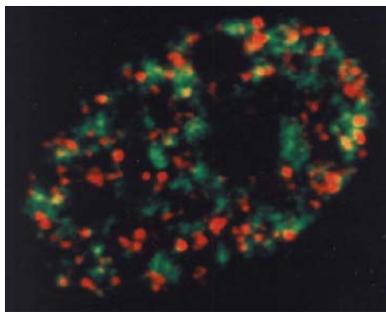


Figure 2.3. Les domaines de transcription par l'ARN polymérase II (en rouge, Texas Red) dans un noyau en phase S précoce (Wansink *et al.*, 1994). Le marquage des ARN naissant se fait au BrUTP. En vert (fluoresceïn isothiocyanate FITC), ADN naissant (réplication) marqué par du dUTP-digoxigénine.

Peut-être le virus doit-il cliver les coiffes des pré-ARNm cellulaires avant que ne se fixe le complexe de liaison à la coiffe (CBC) et que cette liaison n'aboutisse à un épissage et une maturation complète des ARNm cellulaires, rapidement suivis de l'export nucléaire des ARNm ? (Kornblihtt *et al.*, 2004 ; Aguilera, 2005) (**Figure 2.4**).

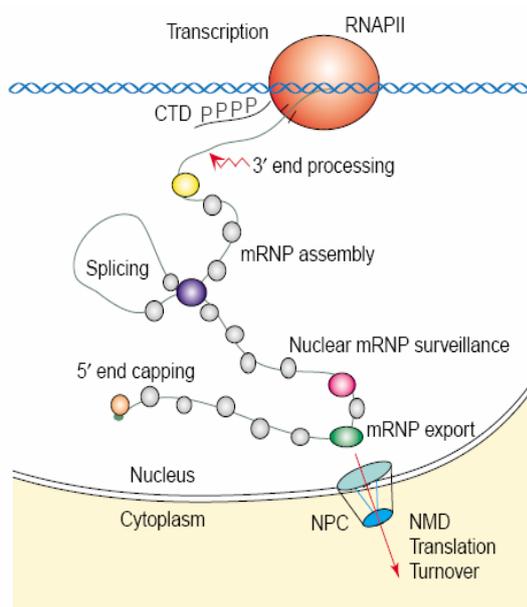


Figure 2.4. Vue simplifiée de l'expression génique eucaryote, couvrant les étapes de transcription, de formation de la ribonucléoprotéine messager (mRNP), du coiffage 5', d'épissage, le contrôle qualité de la mRNP, d'export de l'ARNm (Aguilera, 2005). NMD : non-sense mediated decay ; RNAPII : ARN polymérase II ; CTD : domaine C-terminal de l'ARN polymérase II.

Chez les eucaryotes, l'épissage des premiers introns dans les pré-ARNm se fait en même temps que leur transcription (**Figure 2.5**) (Kornblihtt *et al.*, 2004 ; Aguilera, 2005). On peut imaginer que la fixation de tous les différents facteurs cellulaires d'épissage et de maturation sur les ARNm pourrait gêner, de façon stérique, le clivage des coiffes par la sous-unité PB1 de la polymérase virale.

Zhirnov et Klenk (1997) ont proposé que M1 interagirait avec les histones des nucléosomes, jouant ainsi un rôle éventuel dans le décrochage des vRNPs de la chromatine pour permettre leur export nucléaire. Pour leurs expériences, ils utilisent de la M1 purifiée à partir de virus directement et resuspendue en étape finale de purification dans un tampon acide (Mes 20 mM pH 4.5). Ils déterminent les protéines cellulaires qui interagissent avec M1 grâce à un test d'interaction sur membrane : des extraits cellulaires sont fractionnés par électrophorèse puis transférés sur une membrane PVDF (Millipore). Celle-ci est ensuite incubée avec M1 et la détection de M1 sur la membrane se fait par immunorévélation. Ils observent ainsi que M1 se lie à des protéines cellulaires qu'ils supposent être des histones, d'après leur poids moléculaire et leur localisation dans la fraction nucléaire. Pour confirmer ces résultats, ils effectuent des expériences d'immunoprécipitation entre M1 et des histones purifiées commerciales (Boehringer). Ils montrent ainsi que M1 se lie de façon sélective aux histones H2A, H2B, H3 et H4, et beaucoup plus faiblement à H1.

Partant de tous les travaux précédemment cités, nous avons voulu comprendre plus en détail le mécanisme d'interaction des vRNPs et de M1 avec la chromatine. Plus précisément, puisque les travaux cités précédemment ont montré l'interaction des vRNPs et de M1 avec la chromatine, nous nous sommes interrogés sur les sites de fixation de ces deux molécules sur la chromatine. Notre hypothèse de travail était la suivante : les vRNPs seraient étroitement associées à la chromatine pour être proches des sites de transcription (vol des coiffes), puis, les vRNPs amplifiées devant sortir du noyau en fin de cycle, M1 les décrocherait en se fixant à son tour à la chromatine de façon compétitive aux vRNPs. Ensuite, M1, en association avec NEP (voir chapitre suivant sur l'export nucléaire des vRNPs) permettrait l'export des vRNPs via l'exportine cellulaire CRM1. Avant l'article Garcia-Robles *et al.*, (2005), je commencerai par présenter les résultats que nous avons obtenus. Après l'article, je reprendrais les principales conclusions que nous en avons tirées.

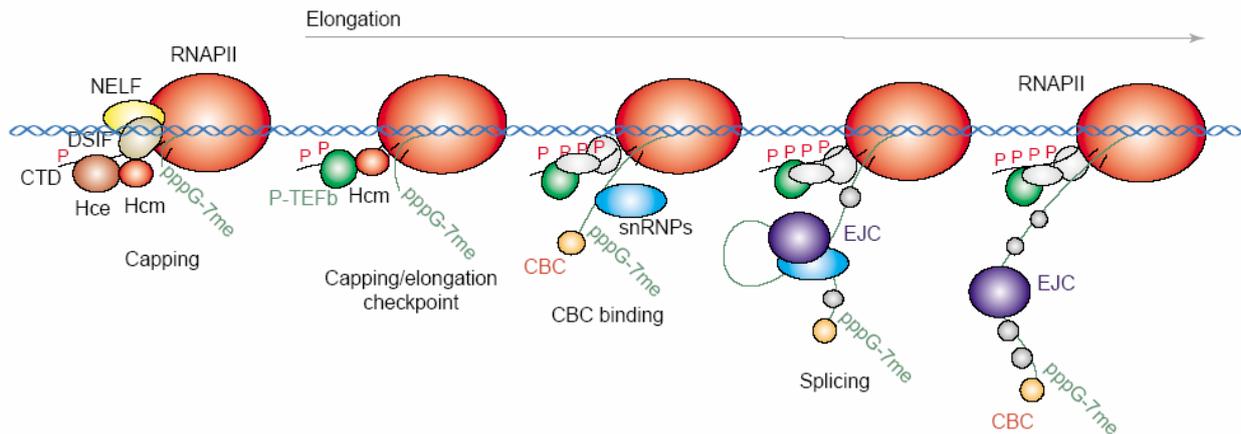


Figure 2.5. Schéma des premières étapes d'assemblage co-transcriptionnel de la mRNP, incluant le coiffage 5', la fixation de CBC (complexe protéique de liaison à la coiffe) et l'assemblage du complexe de jonction des exons (EJC) dépendant de l'épissage (Aguilera, 2005). Après initiation de la transcription et phosphorylation du CTD (domaine C-terminal) de la RNAPII (ARN polymérase II), la transcription est momentanément arrêtée par l'action concertée des facteurs d'élongation NELF et DSIF. Cela permet à la guanyltransférase (Hce) et la méthyltransférase (Hcm) de coiffer l'extrémité 5' du pré-ARNm dès que celui-ci émerge de la RNAPII. La machinerie de coiffage est ensuite enlevée pour permettre au facteur d'élongation P-TEFb d'avoir accès au CTD de RNAPII. Il s'ensuit une phosphorylation massive du CTD et une élongation de l'ARNm. C'est à cette étape que des contrôles-qualité sont effectués pour éviter une élongation des ARNm incorrectement coiffés. Dès que le premier intron est transcrit, la machinerie d'épissage des snRNPs (petites ribonucléoprotéines nucléaires) est recrutée au niveau de l'intron et l'EJC (complexe de jonction des exons) est assemblé au niveau de la jonction exon-exon résultante.

Nos résultats, présentés dans l'article qui suit (Garcia-Robles *et al.*, 2005), indiquent que les vRNPs interagissent avec les composants de la chromatine, en accord avec les travaux de Zhirnov et Klenk (1997). Nous y montrons ainsi que les vRNPs, qui sédimentent sur un coussin de glycérol 40 %, entraînent avec elles les nucléosomes purifiés à partir de noyaux de Xénope (les nucléosomes ne peuvent pas sédimerter sur le coussin de glycérol 40 %). De même, les vRNPs entraînent aussi les octamères d'histones recombinantes en sédimentation sur coussin de glycérol 20 % (les octamères ne peuvent pas sédimerter sur le coussin de glycérol 20 %). Les tests de sédimentation sur du glycérol 20 % des vRNPs avec les différentes histones séparément indiquent que les vRNPs reconnaissent les histones de cœur et non l'histone de liaison H1. Les informations supplémentaires que nos travaux apportent, entre autres, par rapport à ceux de Zhirnov et Klenk (1997) est la localisation des sites de liaison des vRNPs sur les histones. En effet, la protéolyse des nucléosomes avec de la trypsine

supprime l'interaction des vRNPs avec ces derniers, suggérant de ce fait que les vRNPs reconnaissent les queues des histones de l'octamère.

Par ailleurs, nous avons pu montrer que NP serait le composant des vRNPs impliqué dans la liaison aux queues des histones. Nous obtenons effectivement les mêmes résultats pour NP seule purifiée à partir des vRNPs que les vRNPs. Il faut noter que nous pouvons utiliser la NP seule pour faire de la sédimentation sur du glycérol car elle forme des polymères qui ne peuvent être distinguées des vRNPs natives (Ruigrok et Baudin, 1995).

La M1 recombinante, comme la M1 virale utilisée par Zhirnov et Klenk (1997), se lie aux nucléosomes. Nous avons pu préciser le site d'interaction de M1 sur les nucléosomes par la technique de sédimentation sur du glycérol 20 % où seuls les nucléosomes peuvent sédimenter. Dans nos tests d'interaction de M1 par sédimentation, nous avons utilisé les nucléosomes uniquement car les histones ou les octamères d'histones, tout comme M1, ne sédimenter pas (contrairement aux nucléosomes, à NP et aux vRNPs). Nous ne pouvons donc pas dire, sur la base de nos résultats uniquement, sur quel(s) composant(s) du nucléosome se fixe M1. Cependant, les expériences de Zhirnov et Klenk (1997) d'immunorévélation sur des extraits protéiques de cellules infectées indiquent que M1 se lie sur les histones des octamères (et non à l'ADN des nucléosomes).

Contrairement à nos attentes, nous avons ainsi observé que M1 se fixait sur les nucléosomes, indépendamment des queues des histones, puisque la protéolyse de ces queues à la trypsine ne supprime pas l'interaction M1/nucléosomes. Or notre hypothèse de départ était que M1, exprimée tardivement, s'accumulait dans le noyau et entraînait en compétition avec les vRNPs sur la chromatine, permettant ainsi leur décrochage. Nos résultats montrent au contraire que les vRNPs et M1 se fixent sur des sites différents des histones.

La mutation du motif NLS ($_{101}\text{RKLKR}_{105}$), plus celle des résidus K95 et K98 de M1 conduit à la perte de l'interaction de M1 avec les nucléosomes. Or, la répartition des charges à la surface du domaine [1-164] de M1 dont la structure a été résolue (Sha et Luo, 1997 ; Arzt *et al.*, 2001) montre que ce domaine possède une face chargée négativement, et une autre très basique (**Figure 2.3**). La formation de cette face basique est liée au NLS, plus aux résidus K95, K98, R134, R76, R77, K47, R49, K57, R78 et R72 qui contribuent à la continuité des charges positives (Arzt *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent donc que M1 interagissait avec les nucléosomes par la face positive de son domaine N-terminal. On peut ainsi imaginer que les molécules de M1 s'agglutinent sur la chromatine et que, malgré des sites de fixation différents

entre M1 et les vRNPs sur les histones, l'environnement électrostatique local est modifié par M1. Ce phénomène conduirait à terme au détachement des vRNPs de la matrice nucléaire.

Un autre résultat surprenant est que le domaine N-terminal de M1 (résidus 1 à 164, qui possède donc toujours le motif NLS) ne se lie plus aux nucléosomes. Le domaine [165-252] de M1 ne se lie pas non plus aux nucléosomes. Ces résultats, en accord avec ceux de [Zhirnov et Klenk \(1997\)](#), indiquent que seule la forme entière de M1 est indispensable pour sa fixation aux octamères d'histones.

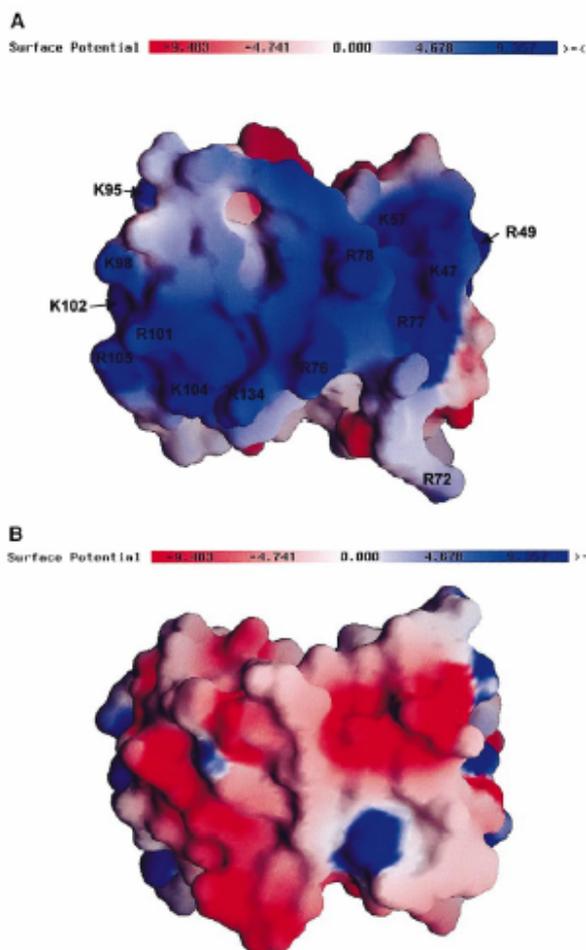


Figure 2.3. Potentiel de surface du monomère de M1 (résidus 2 à 158) à pH 7.0 ([Arzt et al., 2001](#)). Les acides aminés chargés positivement sont indiqués en (A) et la surface chargée négativement sur le côté opposé (rotation de 180°) est présentée en (B).

B) Article « Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes » [Garcia-Robles et al., 2005](#).

C) Conclusions et perspectives

Ainsi nos résultats ([Garcia-Robles *et al.*, 2005](#)) et ceux de [Zhirnov et Klenk \(1997\)](#), montrent la nécessité d'une M1 sous sa forme entière dans une interaction avec un partenaire, en l'occurrence les histones. On voit ainsi l'importance de la structure de M1 entière et/ou de sa région charnière entre les domaines N-terminal [1-164] et C-terminal [165-252]. Toutes les études menées jusqu'à présent sur les domaines N-terminal [1-164] et C-terminal [165-252] de M1 indiquaient les fonctions de chacun d'entre eux, séparément : le domaine C-terminal, exprimé seul, se lie aux vRNPs dans les expériences de sédimentation ([Baudin *et al.*, 2001](#)) ; le domaine N-terminal, exprimé seul, se lie aux membranes lipidiques ([Ruigrok *et al.*, 2000](#) ; [Baudin *et al.*, 2001](#)) et à NEP ([Akarsu *et al.*, 2003](#)). Mais en ce qui concerne la liaison à la chromatine, c'est la forme entière de M1 qui serait nécessaire ([Garcia-Robles *et al.*, 2005](#) ; [Zhirnov et Klenk, 1997](#)).

En se basant sur les prédictions de structure secondaires, combinées à la structure cristallographique du domaine [1-164] stable de M1 (**Figures 2.8 et 2.9 dans Introduction**), on pourrait imaginer l'hypothèse suivante pour expliquer le fait que la protéine M1 entière soit requise pour se lier aux histones. En effet, nos résultats montrent que le motif NLS de M1 (K95K98-₁₀₁RKxKR₁₀₅), localisé dans le domaine N-terminal, est important dans la liaison de M1 entière au domaine globulaire des histones ([Garcia-Robles *et al.*, 2005](#)). On pourrait imaginer que ces résidus ne sont pas directement impliqués dans la liaison aux histones mais qu'ils sont importants dans la conformation tridimensionnelle de la protéine M1. Cette conformation de la protéine M1 pourrait être régulée en fonction du pH et de la présence de ses différents partenaires comme les histones, les vRNPs et NEP (voir le chapitre suivant sur l'export nucléaire des vRNPs). Il se peut également que la région charnière située entre les résidus 148 et 162 (**Figure 2.7 dans Introduction**) joue un rôle dans le positionnement des domaines N-terminal et C-terminal. Il serait intéressant de muter les cystéines et/ou histidines du motif hypothétique du doigt de zinc pour voir les effets sur la liaison aux histones. La structure résolue de M1 ne concernant que les résidus 2 à 158, seule la structure cristallographique de M1 entière pourrait nous donner plus d'informations.

Même si nos résultats sont extrêmement intéressants, il est difficile d'en tirer des conclusions. La fonction exacte de M1 dans le noyau au niveau de la chromatine reste encore à déterminer avec précision.

Il est cependant très tentant de formuler certaines hypothèses en ce qui concerne le mode de liaison de M1 à la chromatine. Il a été proposé que M1 posséderait un motif en doigt de zinc au niveau des résidus 148 à 162 (Wakefield et Brownlee, 1989) (Figure 2.4), justement au niveau de cette charnière entre les domaines N-terminal et C-terminal. Mais l'existence de ce motif n'a jamais été réellement prouvée.

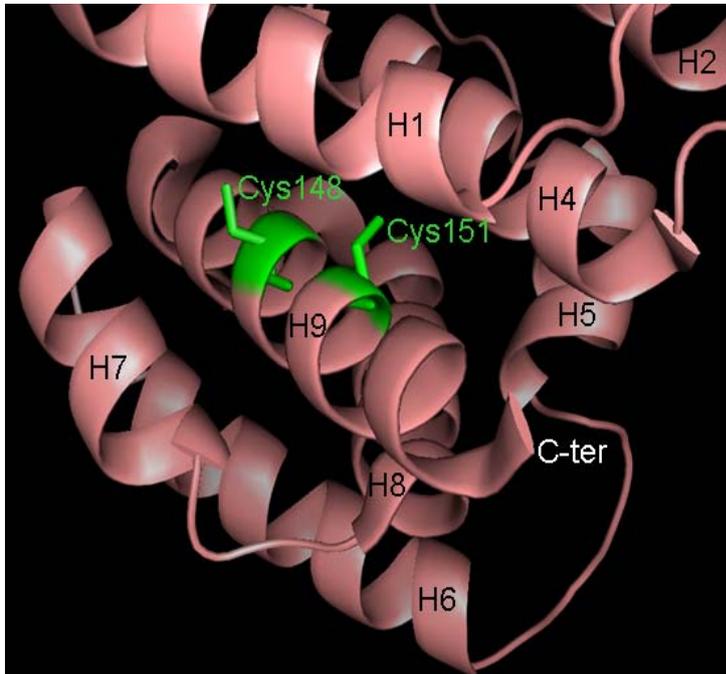


Figure 2.4. Vue des deux cystéines (C148 et C151) appartenant au motif hypothétique du doigt de zinc de M1 (${}_{148}\text{CATCEQIADSQHRSH}_{162}$) dans l'hélice 9 (H9) (code PDB : 1EA3). Représentation faite avec le programme Pymol (développé par DeLano Scientific LLC).

Il faut aussi noter que M1 serait susceptible d'être phosphorylée (Gregoriades *et al.*, 1990) et sa localisation intracellulaire - et donc potentiellement sa fonction - serait modifiée en fonction de son état de phosphorylation : une hyperphosphorylation de M1 entraîne sa rétention nucléaire (Whittaker *et al.*, 1995). Mais on ne sait pas quand a lieu cette phosphorylation dans le cycle d'infection, ni pourquoi. La M1 utilisée par Zhirnov et Klenk (1997) est purifiée à partir de vRNPs de virus entiers, alors que la nôtre est exprimée chez *E.coli* (Garcia-Robles *et al.*, 2005), donc sans phosphorylation. Dans les deux cas, on obtient les mêmes résultats de liaison aux histones. Soit la phosphorylation de M1 n'est pas impliquée dans la liaison à la chromatine, soit M1 associée aux vRNPs dans le virion n'est pas phosphorylée.

Nos résultats montrent que M1 et les vRNPs n'entrent pas en compétition dans la fixation à la chromatine. M1 et les vRNPs se lient sur des éléments de la chromatine, mais à des sites différents. Les vRNPs, via la NP, reconnaissent les queues des histones dans les

nucléosomes, alors que M1 semble plutôt se fixer sur les histones de cœur du nucléosome. Or, notre hypothèse de départ était que M1 s'accumulait en phase tardive dans le noyau et s'agglutinait sur la chromatine pour décrocher les vRNPs et permettre leur export nucléaire. On peut imaginer que la fixation de M1 sur la chromatine joue effectivement un rôle dans la dissociation des vRNPs de la chromatine, mais de façon indirecte peut-être, en recrutant d'autres facteurs (cellulaires, viraux ?) à ce niveau. Ou encore, ainsi que je l'ai déjà dit auparavant, l'agglutination des molécules de M1 sur la chromatine conduirait à des modifications de charges défavorables à la liaison des vRNPs avec la chromatine. On peut dans ce cas s'interroger sur l'intérêt de deux sites de fixation différents entre M1 et les vRNPs. Par ailleurs, NP est une protéine basique (pI supérieur à 9), tout comme les queues des histones qui sont riches en acides aminés chargés positivement : comment l'interaction est-elle donc possible alors que les charges électrostatiques semblent défavorables ? L'interaction des vRNPs et de NP est conservée dans le cas des histones recombinantes, ce qui suggère que cette interaction n'est pas liée aux modifications post-traductionnelles des queues d'histones. Peut-être n'arrivons nous pas à avoir suffisamment d'agglutination des molécules de M1 sur les histones pour décrocher les vRNPs, pour différentes raisons (composition du tampon, pH, concentration des sels, autres facteurs cellulaires ou viraux ?). Ou bien, la fonction de M1 au niveau de la chromatine n'est absolument pas celle que nous pensons être et la dissociation des vRNPs dépend d'autres facteurs.

En résumé, les vRNPs ont peut-être besoin d'être localisées au niveau de la chromatine, probablement au niveau des zones actives transcriptionnellement, pour cliver les coiffes 5' des pré-ARNm cellulaires avant que ceux-ci ne soient recouverts de différentes protéines de modifications des ARNm (CBC, EJC...) et qu'ils ne soient pris en charge par le système d'export nucléaire. Contrairement à nos attentes, M1 n'entre pas en compétition avec les vRNPs pour la fixation sur la chromatine. Quel est donc le rôle exact de M1 sur la chromatine ? Comment les vRNPs sont-elles décrochées de la chromatine pour pouvoir ensuite sortir du noyau ?

On ne sait donc toujours pas ce qui se passe dans le noyau, en termes de remodelage de la chromatine et de ré-organisation du noyau, durant l'infection par le virus de la grippe. En revanche, le génome viral une fois amplifié, sa prise en charge par le complexe d'export M1/NEP/CRM1-RanGTP semble être un mécanisme un peu mieux élucidé.

3 - ETUDE DES PROTÉINES VIRALES IMPLIQUÉES DANS L'EXPORT NUCLEAIRE DES vRNPs

A) Généralités

Les virus qui possèdent une étape nucléaire dans leur cycle d'infection ont mis au point diverses stratégies pour ressortir du noyau. Ils empruntent en général le NPC via des interactions spécifiques avec des exportines cellulaires (CRM1) ou des nucléoporines, interactions qui peuvent être directes (oncovirus) ou médiées par des adaptateurs (NEP pour la grippe, Rev pour le VIH-1) (**Figure 3.1**). Il faut cependant noter la sortie très singulière des Herpesvirus. Leur capsides sont assemblées dans le noyau et sont beaucoup trop grosses (120 nm) pour le canal du NPC. Les hypothèses couramment proposées pour décrire l'export nucléaire des Herpesvirus sont basées sur un transport des capsides virales au travers du système de Golgi après un bourgeonnement dans le lumen nucléaire.

En ce qui concerne le virus de la grippe, son génome une fois transcrit et amplifié, il doit ressortir du noyau pour être encapsidé au niveau de la membrane plasmique. Il est bien établi maintenant que les génome du virus de la grippe emprunte le système d'export nucléaire de la cellule: CRM1/RanGTP (Elton *et al.*, 2001 ; Ma *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2001). En présence de leptomycine B, l'export des vRNPs est bloquée, ce qui indique donc que les vRNPs empruntent CRM1 pour leur sortie.

Ce qui est moins clair en revanche, c'est le mode d'interaction entre les vRNPs et l'exportine. Différents travaux montrent NEP comme l'adaptateur qui reconnaît CRM1 (O'Neill *et al.*, 1998 ; Neumann *et al.*, 2000 ; Akarsu *et al.*, 2003). La sortie des vRNPs serait par ailleurs finement régulée par l'interaction de cet adaptateur NEP avec M1 qui fixerait à son tour les vRNPs.

Cette partie sera essentiellement présentée sous forme d'article, précédé d'une petite introduction sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles accumulées à ce jour sur les deux acteurs essentiels dans cet export : M1 et NEP.

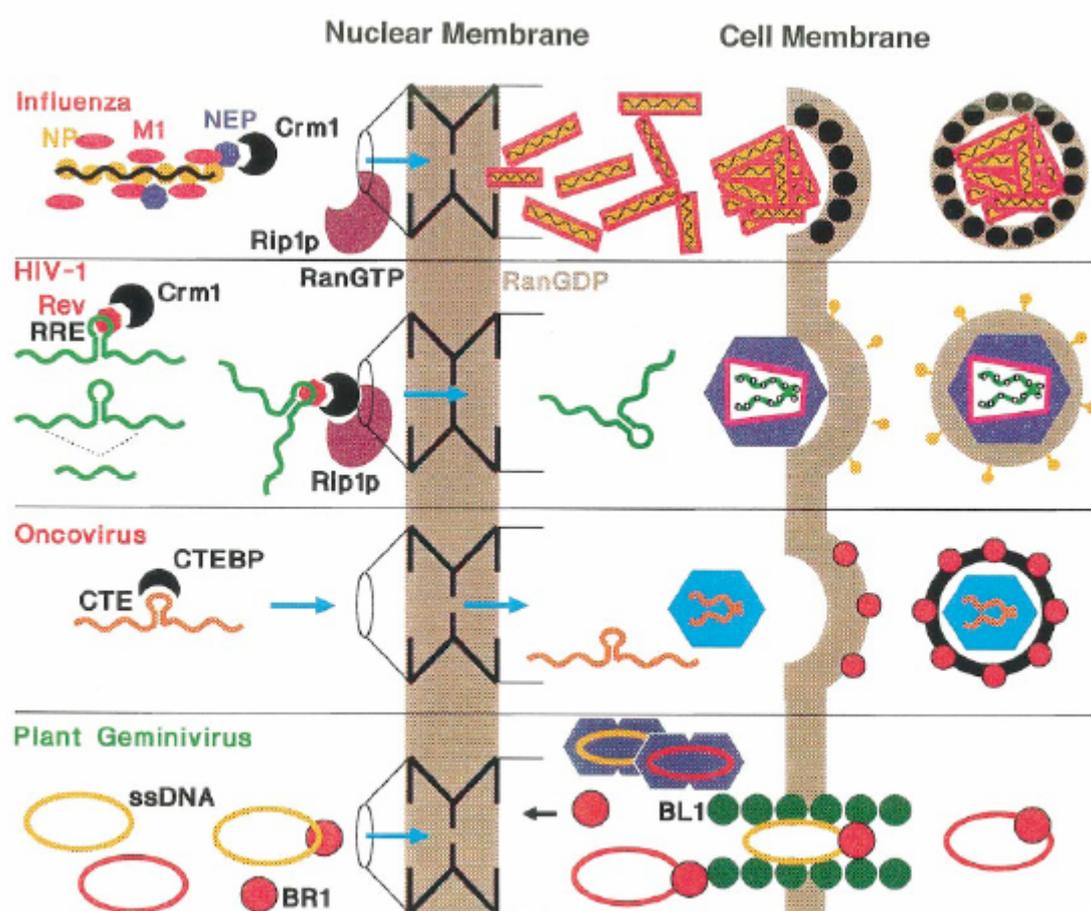


Figure 3.1. Export nucléaire de quelques génomes viraux (Izaurre et al., 1999, revue). Les nucléocapsides du virus de la grippe sont exportées du noyau grâce aux protéines virales M1 et NEP. NEP interagit avec CRM1 via son NES, M1 se lie à NEP, et NP se lie à M1. L'ARN génomique du VIH-1 est exporté grâce à la protéine virale Rev qui a un site de fixation spécifique sur le motif RRE des ARN viraux non épissés et un NES pour se lier à CRM1. En revanche, beaucoup d'oncovirus (rétrovirus) ont un élément de transport constitutif (CTE) dans la séquence de leur ARN leur permettant d'interagir directement avec des protéines comme CRM1. Le geminivirus de plante possède deux protéines virales impliquées dans le transport de son génome : BR1 qui est une protéine navette entre le noyau et le cytoplasme, alors que BL1, associée aux structures tubulaires traversant la paroi cellulaire, capture le génome viral complexé à BR1 et le guide d'une cellule vers l'autre.

B) Présentation succincte des acteurs clés dans l'export nucléaire des vRNPs : M1 et NEP

La protéine matricielle M1. M1 a été présentée dans la partie Introduction. Brièvement, M1 aurait une fonction régulatrice de la localisation intracellulaire des vRNPs (Martin et Helenius, 1991 ; Whittaker et al., 1996). En début d'infection, les vRNPs « premières » (c'est-à-dire celles provenant du virion de départ) sont dépourvues de M1,

condition indispensable pour leur import nucléaire. En revanche, en fin de cycle, lorsque les vRNPs nouvellement produites sortent du noyau, elles sont fixées à une ou plusieurs molécules de M1 qui joue un rôle primordial dans cet export. L'ensemble sort par le pore nucléaire en utilisant le transporteur CRM1 (Elton *et al.*, 2001 ; Ma *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2001).

La protéine d'export nucléaire NEP. Les prédictions de structures secondaires (PhD sur ExPasy) indiquent que NEP est une protéine qui comporterait quatre hélices (**Figure 3.2**). Nous avons essayé de cristalliser NEP entière en utilisant les différents screens Hampton disponibles (Crystal Screen I, Crystal Screen II, Screen Lite, PEG-Ion...), en gouttes suspendues (1 µl de protéine + 1 µl de tampon de cristallisation) à 20°C. Nous avons également utilisé par la suite le robot de cristallisation de l'EMBL (200 nl d'échantillon par goutte assise). Nous avons testé des concentrations de protéine allant de 1 mg/ml à 20 mg/ml. Aucune de ces nombreuses conditions n'a donné de cristaux.

Les essais de cristallogénèse sur NEP entière n'ayant pas abouti, nous avons fait une protéolyse limitée de NEP avec de l'élastase : on obtient un domaine stable correspondant au domaine C-terminal [54-116] (Akarsu *et al.*, 2003). Nous avons cloné et exprimé ce domaine, mais il n'a pas donné de cristaux non plus.

En revanche, la protéine NEP [54-116] digérée à la subtilisine a conduit au fragment [59-116] (déterminé par séquençage N-terminal et spectrométrie de masse), qui, en gouttes suspendues manuelles (1 µl de protéine à 20 mg/ml + 1 µl de tampon de screen Hampton), a cristallisé sous la forme de très beaux cristaux, lors de nos essais de co-cristallisation avec M1 [1-164] (**Figure 3.2**). La condition qui a permis la cristallisation de NEP [59-116] est l'ammonium di-phosphate 0.4 M à pH 4.0. Les cristaux de NEP [59-116] sont longs de plusieurs centaines de micromètres et larges d'environ 40 µm (ils sont visibles à l'œil nu). La section des cristaux est de forme hexaédrique.

Le mode d'interaction de NEP avec CRM1 a fait l'objet de plusieurs études (O'Neill *et al.*, 1998 ; Neumann *et al.*, 2000 ; Paragas *et al.*, 2001 ; Iwatsuki-Hiromoto *et al.*, 2004). On sait que la leptomycine B empêche l'export des vRNPs (Elton *et al.*, 2001 ; Ma *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2001), son mode d'inhibition se faisant par fixation covalente sur une cystéine adjacente aux résidus de CRM1 reconnus par les NES (Petosa *et al.*, 2004). On observe par ailleurs que les résidus [1-54] de NEP se fixent à CRM1, contrairement au domaine C-terminal de NEP (acides aminés 54-116) (Akarsu *et al.*, 2003). En effet, NEP

possède en son domaine N-terminal un motif NES $_{12}ILMRMSKMQL_{21}$ (pour la souche A/WSN/33, la M14 est remplacée par une leucine dans la souche A/PR/8/34), motif qui est impliqué dans l'interaction avec CRM1.

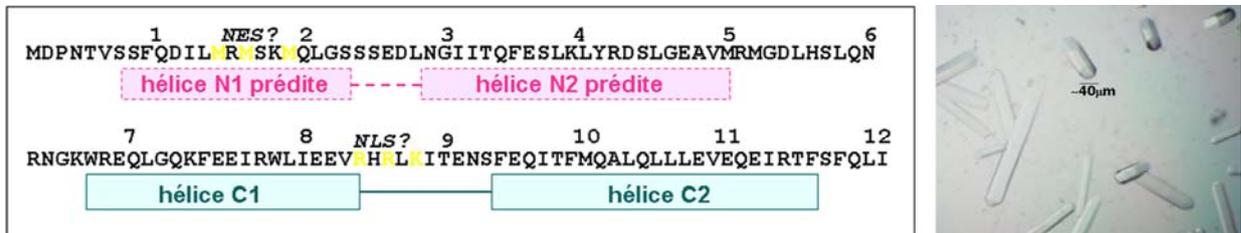


Figure 3.2. Les structures secondaires de NEP, prédites (N-terminal) et cristallisées (C-terminal). NEP est composée de 4 hélices, dont deux ont pu être cristallisées, lors de nos essais de co-cristallisation de NEP [59-116] avec M1 [1-164]. La première hélice prédite du côté N-terminal (N1) comporterait le motif NES de NEP (résidus 12 à 21, en jaune). Les deux hélices C1 et C2 du côté C-terminal (bleu) donnent des cristaux en forme de longs bâtonnets de section hexaédrique dans l'ammonium di-phosphate pH 4.0 (protéine à 20 mg/ml). La boucle entre les deux hélices C1 et C2 pourrait comporter un NLS (R84 à R88, en jaune) mais l'existence de celui-ci n'a jamais été démontrée.

Principes de nos expériences. Nos tests d'interaction sont essentiellement basés sur deux expériences : l'activité enzymatique de CRM1-RanGTP et les tests d'interaction sur billes d'agarose magnétiques.

Dans la première, on utilise du GTP radioactif. En présence du cargo portant le NES (en l'occurrence NEP), RanGTP est liée à CRM1 qui empêche ainsi l'hydrolyse du GTP par RanGAP (**Figure 3.3**). En absence de cargo, le GTP est hydrolysé par RanGAP, libérant dans le milieu du phosphate 32 que l'on détecte.

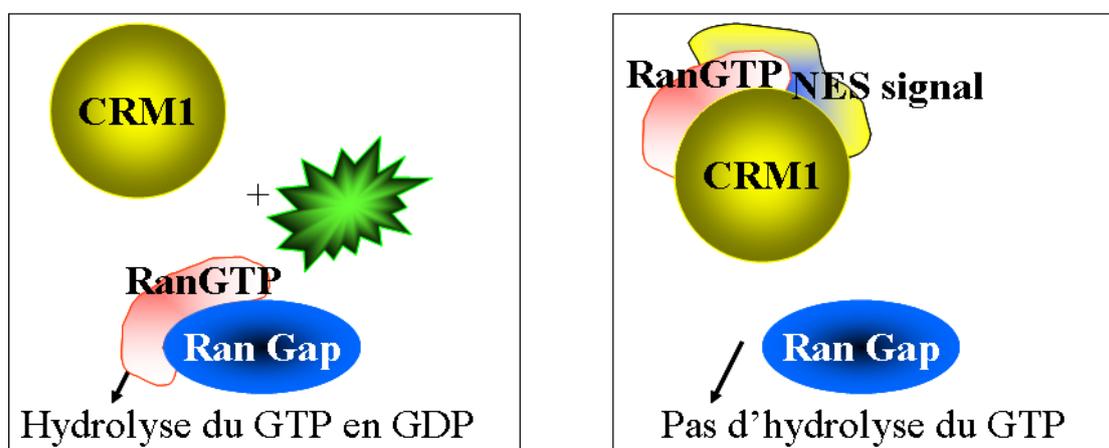


Figure 3.3. Test enzymatique d'interaction avec CRM1

Pour caractériser les domaines d'interaction entre NEP et M1, on effectue des interactions sur billes d'agarose magnétiques couplées à du nickel (**Figure 3.4**). NEP possède en N-terminal une séquence de dix histidines, alors que M1 non. NEP est fixée sur les billes, M1 est ajoutée en quantités croissantes et l'on regarde si M1 est éluée avec NEP. En parallèle, on fait des contrôles négatifs où M1 est incubée seule avec les billes, pour être sûr qu'elle n'interagit pas de manière aspécifique avec les billes.

Les résultats des ces expériences d'interaction entre M1 et NEP sont présentés dans l'article qui suit.

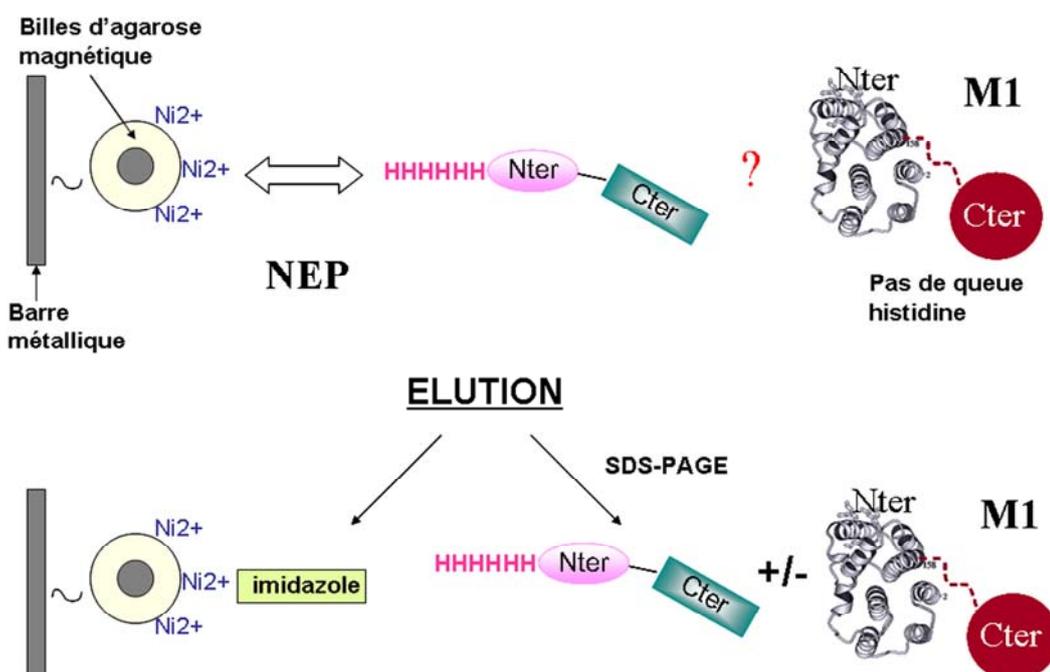


Figure 3.4. Principe du test d'interaction sur billes.

C) Article « Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2) » [Akarsu et al., 2003](#).

D) Conclusions sur les résultats présentés dans l'article [Akarsu et al., 2003](#).

Structure de NEP. NEP [59-116], d'un poids moléculaire apparent d'environ 7 kDa, se présente sous la forme d'un dimère dans le cristal. Les expériences de pontage covalent (EGS) et de chromatographie par filtration sur gel (Superdex 75) montrent que le domaine C-terminal de NEP est aussi un dimère en solution (poids moléculaire apparent d'environ 14 kDa). En revanche, NEP entière (14 kDa) est un monomère d'après ces mêmes expériences en solution. Au vu de ces résultats sur l'état d'oligomérisation de NEP entière et du domaine C-

terminal de NEP en solution, des prédictions de structures secondaires qui indiquent la présence de quatre hélices dans NEP entière et de la structure cristallographique de NEP [59-116], on peut faire des hypothèses quant à la structure tridimensionnelle de NEP entière.

Le monomère de NEP [59-116] est composé de toute une face hydrophobe qui est masquée par la dimérisation. Dans la forme entière de NEP, cette face hydrophobe des hélices C1 et C2 peut être masquée par les hélices N1 et N2 qui viendraient se positionner en face des hélices C1 et C2. De cette façon, NEP entière reste un monomère globulaire, le couple des hélices N1/N2 (ou seulement N2) faisant face au couple C1/C2 (**Figure 3.5**).

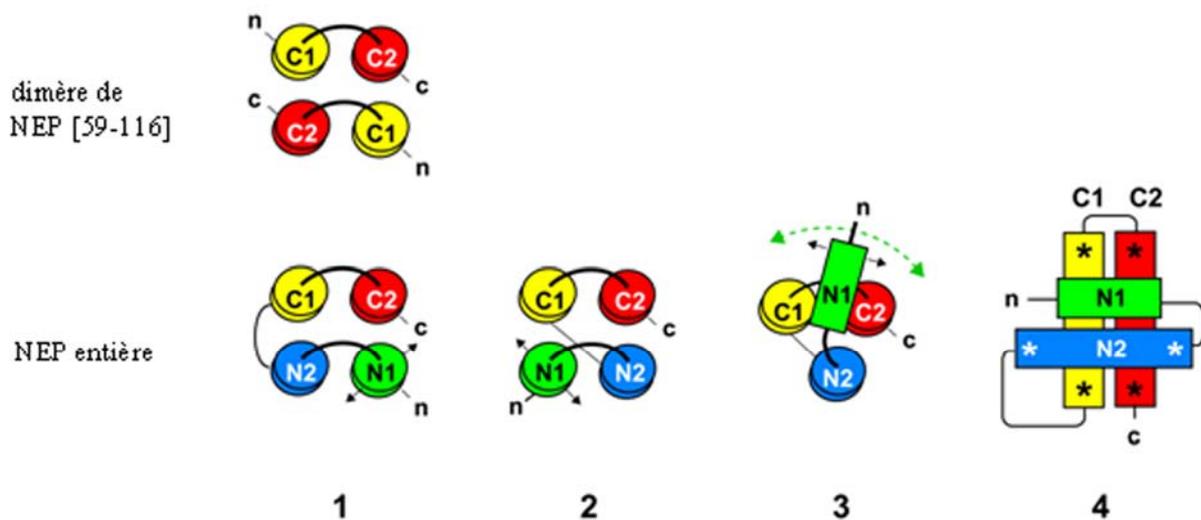


Figure 3.5. Hypothèses sur l'agencement des quatre hélices de NEP entière.

La sensibilité des hélices N1 et N2 à la protéolyse limitée à l'élastase suggère que le domaine N-terminal est plus flexible et moins compact que le domaine C-terminal. Le fait que nous n'ayons pas pu cristalliser NEP entière à ce jour renforce cette hypothèse.

En ce qui concerne le positionnement précis des hélices N1 et N2 face aux hélices C1 et C2 de structure connue, on peut imaginer différents arrangements comme cela est représenté dans la figure ci-dessus (**Figure 3.5**). L'hypothèse la plus probable pourrait être l'arrangement des hélices proposé en (1) : c'est la conformation la plus proche de la structure du dimère de NEP [59-116]. En ce qui concerne les arrangements (2) et (4), les longueurs des boucles prédites (voir **Figure 3.2**) entre les hélices pourraient être insuffisantes pour permettre de telles orientations. L'arrangement des hélices N-terminales proposé en (3) ne semble pas permettre le camouflagement des résidus hydrophobes des hélices C-terminales.

NEP et M1 sont des protéines adaptatrices entre les vRNPs et l'exportine CRM1.

Les expériences faites *in vitro* dans notre laboratoire montrent que le domaine C-terminal de M1 se lie aux vRNPs, et son NLS en N-terminal se fixe au domaine [54-116] de NEP (Akarsu *et al.*, 2003). Ce complexe est ensuite capable de reconnaître CRM1, le récepteur cellulaire pour les cargos contenant un NES, à travers le domaine [1-54] de NEP. Aucune interaction n'est détectable entre NEP et les vRNPs, suggérant que M1 et NEP forment en quelque sorte un pont entre le génome viral et le système d'export cellulaire.

NEP a été découverte il y a 25 ans déjà, mais son rôle précis dans l'infection virale ne commence à être compris que depuis peu. Avec M1, NEP est un acteur clef dans l'export nucléaire des vRNPs nouvellement synthétisées en phase tardive de cycle viral (Akarsu *et al.*, 2003 ; Neumann *et al.*, 2000 ; O'Neill *et al.*, 1998). Les vRNPs du virus de la grippe empruntent la voie d'export nucléaire de CRM1 (Elton *et al.*, 2001 ; Ma *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2001) et c'est NEP qui est reconnue par CRM1 et permet ainsi aux vRNPs virales d'emprunter la voie de sortie du noyau. On obtient ainsi un modèle où NEP et M1 forment un pont entre les vRNPs et CRM1 (Figure 3.6).

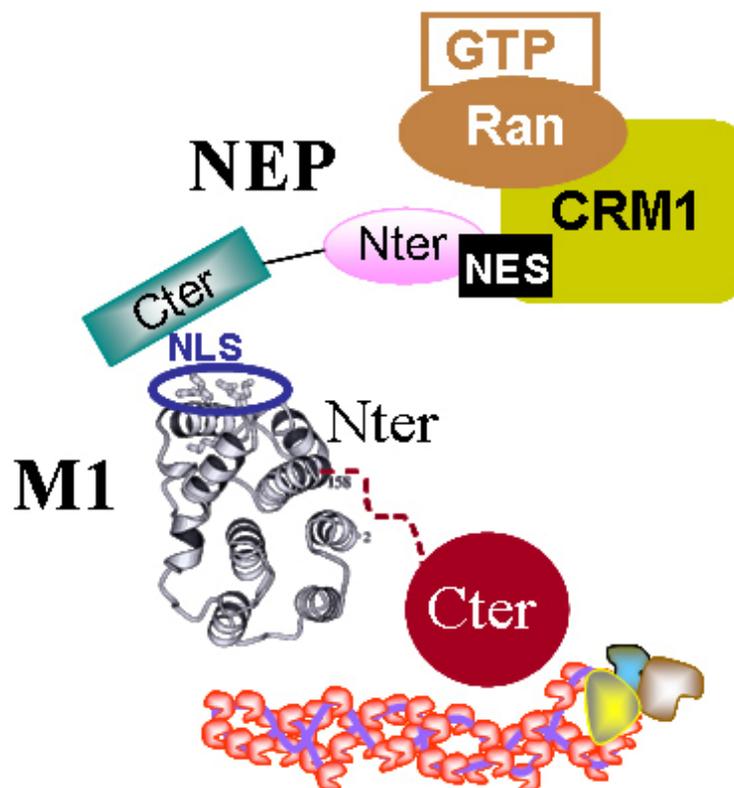


Figure 3.6. Modèle d'export des vRNPs du virus de la grippe. Le domaine C-terminal de M1 fixe les vRNPs, alors que le domaine N-terminal, via le NLS, fixe le W78 en C-terminal de NEP. En retour, le domaine N-terminale de NEP se lie à CRM1, et l'ensemble sort du noyau à travers le NPC. Il semblerait que plusieurs complexes CRM1/NEP/M1 lieraient une seule vRNP.

Des travaux de mutagenèse dirigée sur le NES de NEP (Iwatsuki-Hiromoto *et al.*, 2004) indiquent que la séquence en acides aminés du NES est flexible : le remplacement d'un des résidus du NES par un autre résidu hydrophobe ne supprime pas la liaison à CRM1, mais peut en revanche réduire la croissance virale (et la virulence de la souche par ailleurs). Cela serait probablement dû à la diminution de l'affinité de NEP pour CRM1, et donc la stabilité du complexe d'export NEP/CRM1-RanGTP. En revanche, le remplacement simultané de trois résidus hydrophobes du NES ne permet pas la viabilité du virus, bien que la liaison de NEP à CRM1 soit toujours conservée.

Si l'on veut faire un comparatif avec les autres virus de la grippe, des travaux récents montrent que l'export nucléaire des vRNPs chez les virus de la grippe B et C dépend aussi de NEP qui reconnaît CRM1 (Paragas *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'alignement des prédictions de structures secondaires des NEP des gripes A et B montrent une conservation dans la nature chimique des résidus dans presque toutes positions, suggérant une structure tertiaire commune (Akarsu *et al.*, 2003). La conservation du rôle de NEP dans l'export du génome viral de différents types de virus de la grippe renforce l'hypothèse de l'importance capitale de NEP pour ce virus.

Notre hypothèse en ce qui concerne la présence de deux molécules virales adaptatrices dans la sortie des vRNPs serait la suivante : M1, produite en très grande quantité en phase tardive du cycle viral, se lierait dans le noyau aux vRNPs et aux histones, facilitant la dissociation des vRNPs de la chromatine (via d'autres intermédiaires peut-être), puis l'interaction avec NEP ferait sortir les vRNPs nouvellement synthétisées hors du noyau. La nécessité de deux intermédiaires permettrait une régulation très fine de l'export des vRNPs, empêchant par exemple le ré-import intempestif des vRNPs tout juste exportées. Les résultats sont obtenus à partir d'expériences d'interaction *in vitro* entre les différents partenaires cellulaires et viraux. Nous avons voulu savoir si notre modèle d'export nucléaire des vRNPs pouvait être confirmé par des tests *in vivo* cette fois-ci.

J'ai eu la chance d'obtenir une bourse de courte durée EMBO afin de tester notre modèle avec des expériences *in vivo* dans le laboratoire du Dr Iain Mattaj, à l'EMBL d'Heidelberg, en Allemagne. J'ai ainsi eu l'opportunité d'effectuer des expériences de microinjection dans ovocytes de Xénope.

E) ETUDES *IN VIVO* DU MODELE D'EXPORT DES vRNPs

Nos résultats ayant été obtenus par des méthodes *in vitro*, nous avons voulu vérifier notre modèle d'export nucléaire des vRNPs par des expériences utilisant un système *in vivo* d'export nucléaire eucaryote : le Xénope. Bien que n'étant pas un hôte du virus de la grippe, nous avons choisi ce système pour des raisons purement pratiques : c'est une cellule eucaryote qui possède les protéines de transport nécessaires et on peut injecter directement les protéines virales purifiées dans le noyau des ovocytes, énormes cellules assez facilement manipulables (environ 1 mm de diamètre).

Pour cela, des vRNPs purifiées à partir de virus, en association ou non avec M1 et NEP, sont injectées dans le noyau d'ovocyte de *Xenopus laevis* (**Figure 3.7**). Après 3 heures d'incubation à 19°C, les ovocytes sont disséqués afin de séparer les noyaux et les cytoplasmes. L'équivalent de 3 noyaux ou 3 cytoplasmes est déposé sur SDS-PAGE 10 % Laemmli. On utilise comme contrôle de la bonne injection et dissection des ovocytes, la protéine fusion GST-TAP : elle ne peut pas traverser le NPC par diffusion passive et elle ne comporte aucun signal de transport.

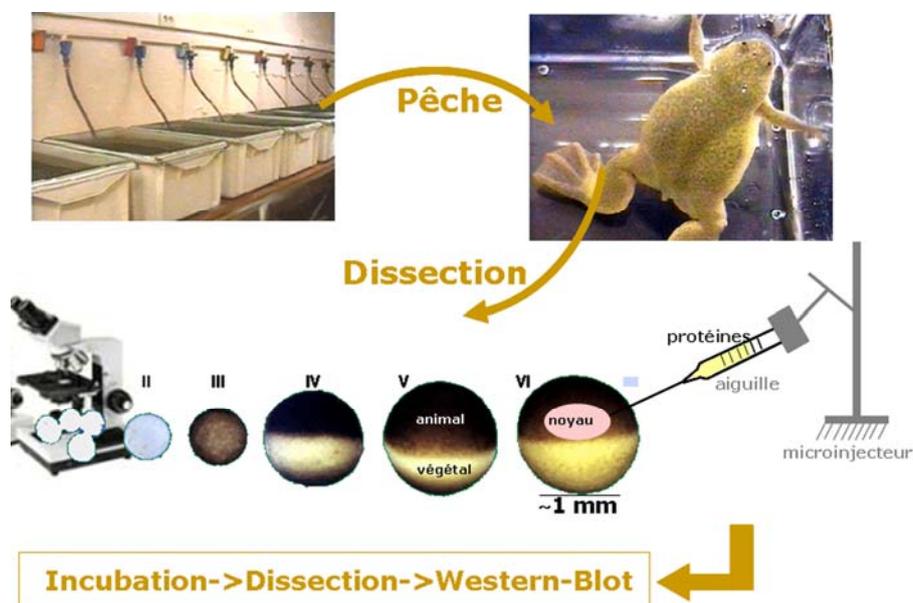


Figure 3.7. Expériences de microinjections de protéines du virus de la grippe dans le noyau d'ovocyte de *Xenopus laevis*. Les sacs d'ovocytes sont prélevés sur de jeunes femelles Xénopes et les ovocytes matures (stades V et VI) sont sélectionnés sous microscopes pour les injections. Après séparation des noyaux des cytoplasmes, la localisation intracellulaire des protéines injectées dans le noyau est déterminée par Western-Blot.

Les vRNPs injectées seules dans le noyau ne sont pas exportées dans le cytoplasme et ne sont détectées que dans le noyau (**Figure 3.8**). M1 et NEP injectées chacune seules dans le noyau sont en revanche présentes dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique après 3 h d'incubation des ovocytes à 19°C.

Cela est cohérent avec le modèle d'export attendu (**Figure 3.6**) : les vRNPs sont trop grosses (plusieurs millions de Da) pour sortir du noyau de manière passive à travers le canal du NPC et n'ont pas les partenaires viraux nécessaires pour utiliser le système d'export actif.

En revanche, NEP (14 kDa) peut sortir du noyau (et y entrer de nouveau) par simple diffusion passive grâce à sa petite taille, et/ou via CRM1 grâce à son NES. M1 (28 kDa), ne pouvant interagir avec CRM1 (aucun motif NES n'a été observé chez M1), sort (et y entre de nouveau) par diffusion passive uniquement.

Il n'est pas exclu que NEP et M1 puissent emprunter d'autres mécanismes d'export nucléaire à travers le NPC que ceux de diffusion passive et de CRM1. Aucune n'étude n'a été rapportée à ce sujet.

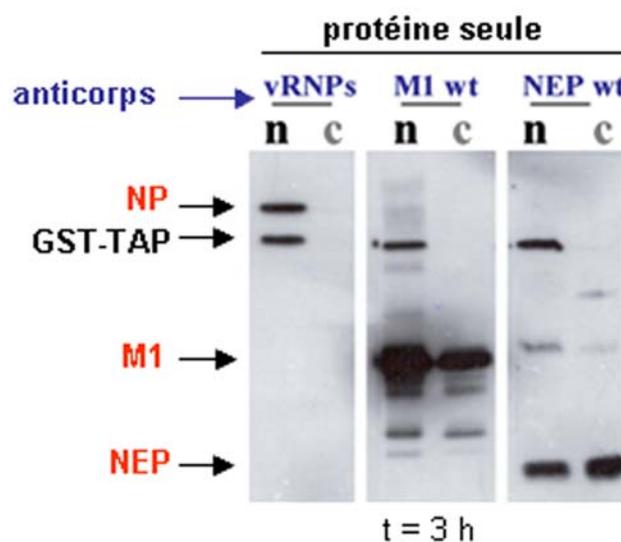


Figure 3.8. Test du modèle d'export nucléaire des vRNPs. Microinjections dans le noyau de vRNPs, M1 et NEP, seules. Les ovocytes et cytoplasmes sont déposés séparément sur SDS-PAGE 10 % Laemmli, suivi d'un Western-Blot. Les protéines virales sont détectées par des anticorps polyclonaux correspondant (anti-M1 et anti-NEP) ; dans le cas des vRNPs, on utilise des anticorps polyclonaux anti-NP. Les vRNPs, injectées seules, restent dans le noyau. En revanche, M1 et NEP sont détectées dans le noyau et le cytoplasme. N = noyau ; C = cytoplasme.

Lorsque tous les partenaires viraux théoriques sont injectés ensemble dans le noyau (vRNP, M1 et NEP), on n'observe toujours aucun export des vRNPs : l'export de M1 et NEP est conservé, mais les vRNPs ne sortent pas du noyau (**Figure 3.9**).

Différentes causes peuvent être évoquées pour expliquer le non export des vRNPs malgré la présence de M1 et NEP. Tout d'abord, on peut penser que le système du Xénope n'est pas adapté pour nos expériences. En effet, le virus de la grippe a un large spectre d'hôtes, mais un cycle d'infection de virus de la grippe dans des cellules de batracien n'a pas été encore mis en évidence. Peut-être d'autres facteurs cellulaires ou viraux, non présents dans le système que nous avons utilisé, sont nécessaires au transport des vRNPs *in vivo*.

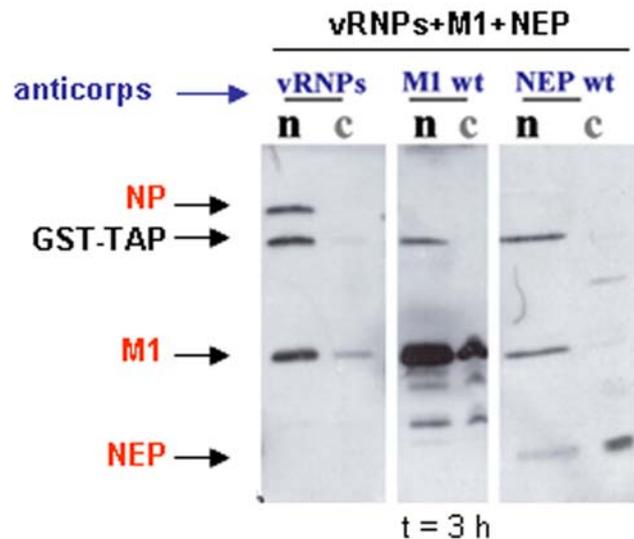


Figure 3.9. Test du modèle d'export nucléaire des vRNPs. Microinjections dans le noyau de vRNPs, M1 et NEP, en mélange. Les ovocytes et cytoplasmes sont déposés séparément sur SDS-PAGE 10 % Laemmli, suivi d'un Western-Blot. Les protéines virales sont détectées par des anticorps polyclonaux correspondant (anti-NP, anti-M1 et anti-NEP). Les vRNPs restent dans le noyau, malgré la co-injection de NEP et M1 avec les vRNPs dans le noyau. En revanche, M1 et NEP sont détectées dans le noyau et le cytoplasme. Remarque : les anticorps polyclonaux anti-NP détectent également la présence de M1 dans le mélange car les vRNPs utilisées pour leur mise au point contenaient probablement encore de la M1 liée. De même pour les anticorps anti-NEP : ils détectent une protéine contaminante de la taille de M1 non éliminée par la purification de NEP. N = noyau ; C = cytoplasme.

Un autre facteur est très important : la température. On sait que le virus de la grippe est sensible à la température, mais on ne sait toujours pas quelles étapes du cycle viral dépendent de la température. Or, les expériences de microinjection dans les ovocytes de Xénope ont été effectuées à 19°C.

Par ailleurs, il se pourrait aussi que les vRNPs ne sortent pas du noyau car elles seraient complètement agglutinées sur la chromatine de l'ovocyte, les quantités de M1 et NEP utilisées n'étant pas suffisante pour les « décrocher ». En effet, on sait que M1 et NEP sont des protéines tardives qui permettent la sortie des vRNPs via CRM1. Or, d'après certains travaux (Bukrinskaya *et al.*, 1979 ; Bui *et al.*, 2000 ; Lopez-Turiso *et al.*, 1990 ; Garcia-

Robles *et al.*, 2005), les vRNPs sont localisées au niveau de la chromatine cellulaire, peut-être pour être plus proches des sites de transcription cellulaire riches en ARNm cellulaires, et donc en coiffes M⁷Gppp. Nous avons vu dans le chapitre précédent que les vRNPs pouvaient interagir avec les histones (Garcia-Robles *et al.*, 2005).

Enfin, il faut noter que les vRNPs utilisées sont purifiées, à partir de virus entiers, par sédimentation sur un gradient de glycérol. Nous ne pouvons pas vérifier la stoechiométrie entre les différents segments de vRNP. Il est très probable que les vRNPs utilisées dans les tests de microinjection proviennent de fractions de sédimentation enrichies en un type de vRNP suivant leur taille. Or, nous ne savons toujours pas comment se fait l'assemblage des vRNPs pour former des virions comportant un set complet de segments génomiques : peut-être les vRNPs sortent-elles du noyau sous forme de set complet.

Les expériences *in vivo* dans le système du Xénope n'ont pas permis de valider *in vivo* notre modèle d'export nucléaire des vRNPs.

Il existe une autre technique appelée la génétique inverse qui pourrait nous donner des résultats plus concluants. Mise au point d'abord dans le laboratoire du professeur P. Palese puis améliorée par l'équipe du Pr Kawaoka, elle permet de produire des virus recombinants qui portent des mutations dans les gènes d'intérêt. Elle est basée sur la transfection des cellules (293T) par un set de plasmides codant pour les protéines virales et les ARN viraux, permettant ainsi d'obtenir des particules virales recombinantes. Deux méthodes ont été développées.

La première est basée sur la transfection des cellules par 8 plasmides codant pour les 8 ARN viraux génomiques, associés à soit 4 plasmides codant pour les 4 ARNm viraux des protéines indispensables à la réplication et la transcription (les trois sous-unités de la polymérase et la NP), soit 8 plasmides codant pour toutes les protéines virales structurales (les trois sous-unités de la polymérase, la NP, M1, M2, NS1 et NS2) (Neumann et Kawaoka, 2002) (Figure 3.10).

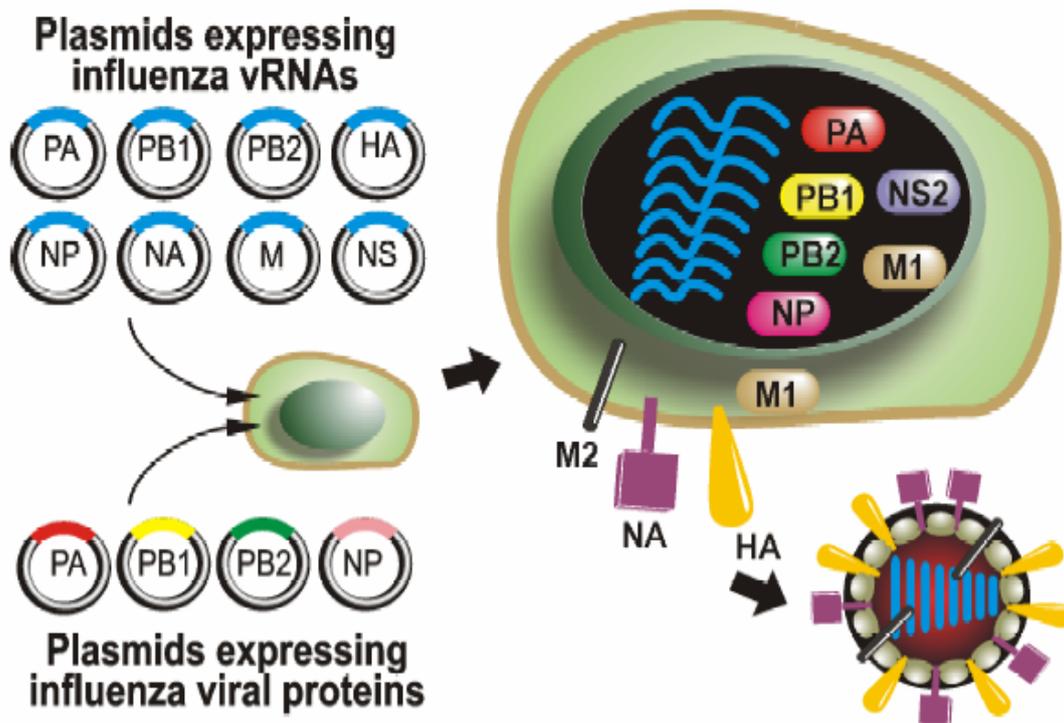
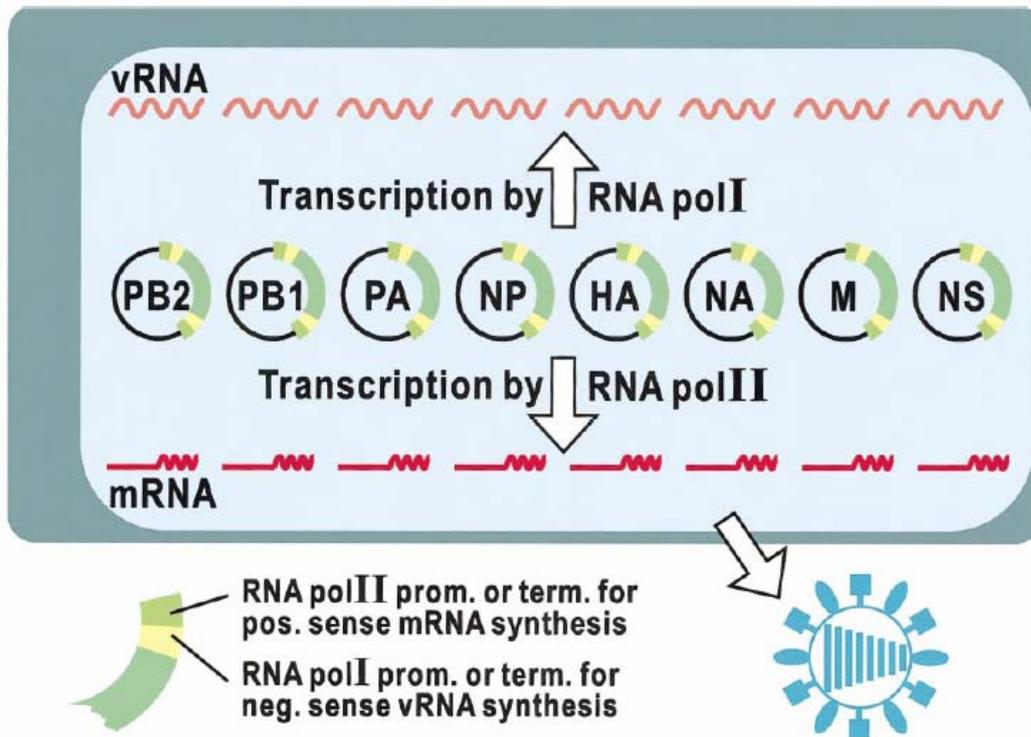


Figure 3.10. Principe de la génétique inverse (Neumann et Kawaoka, 2001, revue). Méthode utilisant deux sets de plasmides, un pour les ARN viraux génomiques, un autre pour les ARNm viraux codant pour les protéines virales.

En ce qui concerne notre modèle d'export nucléaire des vRNPs du virus de la grippe, on pourra tester, par la méthode de génétique inverse à deux sets de plasmides, les motifs d'interaction entre NEP et M1, c'est-à-dire le W78 de NEP et le NLS de M1 (K95K98-101RKxKR₁₀₅). On pourra ainsi regarder les conséquences de ces mutations sur l'export nucléaire des vRNPs. Même dans le cas où ces mutations ne permettraient pas d'obtenir de virus, on pourra tout de même suivre les localisations intracellulaires des différentes protéines virales produites.

La seconde méthode de génétique inverse est appelée le système de l'ARN polymérase I/II et nécessite beaucoup moins de plasmides, 8 au total (Hoffman *et al.*, 2000) (**Figure 3.11**). En effet, le même plasmide permet la transcription de l'ARN viral génomique (par l'ARN polymérase I) et celle de l'ARNm viral (par l'ARN polymérase II). La technique est donc moins « lourde » du fait du nombre plus réduit de plasmides et la transfection est plus efficace. Cependant, l'inconvénient de cette seconde technique est qu'elle ne permet pas de produire des mutations létales dans les gènes viraux.



Expression of influenza vRNAs by RNA polymerase I

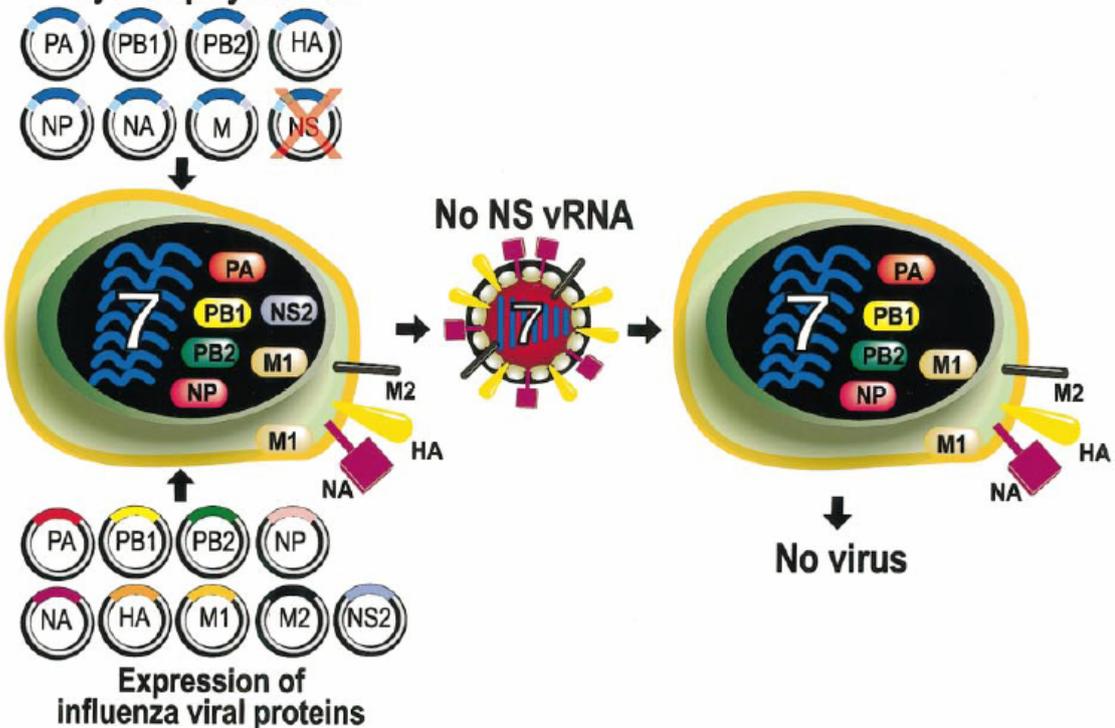


Figure 3.11. Système ARN polI/II en génétique inverse (Neumann et Kawaoka, 2001, revue). Méthode utilisant un seul set de plasmides. La même matrice d'ADN sert à la fois à la synthèse des ARN viraux génomiques (par l'ARN polI) et à celle des ARNm viraux (par ARN polII). L'inconvénient de ce système est qu'il ne permet pas l'étude de mutations létales comme dans l'exemple présenté ci-dessus avec l'absence du segment 7.

Notre modèle d'export nucléaire des vRNPs, qu'il soit ou non validé par des expériences *in vivo*, ne nous dit cependant pas comment les vRNPs sortent du noyau : sortent-elles une par une ou par set de huit ? Nous ne savons toujours pas comment se fait l'assemblage exactement des vRNPs, s'il a lieu dans le noyau avant l'export nucléaire, ou après, lors de l'encapsidation au niveau de la membrane plasmique. Chaque particule virale infectieuse comporte en effet un set complet de huit vRNPs distinctes, comment cela est-il possible ?

Il existe un premier modèle d'assemblage des vRNPs de grippe et qui serait aléatoire. Ce modèle se base essentiellement sur l'existence de virions comportant plus de huit vRNPs (9 à 11) (Bancroft et Parslow, 2002 ; Enami *et al.*, 1991).

Cependant, plusieurs travaux suggèrent au contraire un assemblage spécifique des segments génomiques lié aux extrémités 5' et 3' non codantes communes aux huit vRNPs, plus une partie de la séquence codante spécifique à chaque vRNP (Dos Santos Afonso *et al.*, 2005 ; Watanabe *et al.*, 2003 ; Fujii *et al.*, 2003). Ces travaux se basent notamment sur l'observation de la quantité équimolaire des huit ARN viraux génomiques dans les virions (McGeoch *et al.*, 1976) et sur le fait que les proportions des différents ARN génomiques dans la cellule ne reflètent pas celle dans le virion (Bergmann et Muster, 1995 ; Smith et Hay, 1982).

Par ailleurs les études portant sur les particules défectives qui interfèrent (DI) (vRNPs délétées dans les séquences codantes, composées essentiellement donc des extrémités non codantes 5' et 3') ont montré que ces vRNPs modifiées entraînent en compétition avec les vRNPs entières desquelles elles provenaient, et réduisaient le taux d'incorporation de ces dernières dans les virions (Duhaut et McCauley, 1996 ; Odagiri et Tobita, 1990).

Un assemblage spécifique de segments viraux avait déjà été observé dans le cas d'un virus de plante de la famille des Réoviridae (Wound Tumor Virus) (Anzola *et al.*, 1987) dont le génome segmenté (12 segments génomiques) est composé d'ARN double-brin : les régions des extrémités 5' et 3' conservées communes aux 12 segments et une partie à l'intérieur de la séquence codante spécifique à chaque segment seraient à l'origine de la spécificité d'assemblage des segments génomiques viraux.

III – MATERIEL ET METHODES

1- MUTAGENESE DIRIGEE ; EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES

A) Mutagénèse dirigée

Les mutations ponctuelles ou de délétions des protéines recombinantes (virales ou cellulaire), sont effectuées avec le kit ExSite™ (Stratagène) selon les indications des fournisseurs.

Les gènes de NEP et de ses différents mutants, tous issus de la souche **A/WSN/33**, sont clonés dans le vecteur pET-16b contenant en 5' l'étiquette histidines (**Figure 1**).

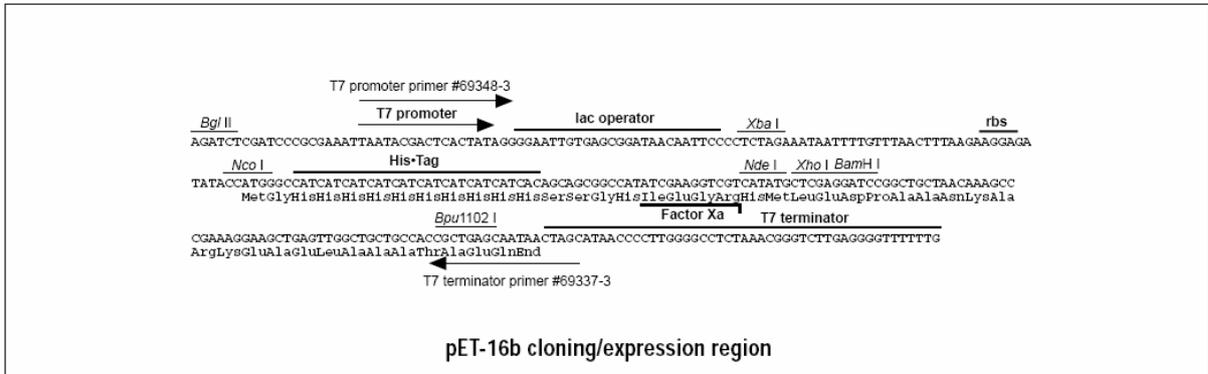
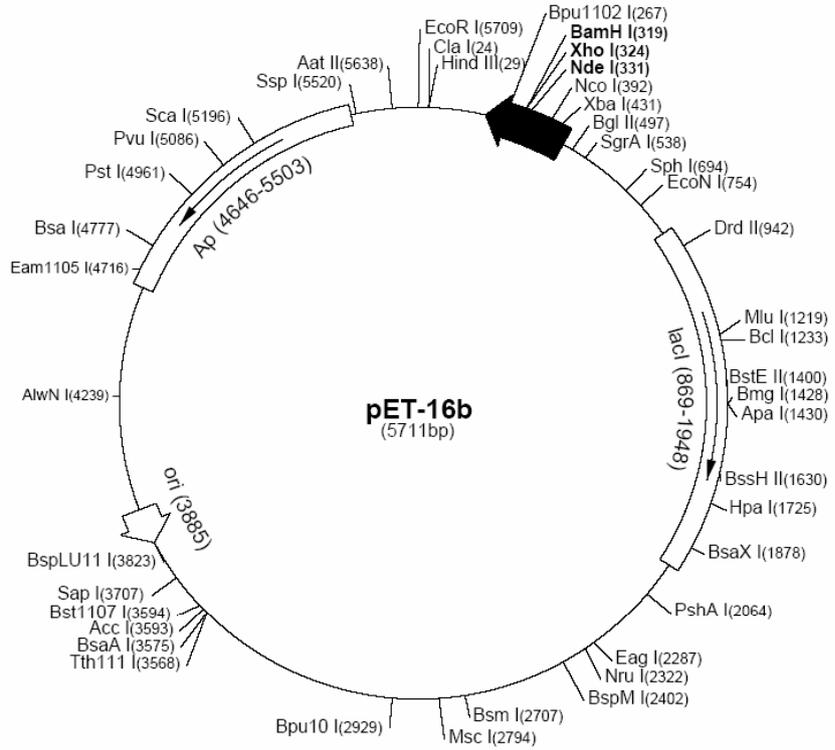
Le gène de NP, issu de la souche **A/PR8/34**, est aussi cloné dans le vecteur pET-16b contenant en 5' l'étiquette histidines.

Les gènes de M1 et de ses différents mutants, tous issus de la souche **A/PR8/34**, sont aussi clonés dans pET-16b, mais sans l'étiquette histidines.

Le gène de l'**importine α 5 humaine** est cloné dans le vecteur d'expression bactérien pProEx Htb qui comporte, en 5' du gène cloné, une étiquette histidines clivable par la TEV. L'importine α 5 humaine, utilisée en complexe avec NP, est un mutant délété de ses domaines N-terminal et C-terminal et correspond ainsi à la séquence **[66-512]**.

pET-16b sequence landmarks

T7 promoter	466-482
T7 transcription start	465
His•Tag coding sequence	360-389
Multiple cloning sites	
(<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lacI</i> coding sequence	869-1948
pBR322 origin	3885
<i>bla</i> coding sequence	4646-5503



Novagen · ORDERING 800-526-7319 · TECHNICAL SUPPORT 800-207-0144

Figure 1. Carte du vecteur d'expression bactérien pET-16b.

yB) Expression des protéines recombinantes

L'expression des protéines recombinantes se fait dans *E.coli* de souche BL21 (DE3) (Stratagene) pour l'importine α 5 [66-512] et dans BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) pour toutes les protéines virales (génotype $F^- ompT, hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) \pm pLysS Cm^R).

Les cultures se font sous agitation (160 rpm) à 37°C dans du milieu LB contenant de l'ampicilline 50 μ g/ml pour l'importine α 5/pProEx Htb dans BL21 (DE3) ; de l'ampicilline 50 μ g/ml + chloramphénicol 34 μ g/ml pour les clones de pET-16b dans BL21 (DE3) pLysS. L'induction se fait à DO_{600nm} de 0.8 avec de l'IPTG 0.5 mM, et la culture se poursuit à 22°C pour l'importines α , NEP wt (et ses mutants ponctuels) ; 37°C pour NEP (54-116) ; 30°C pour M1wt (et ses différents mutants). Après 4-5 h de culture, les bactéries sont centrifugées à 6000 g 25 min et le culot est stocké à -80°C.

C) Purifications des protéines

M1wt et mutants (dans pET-16b, sans étiquette histidines). Le culot bactérien (environ 30 g pour 12 L) est repris dans 90 ml de tampon Tris-HCl pH 6.8 10 mM, NaCl 20 mM, β -mercaptoéthanol (β -SH) 10 mM, 1 pastille d'anti-protéases Complete EDTA-free (Roche). La solution est soniquée 7 fois 30 sec sur glace/éthanol puis centrifugée à 18000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est filtré sur une unité de filtration de diamètre de pores 0.8 μ m (Nalgene) puis déposé sur une résine échangeuse faible de cations, la SP Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia). Le surnageant est chargé à 1 ml/min, puis élué à 3 ml/min par un gradient des tampons Mes-NaOH pH 5.7 10 mM, $MnCl_2$ 1 mM, β -SH 10 mM, NaCl 10 mM et le même tampon supplémenté de NaCl 500 mM. Les fractions correspondant à M1 sont réunies, précipitées sur glace sous agitation dans de l'ammonium sulfate à 0.312 g/ml de protéines et conservées ainsi à 4°C. On effectue ensuite une chromatographie d'exclusion sur colonne Superdex 75 (Amersham Pharmacia). Suivant les expériences, les tampons de Superdex 75 utilisés pour M1 sont: Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 200 mM, β -SH 8 mM, $MnCl_2$ 1 mM ; Mes-NaOH pH 5.7, NaCl 250 mM, $MnCl_2$ 5 mM ; PBS pH 7.2 (NaCl 150 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KCl 3 mM, NaN_3 (azide) 0.02 %).

NEPwt et mutants (dans pET-16b, étiquette histidine non clivable). Le culot bactérien (environ 30 g pour 12 L) est repris dans 120 ml de tampon Tris-HCl pH 7.9 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 10 mM, 1 pastille d'anti-protéases Complete EDTA-free (Roche), 1 pincée de lysozyme ; soniqué 8 fois 30 sec ; centrifugé 30 min à 20000 rpm à 4°C.

Pour la purification en conditions natives (NEPwt et mutants ponctuels), le surnageant est récupéré et filtré sur une unité de filtration de diamètre de pores 0.8 μm (Nalgene) puis déposé sur 3 ml de résine de Co^{2+} (Talon Superflow, Clontech) équilibrée dans le tampon ci-dessus. La colonne est lavée avec deux volumes de Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 1 M, imidazole 20 mM ; la protéine est ensuite éluée dans du Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 500 mM. Un aliquot de chaque fraction éluée est chauffé 3 min à 95°C et analysé sur SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine.

Pour la purification en conditions dénaturantes de NEP [54-116], après la centrifugation, le culot est resuspendu dans 120 ml de tampon urée 6 M, imidazole 5 mM. Après dénaturation de la protéine pendant 1 h sur glace, la solution est centrifugée 30 min à 20000 rpm à 4°C puis filtrée et déposée sur 2 ml de résine Co^{2+} équilibrée dans du tampon urée 6 M, imidazole 10 mM. La protéine est éluée avec le tampon urée 6 M, imidazole 250 mM ; un aliquot de chaque fraction éluée est chauffé 3 min à 95°C et analysé sur SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine. Les fractions d'intérêt sont réunies et dialysées 2 h contre le tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 150 mM, β -SH 10 mM. NEP (54-116) est ensuite purifiée sur colonne Superdex 75 (Amersham Pharmacia) dans le tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 150 mM, β -SH 10 mM. La protéine NEP (54-116) ainsi purifiée est utilisée directement pour les expériences d'interaction sur billes d'agarose magnétique. Pour la cristallogénèse, elle est incubée 10 min à température ambiante avec de la subtilisine dans un rapport protéase/substrat de 1/150^{ème} ; la réaction est stoppée par du phényl-méthyl-sulfonyl-fluoride (PMSF) 1mM. Puis la NEP [54-116] ainsi digérée est séparée de la protéase sur une colonne de PhénylSupérose (Pharmacia) avec un gradient d'ammonium sulfate Tris-HCl pH 8.0 50 mM, β -SH 10 mM, ammonium sulfate 1 à 0 M. La fraction de NEP Cter ainsi éluée est ensuite purifiée une dernière fois sur Superdex 75 dans le tampon Tris-HCL pH 8.0 50 mM, β -SH 10 mM.

vRNPs. Les vRNPs sont purifiées à partir de suspension de virus A/PR/8/34 produit sur embryons de poulet (Mérieux/Lyon), comme cela a été décrit dans Baudin *et al.*, 1994. Brièvement, le virus est d'abord lavé. Pour cela, 10 ml de virus (à environ 3 mg/ml) sont dilués dans 35 ml finaux de PBS, centrifugés 1 h à 25000 rpm (rotor SW27) puis le culot est resuspendu dans 2 ml de PBS et conservé à 4°C sur la nuit.

L'ouverture du virus lavé se fait par incubation, pendant 10 min à 37°C, dans le tampon Tris-HCl pH 8.0 50 mM, DTT 1 mM, KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, sucrose 5 %, Triton X-100 1 %, lyzolécythine 15 mg/ml (compter 5 ml de tampon d'ouverture pour 10 ml de suspension de virus lavé).

Environ 2 ml de virus lavé et ouvert sont ensuite déposés sur un gradient continu de sucrose 25 % - 54 %, dans le tampon Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, et centrifugés 16 h à 25000 rpm à 4°C (rotor SW27). Des fractions de 2 ml sont récoltées à partir du bas du gradient, un aliquot de chaque fraction est chauffé 3 min à 95°C et analysé sur SDS-PAGE Laemmli 12 %. Les fractions riches en vRNPs sont réunies et dialysées contre le tampon Tris-HCl pH 8.0 20 mM, β -SH 1 mM, KCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM.

Importine α 5 humaine [66-512] (dans pProEx Htb, étiquette histidine clivable à TEV). Le culot bactérien (environ 40 g pour 12 L) est repris dans 150 ml de tampon de liaison Tris-HCl pH 8.45 20 mM, NaCl 100 mM, PMSF 1mM, glycérol 10 %, imidazole 10 mM, β -SH 5 mM, 1 pastille d'anti-protéases Complete EDTA-free (Roche), 1 pincée de lysozyme (Euromedex). La solution est soniquée environ 8 fois 20 sec sur glace/éthanol, centrifugée 40 min à 20000 rpm à 4°C. Le surnageant est filtré sur une unité de filtration de diamètre de pores 0.8 μ m (Nalgene) puis incubé 2 h à température ambiante sous agitation avec 8 ml de résine Co²⁺ (Talon Superflow, Clontech) équilibrée dans le tampon de liaison. Le mélange est centrifugé 2 min à 500 g, les billes de résine de Co²⁺ sont lavées une première fois avec 50 ml de tampon de liaison, puis avec 50 ml de tampon de lavage Tris-HCl pH 8.45 20 mM, NaCl 500 mM, PMSF 1mM, glycérol 10 %, imidazole 10 mM, β -SH 5 mM. La résine de Co²⁺ resuspendue est passée sur colonne, puis la protéine est éluée dans le tampon d'éluion Tris-HCl pH 8.45 20 mM, NaCl 100 mM, PMSF 1mM, glycérol 10 %, imidazole 300 mM, β -SH 5 mM. Des aliquots des fractions éluées sont chauffées 3 min à 95°C et analysées sur SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine. Les fractions d'intérêt sont réunies et dialysées 2 h contre le tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 50 mM, β -SH 5 mM dans des cassettes de dialyse (Pierce) de seuil de 5, 7 ou 10 kDa. L'importine α 5 humaine [66-512]+His peut déjà être utilisée telle quelle pour les expériences de protéolyse et de mise en complexe avec NP. Il arrive aussi que l'on clive l'étiquette histidines avec la TEV. Pour cela, l'importine α 5 [66-512] est incubée avec de la TEV à température ambiante pendant la nuit (rapport protéase/substrat de 1/100^{ème}). Les importines α 5 [66-512] dont l'étiquette histidines n'a pas été clivée et les étiquettes histidines clivées sont ensuite retenues sur 500 μ l de résine Ni²⁺ (Qiagen) équilibrée dans le tampon de dialyse. L'éluat est l'importine α 5 [66-512] sans étiquette histidines et qui va être complexée avec la NP.

NP recombinante (dans pET-16b, étiquette histidines non clivable). Le culot bactérien est repris dans 150 ml de tampon de liaison Tris-HCl pH 8.0 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 10 mM, 1 pastille d'anti-protéases Complete EDTA-free (Roche), 1 pincée de

lysozyme. La solution est soniquée environ 8 fois 20 sec sur glace/éthanol, puis centrifugée 45 min à 20000 rpm à 4°C. Le surnageant est filtré sur une unité de filtration de diamètre de pores 0.8 µm (Nalgene) puis incubé 2 h à température ambiante sous agitation avec 8 ml de résine de Co²⁺ (Talon Superflow, Clontech) équilibrée dans le tampon de liaison. Le mélange est centrifugé 2 min à 500 g, les billes de résine de Co²⁺ sont lavées une première fois avec 50 ml de tampon de liaison, puis avec 50 ml de tampon de lavage Tris-HCl pH 8.0 20 mM, NaCl 1 M, imidazole 20 mM. La résine de Co²⁺ resuspendue est passée sur colonne, puis la protéine est éluée dans le tampon d'éluion Tris-HCl pH 8.0 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 500 mM. Un aliquot de chaque fraction éluée est chauffé 3 min à 95°C et analysé sur SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine.

Complexe NP/Importine α 5 humaine [66-512]. On mélange de la NP éluée de la colonne de Co²⁺ avec de l'importine α 5 [66-512] sans étiquette histidine, dans une stoechiométrie 1:1. Puis on dilue le complexe dans du tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 50 mM, β -SH 5 mM et concentre sur des unités de concentration Amicon Ultra de seuil de 10 kDa (Millipore). Le complexe est désormais dans le même tampon que précédemment, plus de l'imidazole 10 mM. Le complexe est ensuite déposé sur une colonne de 2 ml de résine Ni²⁺ équilibrée dans le tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 50 mM, imidazole 10 mM, β -SH 5 mM. L'excès d'importine α 5 [66-512] non complexée à NP est ainsi éliminé. La résine de Ni²⁺ est lavée avec 30 ml le tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 50 mM, imidazole 10 mM, β -SH 5 mM, puis 30 ml de Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 50 mM, imidazole 20 mM, β -SH 5 mM. Le complexe NP/importine α 5 [66-512] est éluée avec 20 ml de tampon d'éluion Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 50 mM, imidazole 200 mM, β -SH 5 mM. 10 µl de chaque fraction éluée sont chauffés 3 min à 95°C et analysés sur SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine. Les fractions d'intérêt sont passées ensuite sur Superdex 200 dans le tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM. Le pic correspondant au complexe 1:1 de NP/importine α 5 [66-512] (volume d'éluion de 14.6 ml) est récupéré pour être utilisé directement en microscopie électronique à transmission, ou bien soumis à une protéolyse à l'élastase (rapport protéase/substrat de 1/80^{ème} p/p) pendant 20 min à température ambiante pour les expériences de cristallogénèse. La protéolyse est arrêtée avec du PMSF 1mM final et le complexe protéolysé est élué sur Superdex 200 dans le même tampon. Le complexe élué de nouveau à 14.6 ml environ est concentré avec des unités de concentration Millipore (seuil des pores de 10 kDa) jusqu'à la concentration désirée (environ 3 mg/ml).

Nucléosomes. Les clones des histones de coeur (*Xenopus laevis*) proviennent de P. Becker (Munich). L'histone H1 provient de Roche biochemicals. L'expression, purification, renaturation des histones H2A, H2B, H3 et H4 et la reconstitution ultérieure de l'octamère sont effectuées suivant le protocole décrit dans [Luger et al. \(1997\)](#) et [Clapier et al. \(2001\)](#). Brièvement, les quatre histones sont resuspendues dans le tampon dénaturant guanidinium HCl 7 M, Tris-HCl pH 7.5 20 mM, DTT 10 mM pendant 1 h. Pour la reconstitution de l'octamère, 2 mg de chaque histone sont mélangés à température ambiante pendant 1 h, puis dialysés contre le tampon de renaturation NaCl 2 M, Tris-HCl pH 7.5 10 mM, Na-EDTA pH 8.0 1 mM et β -SH 5 mM. Les espèces octamères sont séparées des tétramères et dimères sur Superdex 200 (Pharmacia) dans le même tampon puis peuvent être stockées dans le glycérol 10 % à -20°C .

Les nucléosomes utilisés dans l'article de [Garcia-Robles et al. \(2005\)](#) sont purifiés à partir de noyaux de cellules HeLa (4C Biotech SA, Belgique). Les mononucléosomes sont obtenus à partir de la chromatine en utilisant de la nucléase micrococcale (Worthington), d'après le protocole de [Ausio et van Holde \(1986\)](#). Le protocole est décrit avec plus de précisions dans l'article [Garcia-Robles et al. \(2005\)](#).

2 - PONTAGES COVALENTS AVEC L'EGS

1.5 nmol (soit 10 μg environ) de NEP [54-116] sont diluées dans 10 μl de tampon PBS, la protéine est ensuite incubée pendant 30 min à température ambiante dans 0, 8, 15 et 31 mg/ml d'éthylène-glycol-bis(succinimidylsuccinate) (EGS). La réaction de pontage est quenchée par du Tris-HCl pH 7.5 25 mM final, pendant 15 min à température ambiante. Un aliquot de chaque échantillon est chauffé 3 min à 95°C et analysé sur SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine.

3 - TESTS D'INTERACTION SUR BILLES MAGNETIQUES DE Ni^{2+}

Le support utilisé est une plaque Elisa posée sur un adaptateur métallique attirant les billes d'agarose magnétiques recouvertes de Ni^{2+} .

Fixation de NEP sur les billes. 0.4 nmol de NEP (qui possède une étiquette histidines) sont déposés dans le puits et incubés pendant 20 min à température ambiante avec 20 μl de billes d'agarose recouvertes de Ni^{2+} (Qiagen) et 80 μl de tampon d'interaction Tris-

HCl pH 7.5 50 mM, imidazole 5 mM, NaCl 300 mM, MgCl₂ 15 mM. La plaque Elisa est ensuite placée durant 1 min sur un bloc à barreau métalliques pour attirer les billes contre la paroi du puits et permettre ainsi de pipetter (délicatement) le surnageant (excès de NEP dans ce cas).

Interaction avec le ligand. M1 (qui ne possède pas d'étiquette histidines) est ajoutée en quantités croissantes (0.8 à 7.4 nmol) dans un volume final de 160 µl (complété avec le tampon d'interaction). Le mélange est incubé 20 min sur glace, puis le surnageant est jeté (excès de M1). Les billes sont rincées 3 fois avec 180 µl de tampon d'interaction, la solution de rinçage étant jetée à chaque fois.

Elution. NEP est éluée des billes de Ni²⁺ magnétiques avec 20 µl de tampon Tris-HCl pH 7.5 20 mM, imidazole 500 mM, NaCl 500 mM. La composition des éluats est analysée sur SDS-PAGE 12 % Tris-Tricine. Pour vérifier que le ligand ne se fixe pas sur les billes de façon aspécifique, des contrôles négatifs sont effectués en parallèle: le protocole est le même, sauf qu'on ne dépose pas de NEP dans les puits.

4 - MICROINJECTIONS DANS LES OVOCYTES DE *XENOPUS LAEVIS*

Afin de vérifier les résultats obtenus *in vitro* sur le modèle de l'export nucléaire des vRNPs, on effectue des expériences *in vivo* en utilisant le système du Xénope. Pour cela on injecte, dans des noyaux d'ovocytes de *Xenopus laevis*, différents mélanges des protéines virales qui participeraient à cet export (NEP, M1, NP, vRNPs). Les ovocytes sont conservés à 19°C dans du tampon Barth pH 7.6 (NaCl 440 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 12 mM, MgSO₄.7H₂O 4 mM, Ca(NO₃)₂.4H₂O 2 mM, CaCl₂.2H₂O 2 mM, Hepes 50 mM, ampicilline 10 mg/ml, streptomycine 10 mg/ml).

Injection. Les injections dans le noyau ou le cytoplasme d'ovocytes de *Xenopus laevis* se font au moyen d'un microinjecteur Eppendorf 5242. Pour les tests d'import nucléaire, les ovocytes sont incubés 1 h à 19°C avec de la leptomycine B 180 nM. On ajoute à chaque mélange de protéines du bleu dextran comme marqueur d'injection et de la GST-TAP comme protéine contrôle ; chaque échantillon est centrifugé 10 min à 12000 rpm à 4°C puis on injecte dans chaque ovocyte 30 nl d'un mélange de protéines. Les compositions des différents mélanges sont les suivantes: 0.1 pmol de vRNPs, 0.3 pmol de M1 et 0.5 pmol de NEP pour le mélange [vRNPs + M1 + NEP] ; 0.2 pmol de vRNPs et 0.4 pmol de M1 pour le mélange [vRNPs + M1] ; 0.2 pmol de vRNPs et 0.9 pmol de NEP pour le mélange [vRNPs + NEP] ;

0.3 pmol de vRNPs pour [vRNPs seules] ; 0.5 ou 1.8 pmol de NEP pour [NEP seule]. Les ovocytes injectés sont ensuite incubés différents temps à 19°C, sauf les contrôles disséqués à t=0.

Dissection et préparation des protéines. Après différents temps d'incubation, les ovocytes injectés sont transférés dans le tampon NH₄Cl 35 mM, MgCl₂ 3.5 mM, EDTA 0.1 mM, Hepes 10 mM, glycérol 10 %, où l'on sépare le noyau (coloré par le bleu dextran) du cytoplasme. Les cytoplasmes sont homogénéisés dans le tampon Tris-HCl pH 8.0 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM ; centrifugés 15 min à température ambiante. 200 µl du surnageant de cytoplasmes homogénéisés sont prélevés et précipités avec de l'acétone pendant 1 h à -80°C. Les cytoplasmes dans l'acétone et les noyaux dans de l'éthanol 100 % sont centrifugés 15 min à température ambiante. Le culot est séché à l'air, resuspendu dans 7 µl de tampon Laemmli par équivalent ovocyte, vortexé 5 min et soniqué pour solubiliser les protéines. Les échantillons sont chauffés 3 min à 95°C et l'équivalent de 3 ovocytes (soit environ 21 µl) est déposé par puits sur SDS-PAGE Laemmli.

Western-Blot. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Immobilon/Millipore) par électrophorèse pendant la nuit à 25 V. La membrane est incubée 10 min avec du PBS-Tween 20, puis 1 h avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-M1 ou anti-NEP ou anti-NP (dilution 1/10000^{ème} dans du PBS-Tween 20-lait 5 %), et enfin lavée 2 fois 5 min avec du PBS-Tween 20. La membrane de transfert est ensuite incubée 1 h avec l'anticorps secondaire polyclonal anti-lapin (Amersham Pharmacia) (dilution 1/10000^{ème} dans du PBS-Tween 20-lait 5 %), lavée 2 fois 5 min avec du PBS-Tween 20 puis 5 min avec du PBS-Tween 20-NaCl 1 M. La révélation se fait en incubant la membrane 1 min avec les réactifs du système ECL (Amersham Pharmacia), le film est enfin développé après 30 sec, 1 ou 2 min d'exposition (Kodak BioMax).

5 - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET) EN COLORATION NEGATIVE

Principe. Le fonctionnement d'un MET peut être comparé à celui d'un microscope photonique. Les lentilles présentes dans le microscope dévient les électrons, l'interaction des électrons avec l'échantillon produit une image. Pour des échantillons minces (épaisseur < 1000 Å) comme le complexe NP/importine α 5, un électron du faisceau interagit au plus avec un atome de l'échantillon (atome lourd chargé positivement provenant du moule de colorant)

et va être diffusé élastiquement par cet atome. Cette interaction va donner lieu à une image plus ou moins contrastée.

Le contraste dans l'image possède deux composantes: la première est un *contraste d'amplitude* dû à l'absence des électrons fortement déviés qui sont arrêtés par les parois de la colonne du microscope ou par le diaphragme ; l'autre partie appelée *contraste de phase* provient de l'interférence des électrons diffusés élastiquement, entre eux et avec les électrons transmis directement. Dans un MET, ces deux contrastes sont en plus modulés par la *Fonction de Transfert de Contraste* (CTF). La CTF est une fonction sinusoïdale amortie dont les paramètres dépendent des caractéristiques du microscope électronique, de la nature de la source, de la tension d'accélération appliquée aux électrons et de la défocalisation utilisée. Plus simplement, on peut dire que la CTF décrit mathématiquement les effets du microscope électronique sur le contraste et la résolution de l'image: pour retrouver l'image réelle, il faudra corriger cette CTF.

Préparation des échantillons biologiques. On introduit par capillarité 3 μL d'échantillon à l'interface d'une feuille de carbone-mica ; l'échantillon s'adsorbe alors sur le carbone. L'échantillon fixé sur le carbone est déposé à la surface d'une solution de colorant (1% sodium silicotungstate pH 7.5). L'ensemble carbone/échantillon est pêché à l'aide d'une grille de cuivre/rhodium (trempée au préalable dans une solution de colle/chlorophorme) puis séché.

Observation d'échantillons: L'observation de l'échantillon s'effectue avec un microscope JEOL 1200 EX II sous une tension d'accélération de 100 KV et un grossissement nominal de 40000 x. La source d'électrons du microscope est un filament de tungstène chauffé à 2700°C par un courant électrique. Avant l'observation, il est nécessaire d'effectuer plusieurs réglages: le centrage du faisceau d'électrons, l'éclairage (correspondant à un temps de pose de 2 secondes environ), la correction de l'astigmatisme de l'objectif à fort grossissement (x 250000) et du condenseur à plus faible grossissement. Ces différents réglages sont indispensables pour obtenir des clichés exploitables et de bonne qualité.

En restant à faible grossissement (x 2500), on choisit une zone intéressante. Puis on se place au grossissement auquel la photo va être prise (x 27500) dans une zone adjacente pour effectuer les réglages de la mise au point et de la défocalisation. Cette défocalisation entraîne une augmentation du contraste liée à une perte d'informations. Enfin, au niveau de la zone d'intérêt, on éclaire l'échantillon avec le faisceau d'électrons juste le temps de pose du cliché (2 secondes) sous une irradiation de quelques électrons par \AA^2 .

On procède ensuite à la prise de vue sur des plans films KODAK SO163, en mode faible dose. Chaque zone est photographiée deux fois à deux valeurs différentes de défocalisation de

la lentille objectif. Les deux prises de vue forment une paire focale. Les plans films négatifs sont ensuite développés à l'aide de solutions révélatrices (bain de 12 min) et fixatrices (bain de 4-5 min).

Sélection des micrographies. Après développement, les négatifs subissent un premier tri visuel, à l'aide d'une loupe binoculaire pour éliminer les micrographies contenant trop peu de particules ainsi que de la dérive (échantillon qui bouge au moment de la prise de vue). Les images retenues sont ensuite sélectionnées de manière plus fine selon trois critères principaux: la qualité de la CTF, l'absence d'astigmatisme et de dérive. Nous observons les images à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur qui effectue une Transformée de Fourier (TF) de l'image et trace le spectre de puissance. Cette technique est un moyen rapide d'observer la CTF. Le spectre de puissance est constitué d'une alternance de cercles concentriques clairs et noirs. Les anneaux noirs correspondent à la perte d'informations causée par les minima de la CTF. Moins l'image est défocalisée, plus le premier anneau noir est situé à des hautes résolutions. Les images contenant de l'information à haute résolution sont conservées. Si les cercles présentent une direction privilégiée ou des discontinuités, l'image contient de l'astigmatisme ou de la dérive ; elle est donc éliminée.

Digitalisation des plans films. Afin de procéder au traitement informatique des données, il faut digitaliser les micrographies. Les paires focales de bonne qualité sont numérisées, en inversion de contraste, au format TIFF en 256 niveaux de gris et à une résolution de 14 μm par pixel à l'aide d'un scanner ZEISS Photoscan TD (LMES, IBS).

Calibration du microscope. La mesure d'un objet de taille connue comme l'hélice du virus de la mosaïque du tabac (pas = 23,0 Å) permet de déterminer le grossissement réel du microscope. Nous avons donc calculé le grossissement réel. Il vaut 39835 ± 623 , ce qui correspond à un pixel de $3,5 \pm 0.1$ Å.

IV - BIBLIOGRAPHIE

- Adam, E.J. and Adam, S.A. (1994) Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J Cell Biol*, **125**, 547-555.
- Adam, S.A. and Gerace, L. (1991) Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell*, **66**, 837-847.
- Adam, S.A., Lobl, T.J., Mitchell, M.A. and Gerace, L. (1989) Identification of specific binding proteins for a nuclear location sequence. *Nature*, **337**, 276-279.
- Aguilera, A. (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 242-250.
- Akarsu, H., Burmeister, W.P., Petosa, C., Petit, I., Muller, C.W., Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (2003) Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *Embo J*, **22**, 4646-4655.
- Akey, C.W. and Radermacher, M. (1993) Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J Cell Biol*, **122**, 1-19.
- Akkina, R.K., Chambers, T.M., Londo, D.R. and Nayak, D.P. (1987) Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. *J Virol*, **61**, 2217-2224.
- Albo, C., Valencia, A. and Portela, A. (1995) Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol*, **69**, 3799-3806.
- Anzola, J.V., Xu, Z.K., Asamizu, T. and Nuss, D.L. (1987) Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8301-8305.
- Area, E., Martin-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortin, J. (2004) 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 308-313.
- Arrese, M. and Portela, A. (1996) Serine 3 is critical for phosphorylation at the N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75. *J Virol*, **70**, 3385-3391.
- Arzt, S., Baudin, F., Barge, A., Timmins, P., Burmeister, W.P. and Ruigrok, R.W. (2001) Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology*, **279**, 439-446.
- Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F.R., Weeks, D.L., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I.W. and Fornerod, M. (1999) RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol Cell Biol*, **19**, 6276-6285.
- Ausio, J. and van Holde, K.E. (1986) Histone hyperacetylation: its effects on nucleosome conformation and stability. *Biochemistry*, **25**, 1421-1428.
- Bancroft, C.T. and Parslow, T.G. (2002) Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *J Virol*, **76**, 7133-7139.
- Barabino, S.M., Hubner, W., Jenny, A., Minvielle-Sebastia, L. and Keller, W. (1997) The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins. *Genes Dev*, **11**, 1703-1716.
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S. and Ruigrok, R.W. (1994) Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J*, **13**, 3158-3165.
- Baudin, F., Petit, I., Weissenhorn, W. and Ruigrok, R.W. (2001) In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*, **281**, 102-108.

- Bayliss, R., Corbett, A.H. and Stewart, M. (2000) The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes. *Traffic*, **1**, 448-456.
- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Pitzko, J.M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W. and Medalia, O. (2004) Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, **306**, 1387-1390.
- Belsham, G.J., Sonenberg, N. and Svitkin, Y.V. (1995) The role of the La autoantigen in internal initiation. *Curr Top Microbiol Immunol*, **203**, 85-98.
- Ben-Efraim, I. and Gerace, L. (2001) Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J Cell Biol*, **152**, 411-417.
- Bergmann, M., Garcia-Sastre, A., Carnero, E., Pehamberger, H., Wolff, K., Palese, P. and Muster, T. (2000) Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol*, **74**, 6203-6206.
- Bergmann, M. and Muster, T. (1995) The relative amount of an influenza A virus segment present in the viral particle is not affected by a reduction in replication of that segment. *J Gen Virol*, **76 (Pt 12)**, 3211-3215.
- Bosch, F.X., Garten, W., Klenk, H.D. and Rott, R. (1981) Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology*, **113**, 725-735.
- Bouloy, M., Plotch, S.J. and Krug, R.M. (1978) Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 4886-4890.
- Bui, M., Whittaker, G. and Helenius, A. (1996) Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*, **70**, 8391-8401.
- Bui, M., Wills, E.G., Helenius, A. and Whittaker, G.R. (2000) Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol*, **74**, 1781-1786.
- Bui, M., Myers, J.E. and Whittaker, G.R. (2002) Nucleo-cytoplasmic localization of influenza virus nucleoprotein depends on cell density and phosphorylation. *Virus Res*, **84**, 37-44.
- Bukrinskaya, A.G., Vorkunova, G.K. and Vorkunova, N.K. (1979) Cytoplasmic and nuclear input virus RNPs in influenza virus-infected cells. *J Gen Virol*, **45**, 557-567.
- Bullido, R., Gomez-Puertas, P., Albo, C. and Portela, A. (2000) Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. *J Gen Virol*, **81**, 135-142.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, **371**, 37-43.
- Burmeister, W.P., Ruigrok, R.W. and Cusack, S. (1992) The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *Embo J*, **11**, 49-56.
- Carr, C.M., Chaudhry, C. and Kim, P.S. (1997) Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14306-14313.
- Carroll, S.M., Higa, H.H. and Paulson, J.C. (1981) Different cell-surface receptor determinants of antigenically similar influenza virus hemagglutinins. *J Biol Chem*, **256**, 8357-8363.
- Catimel, B., Teh, T., Fontes, M.R., Jennings, I.G., Jans, D.A., Howlett, G.J., Nice, E.C. and Kobe, B. (2001) Biophysical characterization of interactions involving importin-alpha during nuclear import. *J Biol Chem*, **276**, 34189-34198.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **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 3'-end processing machinery. *Embo J*, **18**, 2273-2283.

- Chi, N.C., Adam, E.J. and Adam, S.A. (1995) Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. *J Cell Biol*, **130**, 265-274.
- Chi, N.C., Adam, E.J. and Adam, S.A. (1997) Different binding domains for Ran-GTP and Ran-GDP/RanBP1 on nuclear import factor p97. *J Biol Chem*, **272**, 6818-6822.
- Chi, N.C. and Adam, S.A. (1997) Functional domains in nuclear import factor p97 for binding the nuclear localization sequence receptor and the nuclear pore. *Mol Biol Cell*, **8**, 945-956.
- Chien, C.Y., Tejero, R., Huang, Y., Zimmerman, D.E., Rios, C.B., Krug, R.M. and Montelione, G.T. (1997) A novel RNA-binding motif in influenza A virus non-structural protein 1. *Nat Struct Biol*, **4**, 891-895.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. and Muller, C.W. (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, **399**, 221-229.
- Clapier, C.R., Langst, G., Corona, D.F., Becker, P.B. and Nightingale, K.P. (2001) Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI. *Mol Cell Biol*, **21**, 875-883.
- Colgan, D.F. and Manley, J.L. (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev*, **11**, 2755-2766.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. and Deleage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci*, **25**, 147-150.
- Conti, E. and Kuriyan, J. (2000) Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure Fold Des*, **8**, 329-338.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. and Kuriyan, J. (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, **94**, 193-204.
- Conway, J.F. and Steven, A.C. (1999) Methods for reconstructing density maps of "single" particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. *J Struct Biol*, **128**, 106-118.
- Cox, M.M. (2005) Cell-based protein vaccines for influenza. *Curr Opin Mol Ther*, **7**, 24-29.
- Cros, J.F., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2005) An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic*, **6**, 205-213.
- Cros, J.F. and Palese, P. (2003) Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res*, **95**, 3-12.
- Cullen, B.R. (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, **28**, 419-424.
- Dahlberg, J.E. and Lund, E. (1998) Functions of the GTPase Ran in RNA export from the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 400-408.
- Dasso, M., Nishitani, H., Kornbluth, S., Nishimoto, T. and Newport, J.W. (1992) RCC1, a regulator of mitosis, is essential for DNA replication. *Mol Cell Biol*, **12**, 3337-3345.
- Davey, J., Colman, A. and Dimmock, N.J. (1985) Location of influenza virus M, NP and NS1 proteins in microinjected cells. *J Gen Virol*, **66 (Pt 11)**, 2319-2334.
- de la Luna, S., Martin, J., Portela, A. and Ortin, J. (1993) Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from simian virus 40 recombinant viruses. *J Gen Virol*, **74 (Pt 3)**, 535-539.
- de la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A. and Ortin, J. (1995) Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol*, **69**, 2427-2433.
- De Robertis, E.M., Lienhard, S. and Parisot, R.F. (1982) Intracellular transport of microinjected 5S and small nuclear RNAs. *Nature*, **295**, 572-577.

- Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L. and Rexach, M. (2003) Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2450-2455.
- Digard, P., Elton, D., Bishop, K., Medcalf, E., Weeds, A. and Pope, B. (1999) Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol*, **73**, 2222-2231.
- Dingwall, C., Sharnick, S.V. and Laskey, R.A. (1982) A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell*, **30**, 449-458.
- Duhaut, S.D. and McCauley, J.W. (1996) Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology*, **216**, 326-337.
- Egelman, E.H., Wu, S.S., Amrein, M., Portner, A. and Murti, G. (1989) The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J Virol*, **63**, 2233-2243.
- Elton, D., Medcalf, E., Bishop, K. and Digard, P. (1999a) Oligomerization of the influenza virus nucleoprotein: identification of positive and negative sequence elements. *Virology*, **260**, 190-200.
- Elton, D., Medcalf, L., Bishop, K., Harrison, D. and Digard, P. (1999b) Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol*, **73**, 7357-7367.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J. and Digard, P. (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*, **75**, 408-419.
- Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S. and Enami, M. (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol*, **68**, 1432-1437.
- Enami, M., Sharma, G., Benham, C. and Palese, P. (1991) An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology*, **185**, 291-298.
- Fahrenkrog, B., Hubner, W., Mandinova, A., Pante, N., Keller, W. and Aebi, U. (2000) The yeast nucleoporin Nup53p specifically interacts with Nic96p and is directly involved in nuclear protein import. *Mol Biol Cell*, **11**, 3885-3896.
- Fanara, P., Hodel, M.R., Corbett, A.H. and Hodel, A.E. (2000) Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *J Biol Chem*, **275**, 21218-21223.
- Feldherr, C.M., Kallenbach, E. and Schultz, N. (1984) Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol*, **99**, 2216-2222.
- Fontes, M.R., Teh, T. and Kobe, B. (2000) Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol*, **297**, 1183-1194.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I.W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051-1060.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B. and Osterhaus, A.D. (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, **79**, 2814-2822.
- Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. and Leith, A. (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*, **116**, 190-199.
- Frishman, D. and Argos, P. (1997) Seventy-five percent accuracy in protein secondary structure prediction. *Proteins*, **27**, 329-335.

- Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. and Kawaoka, Y. (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2002-2007.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, **390**, 308-311.
- Garcia-Robles, I., Akarsu, H., Muller, C.W., Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (2005) Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology*, **332**, 329-336.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P. and Muster, T. (1998) Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, **252**, 324-330.
- Garnier, J., Gibrat, J.F. and Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol*, **266**, 540-553.
- Geourjon, C. and Deleage, G. (1994) SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng*, **7**, 157-164.
- Gilchrist, D., Mykytka, B. and Rexach, M. (2002) Accelerating the rate of disassembly of karyopherin.cargo complexes. *J Biol Chem*, **277**, 18161-18172.
- Gonzalez, S. and Ortin, J. (1999) Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *Embo J*, **18**, 3767-3775.
- Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A.D., Hartmann, E. and Laskey, R.A. (1995) Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*, **377**, 246-248.
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. and Bischoff, F.R. (1996) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *Embo J*, **15**, 5584-5594.
- Gorlich, D. (1997) Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 412-419.
- Greber, U.F., Suomalainen, M., Stidwill, R.P., Boucke, K., Ebersold, M.W. and Helenius, A. (1997) The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *Embo J*, **16**, 5998-6007.
- Greenspan, D., Palese, P. and Krystal, M. (1988) Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol*, **62**, 3020-3026.
- Gregoriades, A. (1980) Interaction of influenza M protein with viral lipid and phosphatidylcholine vesicles. *J Virol*, **36**, 470-479.
- Gregoriades, A., Guzman, G.G. and Paoletti, E. (1990) The phosphorylation of the integral membrane (M1) protein of influenza virus. *Virus Res*, **16**, 27-41.
- Gregory, V., Bennett, M., Orkhan, M.H., Al Hajjar, S., Varsano, N., Mendelson, E., Zambon, M., Ellis, J., Hay, A. and Lin, Y.P. (2002) Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001. *Virology*, **300**, 1-7.
- Hagen, M., Chung, T.D., Butcher, J.A. and Krystal, M. (1994) Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J Virol*, **68**, 1509-1515.
- Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu, Y., Kashiwagi, T., Iwahashi, J., Hamada, N., Mizoue, K., Tsumura, N., Kato, H. and Toyoda, T. (2001) Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells*, **6**, 87-97.
- Hatada, E., Saito, S. and Fukuda, R. (1999) Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol*, **73**, 2425-2433.
- Hinshaw, J.E., Carragher, B.O. and Milligan, R.A. (1992) Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell*, **69**, 1133-1141.
- Hodel, M.R., Corbett, A.H. and Hodel, A.E. (2001) Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem*, **276**, 1317-1325.

- Hodge, C.A., Colot, H.V., Stafford, P. and Cole, C.N. (1999) Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *Embo J*, **18**, 5778-5788.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. and Webster, R.G. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6108-6113.
- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K. and Ishihama, A. (1988) RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem (Tokyo)*, **104**, 1021-1026.
- Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2005) Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 591-600.
- Huang, T.S., Palese, P. and Krystal, M. (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol*, **64**, 5669-5673.
- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J.J., Roncal, F., Ortin, J. and Nieto, A. (2001) PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol*, **75**, 8597-8604.
- Imamoto, N., Shimamoto, T., Takao, T., Tachibana, T., Kose, S., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y. and Yoneda, Y. (1995) In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *Embo J*, **14**, 3617-3626.
- Inglis, S.C., Barrett, T., Brown, C.M. and Almond, J.W. (1979) The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 3790-3794.
- Iouk, T., Kerscher, O., Scott, R.J., Basrai, M.A. and Wozniak, R.W. (2002) The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*, **159**, 807-819.
- Iseni, F., Barge, A., Baudin, F., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (1998) Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol*, **79** (Pt 12), 2909-2919.
- Iseni, F., Baudin, F., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (2000) Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid. *Rna*, **6**, 270-281.
- Iseni, F., Baudin, F., Garcin, D., Marq, J.B., Ruigrok, R.W. and Kolakofsky, D. (2002) Chemical modification of nucleotide bases and mRNA editing depend on hexamer or nucleoprotein phase in Sendai virus nucleocapsids. *Rna*, **8**, 1056-1067.
- Ishihama, A. (1996) A multi-functional enzyme with RNA polymerase and RNase activities: molecular anatomy of influenza virus RNA polymerase. *Biochimie*, **78**, 1097-1102.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Fujii, Y. and Kawaoka, Y. (2004) Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. *J Virol*, **78**, 10149-10155.
- Izaurrealde, E., Kann, M., Pante, N., Sodeik, B. and Hohn, T. (1999) Viruses, microorganisms and scientists meet the nuclear pore. Leysin, VD, Switzerland, February 26-March 1, 1998. *Embo J*, **18**, 289-296.
- Jakel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F.R., Schwamborn, K., Doenecke, D. and Gorlich, D. (1999) The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *Embo J*, **18**, 2411-2423.
- Jones, I.M., Reay, P.A. and Philpott, K.L. (1986) Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. *Embo J*, **5**, 2371-2376.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47** (Pt 2), 110-119.

- Kawaoka, Y. and Webster, R.G. (1988) Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 324-328.
- Kemler, I., Whittaker, G. and Helenius, A. (1994) Nuclear import of microinjected influenza virus ribonucleoproteins. *Virology*, **202**, 1028-1033.
- Kido, H., Yokogoshi, Y., Sakai, K., Tashiro, M., Kishino, Y., Fukutomi, A. and Katunuma, N. (1992) Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem*, **267**, 13573-13579.
- Kimura, N., Nishida, M., Nagata, K., Ishihama, A., Oda, K. and Nakada, S. (1992) Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J Gen Virol*, **73** (Pt 6), 1321-1328.
- Kingsbury, D.W., Jones, I.M. and Murti, K.G. (1987) Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. *Virology*, **156**, 396-403.
- Kirschner, R.H., Rusli, M. and Martin, T.E. (1977) Characterization of the nuclear envelope, pore complexes, and dense lamina of mouse liver nuclei by high resolution scanning electron microscopy. *J Cell Biol*, **72**, 118-132.
- Klenk, H.D. and Garten, W. (1994) Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol*, **2**, 39-43.
- Kobayashi, M., Toyoda, T., Adyshev, D.M., Azuma, Y. and Ishihama, A. (1994) Molecular dissection of influenza virus nucleoprotein: deletion mapping of the RNA binding domain. *J Virol*, **68**, 8433-8436.
- Kobayashi, M., Toyoda, T. and Ishihama, A. (1996) Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch Virol*, **141**, 525-539.
- Kobe, B. (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol*, **6**, 388-397.
- Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Kurane, I., Sano, K. and Nakai, M. (1999) Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol*, **73**, 760-766.
- Kornblihtt, A.R., de la Mata, M., Fededa, J.P., Munoz, M.J. and Nogues, G. (2004) Multiple links between transcription and splicing. *Rna*, **10**, 1489-1498.
- Krug, R.M., Yuan, W., Noah, D.L. and Latham, A.G. (2003) Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, **309**, 181-189.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9112-9117.
- Kuersten, S., Ohno, M. and Mattaj, I.W. (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol*, **11**, 497-503.
- Lamb, R.A. and Choppin, P.W. (1979) Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4908-4912.
- Lamb, R.A., Lai, C.J. and Choppin, P.W. (1981) Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 4170-4174.
- Lazarovits, J. and Roth, M. (1988) A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits. *Cell*, **53**, 743-752.

- Lazarowitz, S.G. and Choppin, P.W. (1975) Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*, **68**, 440-454.
- Lazarowitz, S.G., Goldberg, A.R. and Choppin, P.W. (1973) Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen. *Virology*, **56**, 172-180.
- Li, M.L., Ramirez, B.C. and Krug, R.M. (1998) RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *Embo J*, **17**, 5844-5852.
- Li, M.L., Rao, P. and Krug, R.M. (2001) The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *Embo J*, **20**, 2078-2086.
- Liu, J., Lynch, P.A., Chien, C.Y., Montelione, G.T., Krug, R.M. and Berman, H.M. (1997) Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat Struct Biol*, **4**, 896-899.
- Lopez-Turiso, J.A., Martinez, C., Tanaka, T. and Ortin, J. (1990) The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res*, **16**, 325-337.
- Luby-Phelps, K. (1994) Physical properties of cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 3-9.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Luo, G.X., Luytjes, W., Enami, M. and Palese, P. (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol*, **65**, 2861-2867.
- Ma, K., Roy, A.M. and Whittaker, G.R. (2001) Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology*, **282**, 215-220.
- Macara, I.G. (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 570-594, table of contents.
- Martin-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortin, J. (2001) Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep*, **2**, 313-317.
- Martin, K. and Helenius, A. (1991a) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, **67**, 117-130.
- Martin, K. and Helenius, A. (1991b) Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol*, **65**, 232-244.
- Masters, P.S. and Banerjee, A.K. (1988) Complex formation with vesicular stomatitis virus phosphoprotein NS prevents binding of nucleocapsid protein N to nonspecific RNA. *J Virol*, **62**, 2658-2664.
- Mattaj, I.W. and Englmeier, L. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem*, **67**, 265-306.
- Mavrakis, M., Kolesnikova, L., Schoehn, G., Becker, S. and Ruigrok, R.W. (2002) Morphology of Marburg virus NP-RNA. *Virology*, **296**, 300-307.
- Mavrakis, M., Iseni, F., Mazza, C., Schoehn, G., Ebel, C., Gentzel, M., Franz, T. and Ruigrok, R.W. (2003) Isolation and characterisation of the rabies virus N degrees-P complex produced in insect cells. *Virology*, **305**, 406-414.
- McGeoch, D., Fellner, P. and Newton, C. (1976) Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 3045-3049.
- Medcalf, L., Poole, E., Elton, D. and Digard, P. (1999) Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol*, **73**, 7349-7356.

- Melen, K., Fagerlund, R., Franke, J., Kohler, M., Kinnunen, L. and Julkunen, I. (2003) Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem*, **278**, 28193-28200.
- Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., Martin, J., Nieto, A., Ortin, J. and Portela, A. (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia virus-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol*, **75 (Pt 8)**, 2109-2114.
- Miller, J., McLachlan, A.D. and Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J*, **4**, 1609-1614.
- Miyamoto, Y., Imamoto, N., Sekimoto, T., Tachibana, T., Seki, T., Tada, S., Enomoto, T. and Yoneda, Y. (1997) Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors. *J Biol Chem*, **272**, 26375-26381.
- Moroianu, J., Hijikata, M., Blobel, G. and Radu, A. (1995) Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6532-6536.
- Mosammamarast, N. and Pemberton, L.F. (2004) Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol*, **14**, 547-556.
- Mukaigawa, J. and Nayak, D.P. (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol*, **65**, 245-253.
- Murakami, M., Towatari, T., Ohuchi, M., Shiota, M., Akao, M., Okumura, Y., Parry, M.A. and Kido, H. (2001) Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *Eur J Biochem*, **268**, 2847-2855.
- Nachury, M.V. and Weis, K. (1999) The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9622-9627.
- Nadler, S.G., Tritschler, D., Haffar, O.K., Blake, J., Bruce, A.G. and Cleaveland, J.S. (1997) Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences. *J Biol Chem*, **272**, 4310-4315.
- Naeve, C.W. and Williams, D. (1990) Fatty acids on the A/Japan/305/57 influenza virus hemagglutinin have a role in membrane fusion. *Embo J*, **9**, 3857-3866.
- Naim, H.Y. and Roth, M.G. (1993) Basis for selective incorporation of glycoproteins into the influenza virus envelope. *J Virol*, **67**, 4831-4841.
- Nakagawa, Y., Kimura, N., Toyoda, T., Mizumoto, K., Ishihama, A., Oda, K. and Nakada, S. (1995) The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis. *J Virol*, **69**, 728-733.
- Nakagawa, Y., Oda, K. and Nakada, S. (1996) The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. *J Virol*, **70**, 6390-6394.
- Nath, S.T. and Nayak, D.P. (1990) Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1). *Mol Cell Biol*, **10**, 4139-4145.
- Nayak, D.P., Hui, E.K. and Barman, S. (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*, **106**, 147-165.
- Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D. and Macara, I.G. (2001) Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*, **292**, 1540-1543.
- Nemeroff, M.E., Barabino, S.M., 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. *Mol Cell*, **1**, 991-1000.

- Neumann, G., Castrucci, M.R. and Kawaoka, Y. (1997) Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol*, **71**, 9690-9700.
- Neumann, G., Hughes, M.T. and Kawaoka, Y. (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J*, **19**, 6751-6758.
- Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2001) Reverse genetics of influenza virus. *Virology*, **287**, 243-250.
- Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2002) Synthesis of influenza virus: new impetus from an old enzyme, RNA polymerase I. *Virus Res*, **82**, 153-158.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L.I. and Rosbash, M. (1997) The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol*, **7**, 767-775.
- Nieto, A., de la Luna, S., Barcena, J., Portela, A. and Ortin, J. (1994) Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol*, **75** (Pt 1), 29-36.
- Nishimura, K., Kim, S., Zhang, L. and Cross, T.A. (2002) The closed state of a H⁺ channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR. *Biochemistry*, **41**, 13170-13177.
- O'Neill, R.E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. and Moroianu, J. (1995) Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem*, **270**, 22701-22704.
- O'Neill, R.E., Talon, J. and Palese, P. (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J*, **17**, 288-296.
- O'Neill, R.E. and Palese, P. (1995) NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology*, **206**, 116-125.
- Odagiri, T. and Tobita, K. (1990) Mutation in NS2, a nonstructural protein of influenza A virus, extragenetically causes aberrant replication and expression of the PA gene and leads to generation of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5988-5992.
- Ossareh-Nazari, B., Bachelierie, F. and Dargemont, C. (1997) Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*, **278**, 141-144.
- Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C. and Dargemont, C. (2001) Protein export from the nucleus. *Traffic*, **2**, 684-689.
- Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Martina, B.E., Bestebroer, T.M. and Fouchier, R.A. (2000) Influenza B virus in seals. *Science*, **288**, 1051-1053.
- Pante, N. (2004) Nuclear pore complex structure: unplugged and dynamic pores. *Dev Cell*, **7**, 780-781.
- Pante, N. and Kann, M. (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*, **13**, 425-434.
- Paragas, J., Talon, J., O'Neill, R.E., Anderson, D.K., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2001) Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. *J Virol*, **75**, 7375-7383.
- Peluso, R.W. (1988) Kinetic, quantitative, and functional analysis of multiple forms of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein in infected cells. *J Virol*, **62**, 2799-2807.
- Perez, D.R. and Donis, R.O. (2001) Functional analysis of PA binding by influenza A virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity. *J Virol*, **75**, 8127-8136.
- Petosa, C., Schoehn, G., Askjaer, P., Bauer, U., Moulin, M., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Baudin, F., Mattaj, I.W. and Muller, C.W. (2004) Architecture of CRM1/Exportin1

- suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell*, **16**, 761-775.
- Plotch, S.J., Bouloy, M. and Krug, R.M. (1979) Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1618-1622.
- Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I. and Krug, R.M. (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, **23**, 847-858.
- Portela, A. and Digard, P. (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, **83**, 723-734.
- Rabut, G., Lenart, P. and Ellenberg, J. (2004) Dynamics of nuclear pore complex organization through the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 314-321.
- Radu, A., Moore, M.S. and Blobel, G. (1995) The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell*, **81**, 215-222.
- Rao, P., Yuan, W. and Krug, R.M. (2003) Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *Embo J*, **22**, 1188-1198.
- Rexach, M. and Blobel, G. (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**, 683-692.
- Ribbeck, K. and Gorlich, D. (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J*, **20**, 1320-1330.
- Richardson, J.C. and Akkina, R.K. (1991) NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol*, **116**, 69-80.
- Robertson, J.S., Schubert, M. and Lazzarini, R.A. (1981) Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *J Virol*, **38**, 157-163.
- Roe, T., Reynolds, T.C., Yu, G. and Brown, P.O. (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J*, **12**, 2099-2108.
- Rogers, G.N. and Paulson, J.C. (1983) Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, **127**, 361-373.
- Root, C.N., Wills, E.G., McNair, L.L. and Whittaker, G.R. (2000) Entry of influenza viruses into cells is inhibited by a highly specific protein kinase C inhibitor. *J Gen Virol*, **81**, 2697-2705.
- Rost, B. and Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol*, **232**, 584-599.
- Rost, B., Sander, C. and Schneider, R. (1994) PHD--an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Comput Appl Biosci*, **10**, 53-60.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B.T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, **148**, 635-651.
- Rout, M.P. and Wente, S.R. (1994) Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol*, **4**, 357-365.
- Rudolph, M.G., Kraus, I., Dickmanns, A., Eickmann, M., Garten, W. and Ficner, R. (2003) Crystal structure of the borna disease virus nucleoprotein. *Structure (Camb)*, **11**, 1219-1226.
- Ruigrok, R.W., Barge, A., Durrer, P., Brunner, J., Ma, K. and Whittaker, G.R. (2000) Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology*, **267**, 289-298.
- Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (1995) Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are

- indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol*, **76 (Pt 4)**, 1009-1014.
- Salvatore, M., Basler, C.F., Parisien, J.P., Horvath, C.M., Bourmakina, S., Zheng, H., Muster, T., Palese, P. and Garcia-Sastre, A. (2002) Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol*, **76**, 1206-1212.
- Sanz-Ezquerro, J.J., de la Luna, S., Ortin, J. and Nieto, A. (1995) Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol*, **69**, 2420-2426.
- Sanz-Ezquerro, J.J., Zurcher, T., de la Luna, S., Ortin, J. and Nieto, A. (1996) The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J Virol*, **70**, 1905-1911.
- Sanz-Ezquerro, J.J., Fernandez Santaren, J., Sierra, T., Aragon, T., Ortega, J., Ortin, J., Smith, G.L. and Nieto, A. (1998) The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol*, **79 (Pt 3)**, 471-478.
- Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T. and Simons, K. (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem*, **274**, 2038-2044.
- Schoehn, G., Iseni, F., Mavrakis, M., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (2001) Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site. *J Virol*, **75**, 490-498.
- Schoehn, G., Mavrakis, M., Albertini, A., Wade, R., Hoenger, A. and Ruigrok, R.W. (2004) The 12 A structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J Mol Biol*, **339**, 301-312.
- Scholtissek, C. and Becht, H. (1971) Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *J Gen Virol*, **10**, 11-16.
- Schulze, I.T. (1972) The structure of influenza virus. II. A model based on the morphology and composition of subviral particles. *Virology*, **47**, 181-196.
- Sha, B. and Luo, M. (1997) Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol*, **4**, 239-244.
- Shi, L., Galarza, J.M. and Summers, D.F. (1996) Recombinant-baculovirus-expressed PB2 subunit of the influenza A virus RNA polymerase binds cap groups as an isolated subunit. *Virus Res*, **42**, 1-9.
- Shu, L.L., Bean, W.J. and Webster, R.G. (1993) Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *J Virol*, **67**, 2723-2729.
- Skehel, J.J. and Waterfield, M.D. (1975) Studies on the primary structure of the influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 93-97.
- Smith, A.E., Slepchenko, B.M., Schaff, J.C., Loew, L.M. and Macara, I.G. (2002) Systems analysis of Ran transport. *Science*, **295**, 488-491.
- Smith, G.L. and Hay, A.J. (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology*, **118**, 96-108.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Vogel, F. and Schlenstedt, G. (2000) Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol Cell Biol*, **20**, 8468-8479.
- Spehner, D., Kirn, A. and Drillien, R. (1991) Assembly of nucleocapsidlike structures in animal cells infected with a vaccinia virus recombinant encoding the measles virus nucleoprotein. *J Virol*, **65**, 6296-6300.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K. (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, **90**, 1041-1050.
- Stevens, M.P. and Barclay, W.S. (1998) The N-terminal extension of the influenza B virus nucleoprotein is not required for nuclear accumulation or the expression and replication of a model RNA. *J Virol*, **72**, 5307-5312.

- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D. and Garten, W. (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo J*, **11**, 2407-2414.
- Stoffler, D., Feja, B., Fahrenkrog, B., Walz, J., Typke, D. and Aebi, U. (2003) Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol*, **328**, 119-130.
- Strom, A.C. and Weis, K. (2001) Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3008.
- Suntharalingam, M. and Wenthe, S.R. (2003) Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell*, **4**, 775-789.
- Tashiro, M., Ciborowski, P., Klenk, H.D., Pulverer, G. and Rott, R. (1987) Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia. *Nature*, **325**, 536-537.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Toyoda, T., Adyshev, D.M., Kobayashi, M., Iwata, A. and Ishihama, A. (1996) Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol*, **77 (Pt 9)**, 2149-2157.
- Varghese, J.N. and Colman, P.M. (1991) Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*, **221**, 473-486.
- Varghese, J.N., Laver, W.G. and Colman, P.M. (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*, **303**, 35-40.
- Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D. and Wittinghofer, A. (1999) Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, **97**, 635-646.
- Vreede, F.T., Jung, T.E. and Brownlee, G.G. (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol*, **78**, 9568-9572.
- Wakefield, L. and Brownlee, G.G. (1989) RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Res*, **17**, 8569-8580.
- Wang, P., Palese, P. and O'Neill, R.E. (1997) The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol*, **71**, 1850-1856.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A. and Garcia-Sastre, A. (2000) Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol*, **74**, 11566-11573.
- Wansink, D.G., Manders, E.E., van der Kraan, I., Aten, J.A., van Driel, R. and de Jong, L. (1994) RNA polymerase II transcription is concentrated outside replication domains throughout S-phase. *J Cell Sci*, **107 (Pt 6)**, 1449-1456.
- Ward, C.W., Gleeson, P.A. and Dopheide, T.A. (1980) Carbohydrate composition of the oligosaccharide units of the haemagglutinin from the Hong Kong influenza virus A/Memphis/102/72. *Biochem J*, **189**, 649-652.
- Watanabe, K., Handa, H., Mizumoto, K. and Nagata, K. (1996) Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J Virol*, **70**, 241-247.
- Watanabe, K., Takizawa, N., Katoh, M., Hoshida, K., Kobayashi, N. and Nagata, K. (2001) Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res*, **77**, 31-42.

- Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y. and Kawaoka, Y. (2003) Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol*, **77**, 10575-10583.
- Weber, F., Kochs, G., Gruber, S. and Haller, O. (1998) A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. *Virology*, **250**, 9-18.
- Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112**, 441-451.
- Weis, W.I., Brunger, A.T., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1990) Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J Mol Biol*, **212**, 737-761.
- Weis, K., Mattaj, I.W. and Lamond, A.I. (1995) Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science*, **268**, 1049-1053.
- Weis, K., Ryder, U. and Lamond, A.I. (1996) The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *Embo J*, **15**, 1818-1825.
- White, C.L., Janakiraman, M.N., Laver, W.G., Philippon, C., Vasella, A., Air, G.M. and Luo, M. (1995) A sialic acid-derived phosphonate analog inhibits different strains of influenza virus neuraminidase with different efficiencies. *J Mol Biol*, **245**, 623-634.
- Whittaker, G., Kemler, I. and Helenius, A. (1995) Hyperphosphorylation of mutant influenza virus matrix protein, M1, causes its retention in the nucleus. *J Virol*, **69**, 439-445.
- Whittaker, G., Bui, M. and Helenius, A. (1996) Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol*, **70**, 2743-2756.
- Whittaker, G.R. and Helenius, A. (1998) Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology*, **246**, 1-23.
- Wilson, I.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1981) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, **289**, 366-373.
- Wolin, S.L. and Cedervall, T. (2002) The La protein. *Annu Rev Biochem*, **71**, 375-403.
- Yamanaka, K., Ishihama, A. and Nagata, K. (1990) Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem*, **265**, 11151-11155.
- Yang, Q., Rout, M.P. and Akey, C.W. (1998) Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell*, **1**, 223-234.
- 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.
- Ye, Z., Robinson, D. and Wagner, R.R. (1995) Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. *J Virol*, **69**, 1964-1970.
- Ye, Z., Liu, T., Offringa, D.P., McInnis, J. and Levandowski, R.A. (1999) Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. *J Virol*, **73**, 7467-7473.
- Ye, Z.P., Pal, R., Fox, J.W. and Wagner, R.R. (1987) Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J Virol*, **61**, 239-246.
- Ye, Z.P., Baylor, N.W. and Wagner, R.R. (1989) Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. *J Virol*, **63**, 3586-3594.
- Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *Embo J*, **11**, 3681-3694.
- Zhang, J., Pekosz, A. and Lamb, R.A. (2000) Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol*, **74**, 4634-4644.

- Zhang, X., Yamada, M., Mabuchi, N. and Shida, H. (2003) Cellular requirements for CRM1 import and export. *J Biochem (Tokyo)*, **134**, 759-764.
- Zheng, H., Lee, H.A., Palese, P. and Garcia-Sastre, A. (1999) Influenza A virus RNA polymerase has the ability to stutter at the polyadenylation site of a viral RNA template during RNA replication. *J Virol*, **73**, 5240-5243.
- Zhirnov, O.P. and Klenk, H.D. (1997) Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology*, **235**, 302-310.

Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes

Inmaculada Garcia-Robles^a, Hatice Akarsu^{a,b}, Christoph W. Müller^a,
Rob W.H. Ruigrok^{a,b}, Florence Baudin^{a,b,c,*}

^aEMBL Grenoble Outstation, BP 181, 38042 Grenoble Cedex 9, France

^bLaboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale, EA 2939, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

^cInstitut de Biologie Structurale, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

Received 26 July 2004; returned to author for revision 23 August 2004; accepted 28 September 2004

Available online 16 December 2004

Abstract

During influenza virus infection, transcription and replication of the viral RNA take place in the cell nucleus. Directly after entry in the nucleus the viral ribonucleoproteins (RNPs, the viral subunits containing vRNA, nucleoprotein and the viral polymerase) are tightly associated with the nuclear matrix. Here, we have analysed the binding of RNPs, M1 and NS2/NEP proteins to purified nucleosomes, reconstituted histone octamers and purified single histones. RNPs and M1 both bind to the chromatin components but at two different sites, RNP to the histone tails and M1 to the globular domain of the histone octamer. NS2/NEP did not bind to nucleosomes at all. The possible consequences of these findings for nuclear release of newly made RNPs and for other processes during the infection cycle are discussed. © 2004 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Influenza A virus; M1 protein; Nucleoprotein; Replication; Nuclear matrix; Histones

Introduction

Influenza virus is a segmented negative strand RNA virus. The eight RNA segments of its genome encode a total of 10 genes. The eight viral RNAs are associated with the polymerase subunits (PA, PB1 and PB2) and the nucleoprotein (NP) into structurally distinct ribonucleoprotein particles (RNPs) (Duesberg, 1969; Compans et al., 1972; Heggeness et al., 1982; Murti et al., 1988). Matrix protein (M1) is located between the RNP and the inner surface of the lipid envelop in the intact virion (Ruigrok et al., 1989; Schulze, 1972) and acts as a multifunctional protein, playing a role in several steps of the replication of influenza virus. Two major external glycoproteins, haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), and a small protein M2 serving as a transmembrane channel, are anchored in the viral envelope (Lamb and Choppin, 1983; Sugrue and Hay, 1991).

Following fusion of the viral and cellular membranes at the start of the infection process, vRNPs dissociate from M1 and are released into the cytoplasm (Bui et al., 1996; Helenius, 1992; Martin and Helenius, 1991). They are then actively imported into the nucleus where viral transcription and replication take place (Bui et al., 2000; Whittaker et al., 1996). The RNPs are the structures responsible for transcription and replication of viral RNA in the nuclei of infected cells in a highly regulated process. The polymerase complex plus NP are the minimal set of proteins required for these activities (de la Luna et al., 1993; Huang et al., 1990; Kimura et al., 1992; Mena et al., 1994). The polymerase catalyses not only RNA polymerisation but also the cleavage of host cell mRNA to generate 5' capped RNA primers of 10 to 13 nucleotides, a process known as cap-snatching (Bouloy et al., 1978; Plotch et al., 1981; Rao et al., 2003).

In the influenza virus-infected cell, vRNPs are tightly associated with the nuclear matrix and high salt extraction is needed to release these vRNPs from cellular chromatin (Bui et al., 2000). This is in agreement with the results of Bukrinskaya et al. (1979) who found that input vRNPs were associated with chromatin 1 h after infection and with López-

* Corresponding author. EMBL Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, 38000 Grenoble, France. Fax: +33 476 20 71 99.

E-mail address: baudin@embl-grenoble.fr (F. Baudin).

Turiso et al. (1990) who demonstrated that the synthesis of influenza virus vRNAs takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. Cap snatching takes place in the nucleus and the cap structure is removed from newly synthesised cellular mRNAs. Therefore, one could imagine that one of the reasons why vRNPs are tightly associated with the nuclear matrix is that they would be close to the transcription machinery of the host cell. It is possible that caps have to be snatched before the cellular cap binding protein (CBP) can interact with cellular pre-mRNAs for further processing and nuclear export.

At the end of the infection cycle, newly synthesised RNPs must be exported from the nucleus and directed to the plasma membrane to allow their incorporation into budding virions. A part of the newly synthesised M1 migrates to the nucleus of the infected cell where it will come into close proximity with newly synthesised RNP (Bui et al., 1996; Patterson et al., 1988). The binding of M1 to RNP leads to the transport of M1/RNP complexes from the nucleus to the cytoplasm (Huang et al., 2001; Martin and Helenius, 1991) and prevents RNP from re-entering the nucleus (Martin and Helenius, 1991). In fact, nuclear export protein (NEP, previously NS2) is thought to bind to M1 that is already bound to RNP and to mediate the contact between the M1/RNP complex and the cellular exportin, CRM1 (Akarsu et al., 2003; Neumann et al., 2000). It has previously been reported that M1 binds to the histones of the nucleosome (Zhirnov and Klenk, 1997) indicating that there is a specific interaction of M1 with the nucleosomes during viral replication and M1 could be involved in the release of vRNPs from the chromatin.

In this work, we present *in vitro* experiments studying the interactions between nucleosome particles and vRNPs and purified NP. Positive results were found with all core histones, the histone octamer particle and purified mononucleosomes but not with the linking histone H1. These results suggest that the observed association of vRNPs with the nuclear matrix *in vivo* is most probably achieved through the NP protein and that the binding takes place through the histone tails as the interaction disappears when the tails are removed by trypsin digestion. The interaction with the nucleosomes of the other two proteins involved in nuclear export of vRNPs, M1 and NEP was also studied. We found that M1 does interact with the nucleosome but not at the same site as NP. NEP did not show any interaction with nucleosomes.

Results

vRNPs and NP bind to nucleosomes, histone octamers and single histones

Influenza vRNPs and purified NP were used to test their ability to bind to chromatin components. We performed pelleting experiments with purified mononucleosomes from

HeLa cells. Mononucleosomes were incubated for 1 h either with vRNPs or with NP purified from influenza virus. NP forms polymeric structures that are indistinguishable from intact vRNPs (Ruigrok and Baudin, 1995) and, therefore, sedimentation experiments can be performed under the same conditions. The mixture was loaded onto a 40% glycerol cushion. Mononucleosomes alone do not pellet under the conditions used. Presence of mononucleosomes in the pellet together with vRNP or purified NP indicates the formation of a complex. Indeed, nucleosomes alone pellet only to a very low amount, but RNPs and NP take a large amount of nucleosomes with them to the pellet (Fig. 1A). In order to confirm the specificity of this interaction, similar experiments were performed with recombinant nucleocapsids (NC) from measles and rabies virus, two viruses that replicate in the cytoplasm of the infected cell and that are not expected to form functional complexes with nucleo-

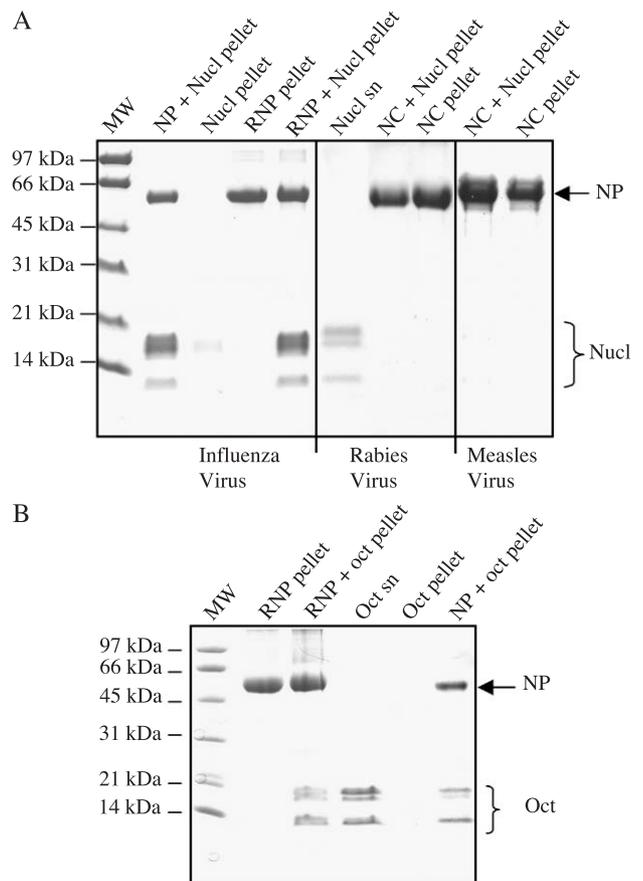


Fig. 1. Binding of vRNPs or purified nucleoprotein free of RNA (NP) to nucleosomes (panel A) and to reconstituted histone octamers (panel B). RNPs or NP were mixed with nucleosomes or with reconstituted octamers. After 1 h incubation the mixture was sedimented through a 40% glycerol cushion (for nucleosomes) or through a 20% glycerol cushion (for octamers). The pellets were resuspended and analysed on 15% SDS-PAGE. (A) Supernatant (sn) or pellet fractions of the various mixtures as indicated above the gel, the type of virus from which the RNP or nucleocapsid (NC) was derived below the gel. MW: molecular weight markers. The gels were stained with Coomassie blue. (B) As in panel A but only performed with influenza virus RNP or NP and using histone octamers (Oct) rather than intact nucleosomes.

somes. No interaction was observed between these two viral nucleocapsids and purified mononucleosomes (Fig. 1A). The fact that nucleosomes bind to vRNPs to the same extent as to NP suggests that the interaction between nucleosomes and vRNPs occurs through an amino acid sequence present on NP which is exposed on vRNPs.

We then tested the different components of the nucleosome in order to determine if this interaction was due to NP–DNA or to NP–histone interaction. For this purpose, purified histones were used to reconstitute an octamer particle. Sedimentation assays were performed with reconstituted octamer mixed with vRNP or purified NP. After 1 h incubation and sedimentation through a 20% glycerol cushion, we observed that the octamer pelleted with either vRNPs or NP (Fig. 1B). Controls performed with octamer alone showed no sedimentation through 20% glycerol. These results show that vRNPs and NP protein interact with the nucleosome core in the absence of DNA thus indicating a protein–protein interaction.

Purified core histones were also tested individually in pelleting experiments with vRNPs or NP. All four core histones were found in the pellet with vRNPs and NP (Figs. 2A and B). Controls were performed with histones alone that did not sediment (Fig. 2, lane C in all gels). All core histones seem to bind equally well to RNP and NP, but when similar experiments were repeated with the linker histone H1, no interaction was detected (Fig. 2A). Thus, vRNPs and NP bind to core histones of the nucleosome but not to the linker histone.

vRNPs interact with histone tails

In order to determine which domain of the nucleosome was involved in binding to vRNP, nucleosomes were treated with trypsin in order to remove the histone tails. The same experiments as described above were performed with vRNPs. When the histone tails are removed, the nucleosomes no longer pelleted with the vRNPs (Fig. 3).

M1 binds to nucleosomes

As M1 protein is known to enter the nucleus at the end of the infection process, we also tested its ability to bind to the chromatin components. Nuclear M1 translocation is achieved via its NLS motif located between residues 101 and 105 (Ye et al., 1995). Sedimentation assays were performed with bacterially expressed M1 and purified nucleosomes. After 1-h incubation, the samples were loaded onto a 20% glycerol cushion. At this concentration, nucleosomes are able to pellet but not M1. Pellets were analysed on 15% SDS-PAGE gels. We observed that nucleosomes and M1 pelleted through the glycerol cushion (Fig. 4A) confirming the results of Zhirnov and Klenk (1997). In order to test which domain of M1 was involved in this interaction, similar tests were performed with nucleosomes and the N-terminal (aa 1–164) or the C-terminal domain of M1 (aa 165–252), described in Baudin et al. (2001). No interaction was observed for either domain (Fig. 4B). We also tested an M1 mutant in which the amino

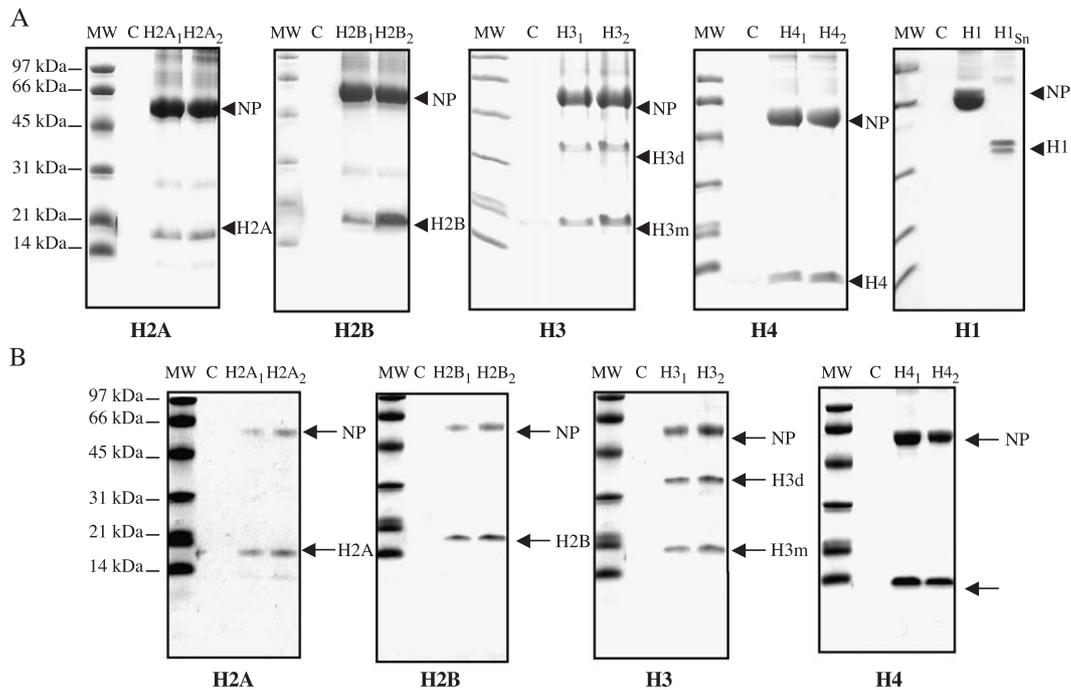


Fig. 2. Binding of isolated histones to vRNPs and NP. Isolated histones: H2A, H2B, H3, H4 or H1 were mixed with vRNPs (A) or with NP (B), incubated for 1 h, and mixtures were sedimented through a 20% glycerol cushion. The pellets were resuspended and analysed on 15% SDS-PAGE. C: control, pellet of histones without RNP or NP. Histone conditions ₁ and ₂: increasing amounts of histones with constant amount of vRNPs (or NP) as indicated in Materials and methods. H3m and H3d: monomers and dimers of H3 respectively.

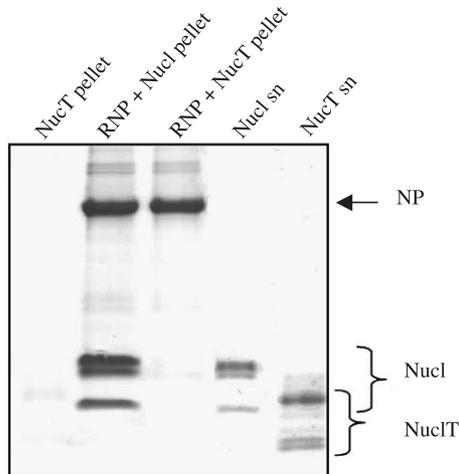


Fig. 3. Binding of vRNPs to tail-less nucleosomes (NucT). After 1 h incubation vRNP ± nucT complexes were sedimented through a 40% glycerol cushion and pellets were resuspended and checked on 15% SDS-PAGE gels. Controls were performed with intact nucleosomes.

acid residues located at the NLS have been mutated to alanines (Akarsu et al., 2003; Elster et al., 1997). These amino acids are located on the positively charged face of the N-terminal domain of M1 (Arzt et al., 2001; Sha and Luo, 1997). The interaction of the M_{NLS} mutant with nucleosomes was strongly reduced (Fig. 4A). This reduction of binding to the nucleosome cannot be ascribed to misfolding of the mutant protein, as its N-terminal domain has essentially the same structure as that of wild type M1 (Arzt et al., 2004). These results would indicate that full-length M1 protein is needed for the interaction with nucleosomes and that the positive face of M1 is important for this interaction.

M1 still binds to nucleosomes when the histone tails are removed

In order to determine which domain of the nucleosome is involved in the binding of M1, trypsin-treated nucleosomes were used to perform sedimentation assays with M1 protein. M1 pellets both with intact nucleosomes and with trypsin-treated nucleosomes (Fig. 4C). Controls were performed with M1 alone and no sedimentation was observed. This result suggests an interaction between M1 and the nucleosome core independent of the histone tails thus indicating that the vRNPs and M1 have two different binding sites on the nucleosome.

NEP does not bind to nucleosomes

NEP protein also enters the cell nucleus at the end of the viral cycle and is involved in the export of vRNPs from the nucleus to the cytoplasm (Akarsu et al., 2003; Neumann et al., 2000). Centrifugation experiments were performed with NEP and nucleosomes. After 1-h incubation, samples were loaded on a 20% glycerol cushion. The absence of NEP in

the pellet suggests that NEP does not interact with nucleosomes (Fig. 4A).

Can M1 displace vRNPs from nucleosomes?

A fixed amount of each histone (Fig. 5A, condition 2 from Fig. 2) or purified nucleosomes (Fig. 5B) was incubated in the presence of vRNPs for 30 min and increasing amounts of purified M1 protein were then added and incubated for a further 15 min. The mixture was then sedimented by centrifugation through a 40% glycerol cushion. At this glycerol concentration, only vRNPs are

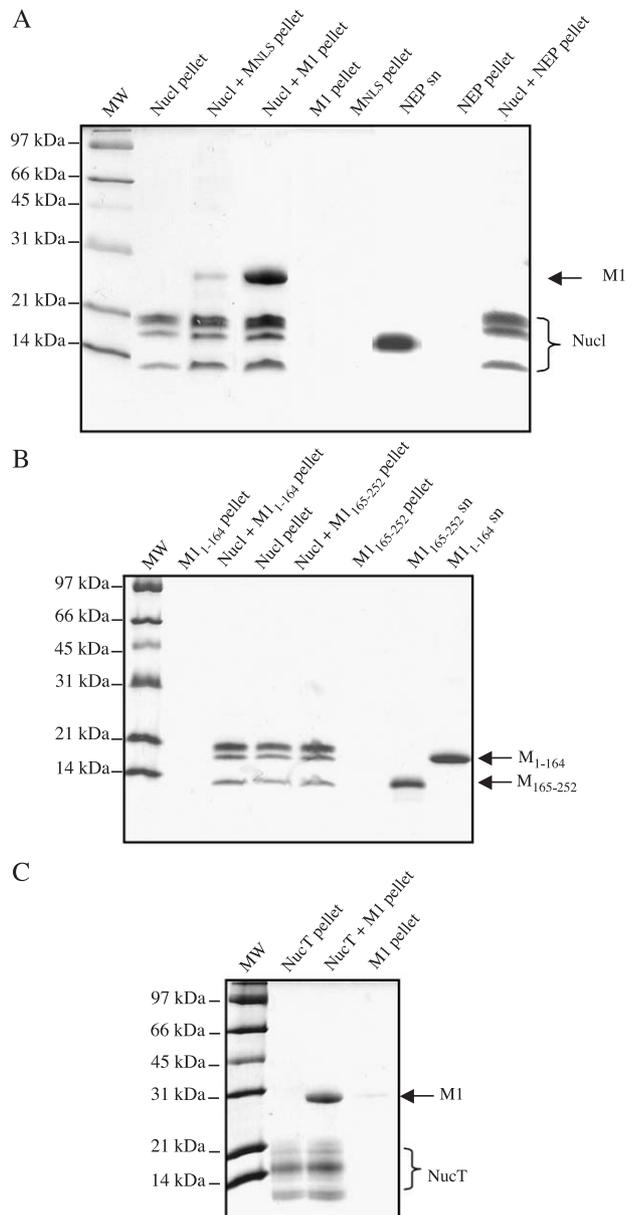


Fig. 4. Binding of M1 protein or NEP (A) and M1 mutants or M1 domains (A and B) to intact nucleosomes and to tail-less nucleosomes (C). Viral proteins were incubated with nucleosomes or trypsin-treated nucleosomes for 1 h and the mixtures were then sedimented through a 20% glycerol cushion.

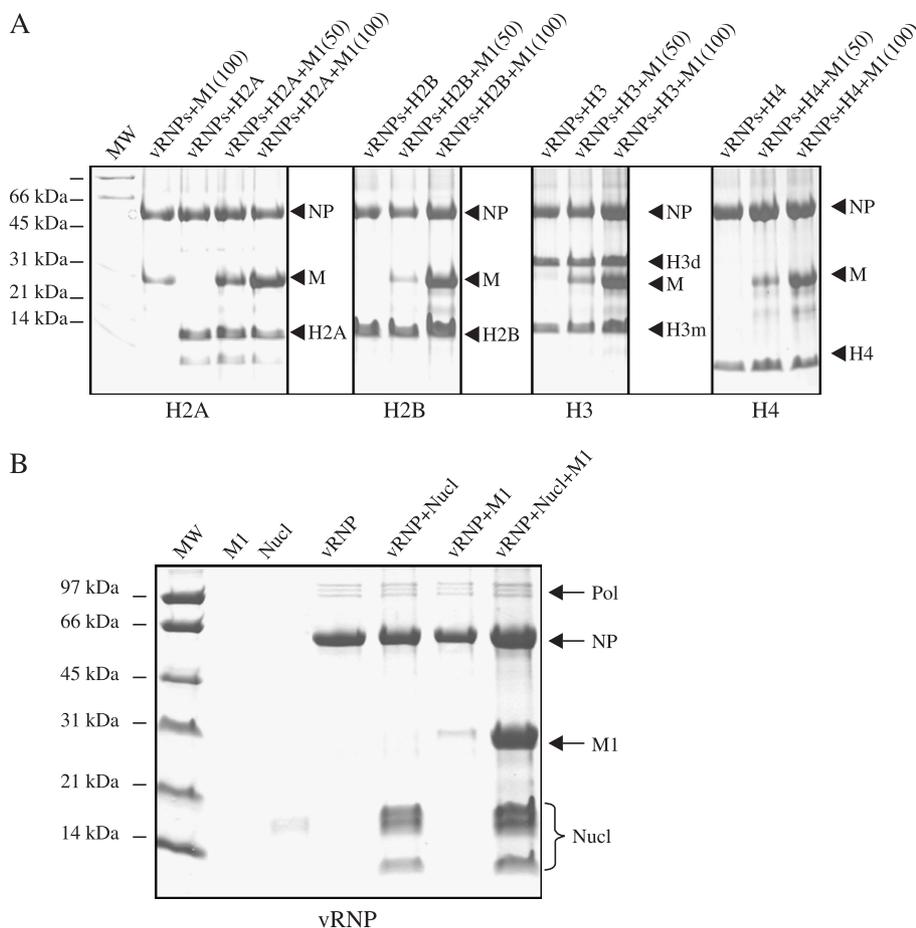


Fig. 5. Mixing vRNP plus M1 with histones or nucleosomes. (A) vRNPs plus a fixed amount of each single histone (H2A, H2B, H3 or H4) were incubated for 30 min. M1 was then added to the mixture and incubated for further 15 min as described in Materials and methods. (B) vRNPs were incubated with a fixed amount of nucleosomes for 30 min and then M1 was added and incubated for 15 min as described in Materials and methods. Single histones-vRNP \pm M1 complexes were sedimented through a 20% glycerol cushion whereas nucleosome-vRNP \pm M1 complexes were sedimented through a 40% glycerol cushion. All lanes are pellet fraction.

able to pellet. We observed vRNPs, M1 plus single histones or nucleosomes in the pellet. The presence of M1 had no influence on the NP/histone stoichiometry. So, under these in vitro conditions, M1 does not displace RNPs from nucleosomes. This experiment was also performed by adding all viral components at the same time to the nucleosomes or first M1 and then vRNPs but the results were always the same as those shown in Fig. 5.

Discussion

Here, we present simple in vitro experiments that measure the binding of RNP, purified NP, M1 and NEP to nucleosomes, histone octamers or isolated histones. RNP and NP bind to the positively charged histone tails of the nucleosome. Nucleoprotein is also a protein with a strong net positive charge but this charge is probably neutralised by the bound viral RNA. The fact that both RNP and NP bind suggests that the RNA is not involved in binding and neither is it likely that the polymerase is involved but rather some

part of NP that is not involved in binding the viral RNA and that is exposed on the surface of the RNPs. M1 binds with the positively charged side of its amino-terminal domain to the globular domains of the histone octamer and the nucleosomes. Neither the isolated amino- nor the carboxy-terminal domain bind to the nucleosomes, in agreement with the results of Zhirmov and Klenk (1997). This may be because the isolated N-terminal domain has another conformation than that in the intact protein or that the C-terminal domain interferes with the exposition of the positive patch on the N-terminal domain. Another possibility is that the intact protein has a tendency to oligomerise (Baudin et al., 2001) and that the multiple affinity of the oligomer is stronger than the affinity of the monomeric N-terminal domain. A similar situation was observed for the transcription inhibition activity of M1 where the C-terminal domain of M1 does bind to viral RNPs but only the intact M1 can inhibit the transcription by these RNPs in vitro (Baudin et al., 2001).

At a late stage in the infection, vRNPs have to be separated from chromatin and exported towards the cytosol

in order to be encapsidated into new virus particles. There is evidence that export requires the synthesis of M1 (Martin and Helenius, 1991). M1 probably guides the vRNPs from the nuclear matrix and through the nuclear pores together with NEP serving as a bridge for the binding of CRM1 (Akarsu et al., 2003; Neumann et al., 2000; O'Neill et al., 1998). Alternatively, it may be needed to release the bound vRNPs from the nuclear matrix as suggested by Zhirnov and Klenk (1997). The results presented here do not really explain how M1 may perform the latter function. In the RNP–M1–NEP complex, NEP binds to the positively charged side of the N-terminal domain of M1 and the C-terminal domain of M1 binds to the RNP (Akarsu et al., 2003) so it is unlikely that the M1 that is bound to the nucleosomes will bind NEP at the same time. NEP by itself is unlikely to have an influence on the binding of RNPs to chromatin since it does not directly bind to RNP (Akarsu et al., 2003) and it does not bind to nucleosomes either (this work). When we wanted to study the possible competition between histones and NEP for the same site on M1, we obtained a surprising result: all three components were found in the pellet (result not shown). The most likely explanation for this finding is that M1 polymerised onto M1 that was already bound to the nucleosomes and that NEP could bind to this “secondarily” polymerised M1. Therefore, this experiment did not tell us much about what may happen in the infected cell nucleus. In fact, there is not much known about what actually happens in the nucleus during the infection by influenza virus in terms of chromatin remodelling or reorganisation of the nucleus. It is possible that cellular factors are involved that alter the chromatin and that contribute to the release of the RNP. Modification (acetylation) of the histone tails could influence the binding of the RNPs.

Finally, binding of RNP to the histone tails could have another beneficial effect for the virus. Post-translational modification of the histone tails modulates the structure and function of chromatin (Bertin et al., 2004; Hampsey and Reinberg, 2003; Morales and Richard-Foy, 2000). By sequestering the histone tails, the interaction between influenza virus RNP and chromatin could disturb the chromatin structure and change the transcription pattern in the infected cell, which may be beneficial for the virus.

Materials and methods

Viral proteins

M1, M1_{1–164}, M1_{165–252} and NEP were produced in *Escherichia coli* as described (Akarsu et al., 2003; Baudin et al., 2001). M1_{NLS} mutant protein, with all positively charged amino acids between residues 95 and 105 changed to alanines (95-AA-VALYAALAA-105, changed residues underlined) was described in Elster et al. (1997). The

isolation and purification of viral RNPs and NP from influenza virus was described in Baudin et al. (1994). Recombinant NC from measles virus was purified as described in Schoehn et al. (2004) and recombinant NC from rabies virus was purified as described in Iseni et al. (1998).

Histones and histone octamers

Xenopus laevis core histone clones were obtained from P. Becker (Munich). H1 histone was purchased from Roche Biochemicals. The expression, purification, refolding of histones H2A, H2B, H3 and H4 and posterior octamer reconstitution was performed as described in Clapier et al. (2001). Briefly, the four histones were dissolved in unfolding buffer (7 M Guanidinium HCl, 20 mM Tris–HCl pH 7.5, 10 mM DTT) for 2 h. For octamer reconstitution, 2 mg of each histone were mixed at RT for 30 min, and then dialysed against refolding buffer (2 M NaCl, 10 mM Tris–HCl pH 7.5, 1 mM Na-EDTA pH 8 and 5 mM β -mercaptoethanol). The octamer species were separated from tetramers and dimers by running a FPLC S200 Column (Pharmacia) in the same buffer. The octamer was stored in 10% glycerol at -20°C .

Nucleosome preparation

HeLa Nuclei were purchased from 4C Biotech SA (Belgium). Mononucleosomes were prepared by adapting the protocol of Ausio and van Holde (1986). Briefly, nuclei were washed twice with 0.5 mM sodium metabisulfite, 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0.5 mM Benzamidine HCl, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 10 mM PIPES pH 6.8 and 0.1 mM PMSF. After incubation for 10 min at 37°C 250 units/ml of Mnase (Worthington) were added and the nuclei were further incubated for 30 min at 37°C . The reaction was stopped by addition of 0.5 M EDTA (4 mM final). The appropriate Mnase amount to obtain mononucleosomes was established previously by testing from 0.05 units to 25 units in a small-scale experiment. Samples were precipitated and DNA size was monitored on agarose gels stained with ethidium bromide. Mnase treated nuclei were spun at $2000 \times g$ for 5 min at 4°C . The pellet was resuspended in the same volume of EDTA/NaCl solution (0.4 mM EDTA, 0.5 M NaCl) at 4°C to lyse the nuclei and centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatant, containing mononucleosomes, H1 and H5, was loaded on a 5–30% sucrose gradient and centrifuged in an SW 28 rotor at 26,000 rpm 4°C for 16 h. Gradients were fractionated from the bottom and fractions checked in 15% SDS-PAGE gels. Fractions containing nucleosomes but not H1 or H5 were used for further experiments. Purity and integrity of the mononucleosomes were checked by 15% SDS-PAGE gels and electron microscopy.

Nucleosome histone tail removal

Mononucleosome particles (50 µg of protein) were digested with trypsin at an enzyme substrate ratio of 1:1000 for 15 min at 37 °C (protocol adapted from Ausio et al., 1989). The appropriate length of digestion (usually 15–20 min) was established through a time-course experiment, which was monitored with a 15% SDS-PAGE polyacrylamide gel. The reaction was stopped by addition of Pefablock (Roche) (40 mM final) to the reaction tube. Samples were used immediately in sedimentation assays.

Histones ± vRNP (or NP) pelleting experiments

Five picomoles of RNP was incubated for 1 h at room temperature with increasing amounts of single histone H2A, H2B, H3 or H4. H2A—condition 1: 15 µg corresponding to 1000 pmol; condition 2: 30 µg; H2B—condition 1: 8 µg corresponding to 600 pmol; condition 2: 12 µg; H3—condition 1: 12 µg corresponding to 800 pmol; condition 2: 20 µg; and H4—condition 1: 8 µg corresponding to 700 pmol; condition 2: 12 µg. The final volume was 130 µl in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 5 mM MgCl₂. The histone ± vRNP mixture was put on top of a 20% glycerol cushion (420 µl in the same buffer as above) and centrifuged for 1 h at 50 krpm in a SW55 rotor at 12 °C. The controls were done with the histone proteins alone at the higher concentration. The pellets were solubilised in SDS-PAGE sample buffer and directly analysed on SDS-PAGE. Similar experiments were performed with purified NP free of RNA and with H1 protein except that only one condition was tested for this histone, 50 µg corresponding to 1600 pmol. A control was done with H1 alone.

Octamer ± vRNP (or NP) and nucleosome ± vRNP (or NP) pelleting

Five picomoles of RNP were incubated for 1 h at room temperature with 230 pmol of reconstituted octamer and loaded on a 20% glycerol cushion. Sedimentation using nucleosomes was performed as above except that 35 µg (220 pmol) of material was used in NP and vRNPs experiments and that the glycerol cushion was 40%.

Recombinant NC from measles and rabies virus were used to check the specificity of the binding to nucleosome by performing similar experiments with 20 µg of each and 35 µg of nucleosome. After 1 h incubation, samples were loaded on 40% glycerol cushion and pellets checked on 15% SDS-PAGE gels.

Nucleosomes ± M1 or NEP pelleting experiments

Before using M1 and NEP in co-sedimentation experiments, all protein preparations were centrifuged at 20 psi in a Beckman airfuge to remove pre-existing aggregates. Thirty-five micrograms of nucleosomes were used to

perform pelleting experiments as described above with M1 protein (25 to 100 µg), M1_{1–164} (50 µg), M1_{165–252} (30 µg), NEP (50 µg) or M1_{NLS} (100 µg). After 1-h incubation, the samples were loaded on a 20% glycerol cushion. Controls were done with the proteins in the absence of nucleosomes. Pellets were resuspended in SDS-PAGE loading buffer and run on 15% PAGE gels.

Pelleting experiments with tail-less nucleosomes ± M1 or ± vRNPs

Tail-less nucleosomes (NucT) were immediately used for co-sedimentation experiments with M1 protein (100 µg) or vRNPs (20 µg). Controls were done with M1 alone and trypsin treated nucleosomes alone. After 1 h incubation, samples were loaded on a 20% glycerol cushion for the nucleosome T ± M1 experiment or a 40% glycerol cushion for tail-less nucleosomes ± vRNP experiment. After ultracentrifugation for 1 h at 50 krpm in a SW55 Beckman rotor, the pellets were resuspended in SDS-PAGE sample buffer and loaded on 15% PAGE gels.

Pelleting of histone–vRNP–M1 mixtures

For the experiment shown in Fig. 5, histones and vRNP were incubated for 30 min and then intact M1 protein (1 or 2 nmol) was added. The incubation proceeded for another 15 min and the histone–vRNP–M1 mixture was loaded on top of a 20% glycerol cushion (420 µl in the buffer S) and centrifuged for 1 h at 50 krpm in a SW55 rotor at 12 °C. Controls were performed with proteins in the absence of vRNP. The pellets were solubilised in SDS-PAGE sample buffer and directly analysed on PAGE. Similar experiments were performed with vRNPs, purified nucleosomes and M1 protein, except that only the highest amount of M1 from the previous experiment was used. After incubation, the samples were loaded on a 40% glycerol cushion. All variations of mixing the three components were tried but with the same result as that shown in Fig. 5.

Acknowledgments

We would like to thank Andreas Ladurner and Cédric Clapier for advice, Peter Becker for providing the histone clones, Aurélie Albertini for the measles and rabies virus recombinant nucleocapsid preparation and Guy Schoehn for electron microscopy checks on nucleosomes. I.G.R. was a recipient of a Spanish MCYT fellowship (ref ES2001-0050).

References

- Akarsu, H., Burmeister, W.P., Petosa, C., Petit, I., Müller, C.W., Ruigrok, R.W., Baudin, F., 2003. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J.* 22, 4646–4655.

- Arzt, A., Baudin, F., Barge, A., Timmins, P., Burmeister, W.P., Ruigrok, R.W.H., 2001. Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain shows that M1 is an elongated monomer. *Virology* 279, 439–446.
- Arzt, S., Petit, I., Burmeister, W.P., Ruigrok, R.W., Baudin, F., 2004. Structure of a knockout mutant of influenza virus M1 protein that has altered activities in membrane binding, oligomerisation and binding to NEP (NS2). *Virus Res.* 99, 115–119.
- Ausio, J., van Holde, K.E., 1986. Histone hyperacetylation: its effects on nucleosome conformation and stability. *Biochemistry* 25, 1421–1428.
- Ausio, J., Dong, F., van Holde, K.E., 1989. Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone “tails” in the stabilization of the nucleosome. *J. Mol. Biol.* 206, 451–463.
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., Ruigrok, R.W.H., 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J.* 13, 3158–3165.
- Baudin, F., Petit, I., Weissenhorn, W., Ruigrok, R.W., 2001. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* 281, 102–108.
- Bertin, A., Leforestier, A., Durand, D., Livolant, F., 2004. Role of histone tails in the conformation and interactions of nucleosome core particles. *Biochemistry* 43, 4773–4780.
- Bouloy, M., Plotch, S.J., Krug, R.M., 1978. Globin mRNA are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4886–4890.
- Bui, M., Whittaker, G., Helenius, A., 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J. Virol.* 70, 8391–8401.
- Bui, M., Wills, E.G., Helenius, A., Whittaker, G.R., 2000. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J. Virol.* 74, 1781–1786.
- Bukrinskaya, A.G., Vorkunova, G.K., Vorkunova, N.K., 1979. Cytoplasmic and nuclear input virus RNPs in influenza virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 45, 557–567.
- Clapier, C.R., Langst, G., Corona, D.F., Becker, P.B., Nightingale, K.P., 2001. A critical epitope for substrate recognition by the nucleosome remodeling ATPase ISWI. *Mol. Cell. Biol.* 21, 875–883.
- Compans, R.W., Content, J., Duesberg, P.H., 1972. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J. Virol.* 10, 795–800.
- de la Luna, S., Martin, J., Portela, A., Ortin, J., 1993. Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from simian virus 40 recombinant viruses. *J. Gen. Virol.* 74, 535–539.
- Duesberg, P.H., 1969. Distinct subunits of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J. Mol. Biol.* 42, 485–499.
- Elster, C., Larsen, K., Gagnon, J., Ruigrok, R.W.H., Baudin, F., 1997. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localisation signal. *J. Gen. Virol.* 78, 1589–1596.
- Hampsey, M., Reinberg, D., 2003. Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* 113, 429–432.
- Heggeness, M.H., Smith, P.R., Ulmanen, I., Krug, R.M., Choppin, P.W., 1982. Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus. *Virology* 118, 466–470.
- Helenius, A., 1992. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69, 577–578.
- Huang, T.S., Palese, P., Krystal, M., 1990. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J. Virol.* 64, 5669–5673.
- Huang, X., Liu, T., Muller, J., Levandowski, R.A., Ye, Z., 2001. Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology* 287, 405–416.
- Iseñi, F., Barge, A., Baudin, F., Blondel, D., Ruigrok, R.W., 1998. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J. Gen. Virol.* 12, 2909–2919.
- Kimura, N., Nishida, M., Nagata, K., Ishihama, A., Oda, K., Nakada, S., 1992. Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J. Gen. Virol.* 73, 1321–1328.
- Lamb, R.A., Choppin, P.W., 1983. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 467–506.
- López-Turiso, J.A., Martínez, C., Tanaka, T., Ortín, J., 1990. The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res.* 16, 325–336.
- Martin, K., Helenius, A., 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67, 117–130.
- Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., Martin, J., Nieto, A., Ortin, J., Portela, A., 1994. Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia virus-T7 RNA polymerase expression system. *J. Gen. Virol.* 75, 2109–2114.
- Morales, V., Richard-Foy, H., 2000. Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7230–7237.
- Murti, K.G., Webster, R.G., Jones, I.M., 1988. Localization of RNP polymerases on influenza viral ribonucleoprotein by immunogold labeling. *Virology* 164, 562–566.
- Neumann, G., Hughes, M.T., Kawaoka, Y., 2000. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* 19, 6751–6758.
- O’Neill, R.E., Talon, J., Palese, P., 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 17, 288–296.
- Patterson, S., Gross, J., Oxford, J.S., 1988. The intercellular distribution of influenza virus matrix protein and nucleoprotein in infected cells and their relationship to hemagglutinin in the plasma membrane. *J. Gen. Virol.* 69, 1859–1872.
- Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I., Krug, R.M., 1981. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* 23, 847–858.
- Rao, P., Yuan, W., Krug, R.M., 2003. Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *EMBO J.* 22, 1188–1198.
- Ruigrok, R.W., Baudin, F., 1995. Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J. Gen. Virol.* 76, 1009–1014.
- Ruigrok, R.W., Calder, L.J., Wharton, S.A., 1989. Electron microscopy of the influenza virus submembranous structure. *Virology* 73, 311–316.
- Sha, B., Luo, M., 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat. Struct. Biol.* 4, 239–244.
- Schoehn, G., Mavrikakis, M., Albertini, A., Wade, R., Hoenger, A., Ruigrok, R.W., 2004. The 12 Å structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J. Mol. Biol.* 339, 301–312.
- Schulze, I.T., 1972. The structure of influenza virus. II. A model based on the morphology and composition of subviral particles. *Virology* 47, 181–196.
- Sugrue, R.J., Hay, A.J., 1991. Structural characteristics of the M2 protein of the influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* 180, 617–624.
- Whittaker, G., Bui, M., Helenius, A., 1996. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J. Virol.* 70, 2743–2756.
- Ye, Z., Robinson, D., Wagner, R.R., 1995. Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. *J. Virol.* 69, 1964–1970.
- Zhimov, O.P., Klenk, H.-D., 1997. Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology* 235, 302–310.

Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2)

Hatice Akarsu^{1,2}, Wilhelm P. Burmeister^{1,2}, Carlo Petosa¹, Isabelle Petit¹, Christoph W. Müller¹, Rob W. H. Ruigrok^{1,2} and Florence Baudin^{1,2,3,4}

¹EMBL Grenoble Outstation, BP 181, 38042 Grenoble cedex 9, ²Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale, EA 2939, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, 38706 La Tronche and ³Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble cedex 1, France

⁴Corresponding author
e-mail: baudin@embl-grenoble.fr

H. Akarsu, W. P. Burmeister and C. Petosa contributed equally to this work

During influenza virus infection, viral ribonucleo proteins (vRNPs) are replicated in the nucleus and must be exported to the cytoplasm before assembling into mature viral particles. Nuclear export is mediated by the cellular protein Crm1 and putatively by the viral protein NEP/NS2. Proteolytic cleavage of NEP defines an N-terminal domain which mediates RanGTP-dependent binding to Crm1 and a C-terminal domain which binds to the viral matrix protein M1. The 2.6 Å crystal structure of the C-terminal domain reveals an amphipathic helical hairpin which dimerizes as a four-helix bundle. The NEP–M1 interaction involves two critical epitopes: an exposed tryptophan (Trp78) surrounded by a cluster of glutamate residues on NEP, and the basic nuclear localization signal (NLS) of M1. Implications for vRNP export are discussed.

Keywords: Crm1 RanGTP/influenza A virus/M1 protein/NEP (NS2) protein/nuclear export

Introduction

Influenza virus has a single-stranded RNA genome composed of eight negative-sense RNA segments (reviewed by Lamb and Krug, 2001). The 3' and 5' ends of the viral RNA (vRNA) segments are bound to a heterotrimeric RNA-dependent RNA polymerase (Murti *et al.*, 1988), whereas the rest of the vRNA is encapsidated by the viral nucleoprotein (NP) (Klumpp *et al.*, 1997; Martín-Benito *et al.*, 2001). Inside the virus, the eight ribonucleoprotein particles (vRNPs) associate with the matrix protein M1, which in turn is bound to the viral membrane and the cytoplasmic tails of the glycoproteins. Following fusion of the viral and cellular membranes during infection, the vRNPs dissociate from M1 and are released into the cytoplasm (Martin and Helenius, 1991). They are then actively imported into the nucleus where viral transcription and replication take place (Whittaker *et al.*, 1996; Bui *et al.*, 2000). Newly synthesized vRNPs are subsequently exported to the

cytoplasm to form new virus particles at the plasma membrane.

The nuclear export of vRNPs is mediated by the cellular protein Crm1/exportin1 (Elton *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001), a member of the importin β family of nuclear transport receptors (reviewed in Weis, 2003). Crm1 mediates the nuclear export of numerous proteins bearing a leucine-rich nuclear export signal (NES) (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Like other exportins, the affinity of Crm1 for its NES-containing cargo is greatly enhanced in the presence of the small GTPase Ran. Indeed, formation of a cooperative ternary complex with Crm1 and RanGTP is good evidence that a given substrate is a bona fide export cargo of Crm1 (Fornerod *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Crm1 also exports snurportin1, which lacks a leucine-rich NES (Paraskeva *et al.*, 1999), and certain viral RNA species. In particular, Crm1 mediates the export of unspliced HIV-1 mRNA via the adaptor protein Rev, which possesses a leucine-rich NES and binds to the Rev response element (RRE) of HIV-1 mRNA (Meyer and Malim, 1994; Fischer *et al.*, 1995; Askjaer *et al.*, 1998).

There is considerable evidence that the 14.5 kDa protein NEP ('nuclear export protein', formerly called NS2), behaves as an adaptor protein analogous to HIV-1 Rev by mediating the association of Crm1 with vRNPs. NEP associates with the matrix protein M1 (Yasuda *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1995), which binds vRNPs with high affinity (Baudin *et al.*, 2001) and whose nuclear localization is essential for vRNP export (Martin and Helenius, 1991; Whittaker *et al.*, 1996; Bui *et al.*, 2000). NEP contains a leucine-rich NES which can functionally replace that of Rev to mediate the nuclear export of RRE-containing RNAs, and which, when fused to a heterologous protein, directs the latter's export from mammalian cell nuclei (O'Neill *et al.*, 1998; Paragas *et al.*, 2001). Biochemical and yeast two-hybrid assays show that NEP interacts with Crm1 and with certain nucleoporins (Elton *et al.*, 2001; Paragas *et al.*, 2001). Anti-NEP antibodies block vRNP export when microinjected into the nucleus (O'Neill *et al.*, 1998), while recombinant virus lacking NEP is defective for vRNP export (Neumann *et al.*, 2000). Inhibition of Raf signalling results in impaired function of NEP and nuclear retention of vRNPs (Pleschka *et al.*, 2001).

Here we show that limited proteolysis of NEP defines an N- and C-terminal domain bearing Crm1- and M1-binding activities, respectively. We present the crystal structure of the C-terminal domain of NEP at 2.6 Å resolution and we identify the structural epitopes which mediate recognition of M1. Implications for vRNP export are discussed.

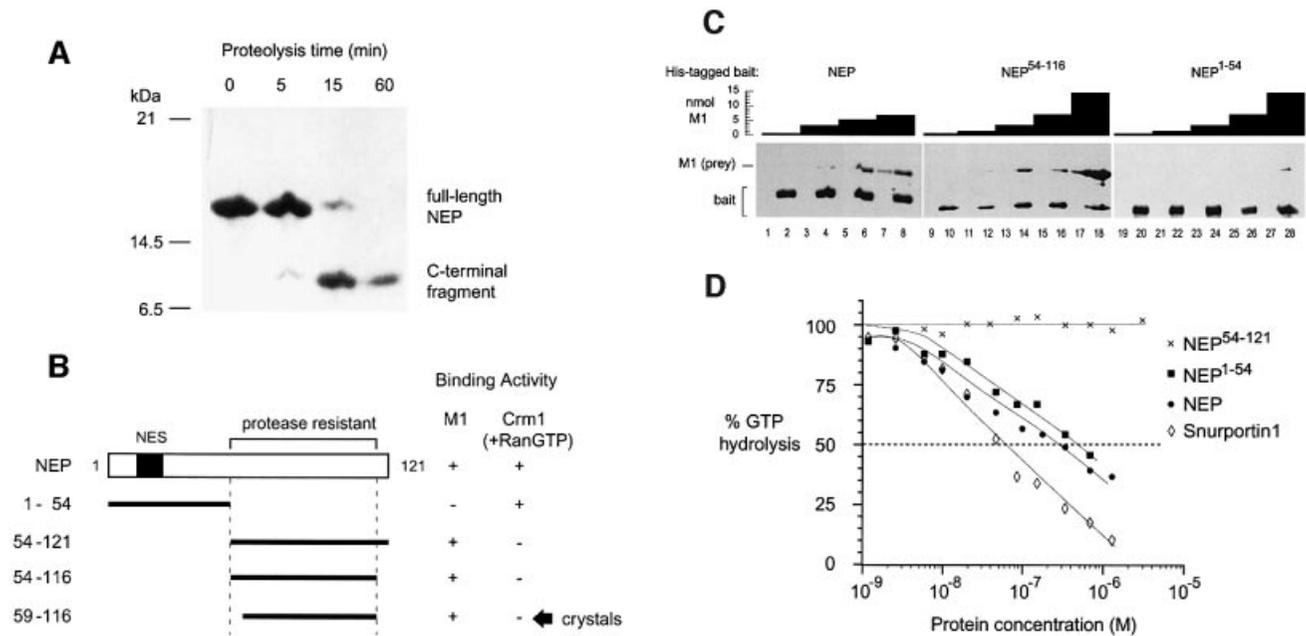


Fig. 1. Proteolysis of NEP defines two functionally distinct domains. **(A)** Proteolytic time course. NEP was incubated with elastase in a 1000:1 molar ratio at 20°C. The reaction was stopped with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) at the times shown. **(B)** Summary of deletion mutants. Fragment NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ was obtained by subtilisin cleavage of NEP⁵⁴⁻¹¹⁶. **(C)** The C-terminal domain of NEP mediates binding to M1. Nickel-agarose beads preincubated with a His-tagged NEP construct ('bait') (even-numbered lanes) or buffer (odd-numbered lanes) were incubated with the indicated amounts of untagged M1 ('prey'). After washing, bound proteins were eluted and analyzed by denaturing gel electrophoresis. **(D)** The N-terminal domain of NEP mediates RanGTP-dependent binding to Crm1. Ran- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ and Crm1 were incubated with various concentrations of snurportin1 or an NEP construct. The GTPase reaction was initiated by addition of RanGAP and hydrolysis of Ran-bound GTP was determined as ^{32}P release. Both NEP and NEP¹⁻⁵⁴, but not NEP⁵⁴⁻¹²¹, bound cooperatively with RanGTP to Crm1, causing a decrease in GTP hydrolysis. Data points represent the mean of three independent measurements, and in all cases the standard deviation did not exceed 10% of the mean value.

Results and discussion

Proteolysis of NEP defines an N-terminal domain with RanGTP-dependent Crm1 binding activity and a C-terminal M1-binding domain

Because we were unable to obtain crystals of full-length NEP we used limited proteolysis to probe the domain structure of NEP. Recombinant NEP purified from *Escherichia coli* and treated with elastase, trypsin or chymotrypsin yielded a proteolytically resistant fragment of ~7 kDa (Figure 1A), identified by N-terminal sequencing and mass spectrometry to comprise residues 54–116. In contrast, the N-terminal half bearing the NES motif appeared to be rapidly degraded. Similar results have been reported for the digestion of NEP with either trypsin or V8 protease (Lommer and Luo, 2002). Based on these findings, we constructed deletion mutants NEP¹⁻⁵⁴ and NEP⁵⁴⁻¹²¹ (Figure 1B). Both constructions yielded soluble proteins when expressed in *E. coli*.

To test these constructs for M1 binding activity, we performed pull-down assays in which nickel-agarose beads preincubated with a His-tagged NEP construct were subsequently incubated with untagged M1 (Figure 1C). Although some M1 bound non-specifically to beads in the absence of NEP (lane 7), binding was substantially enhanced in the presence of NEP (lanes 4, 6 and 8), reflecting a direct association between NEP and M1. M1 exhibited a roughly similar degree of binding toward NEP⁵⁴⁻¹²¹ as toward NEP (lanes 9–18), but had comparatively little affinity for NEP¹⁻⁵⁴ (lanes 19–28). Thus,

NEP⁵⁴⁻¹²¹ appears to mediate the interaction with M1. This agrees with a previous report implicating the C-terminal 70 residues of NEP in binding M1 (Ward *et al.*, 1995).

To test the NEP deletion mutants for their ability to function as a nuclear export cargo for Crm1, we performed a kinetic assay routinely used to measure RanGTP-dependent Crm1 binding activity (Bischoff *et al.*, 1995). This assay exploits the fact that GTP hydrolysis by Ran is stimulated by the RanGTPase activating protein (RanGAP) but inhibited by the association of RanGTP with Crm1. In a reaction mixture containing Crm1, RanGTP and RanGAP, the addition of a nuclear export cargo enhances the affinity of Crm1 for RanGTP, thereby causing a reduced rate of GTP hydrolysis, whereas substrates which fail to bind Crm1 or bind independently of RanGTP have no effect. As a positive control we tested snurportin1, a trimethylguanosine ($m^3\text{G}$) cap binding protein which is efficiently exported by Crm1 (Paraskeva *et al.*, 1999). We observed a 50% reduction in GTP hydrolysis in the presence of 50 nM snurportin1 (Figure 1D), in agreement with published results (Paraskeva *et al.*, 1999). Next, we confirmed that full-length NEP behaved as a Crm1 export cargo in this assay: as little as 8 nM NEP yielded a detectable decrease in GTP hydrolysis, while 500 nM NEP gave a 50% reduction (Figure 1D). Thus the apparent affinity of Crm1 for NEP is similar to that reported for HIV Rev (Paraskeva *et al.*, 1999). Finally, we tested the two NEP deletion mutants. Consistent with the presence of the Leu-rich NES motif, the NEP¹⁻⁵⁴ construct showed significant RanGTP-dependent Crm1 binding activity which was comparable

Table I. Data collection, phasing and refinement statistics

	Native	PtCl ₄ derivative (I)	PtCl ₄ derivative (II)	OsCl ₆ derivative
Data collection				
Resolution (Å)	2.6 (2.74–2.60)	3.50 (3.69–3.50)	3.50 (3.69–3.50)	2.8 (2.95–2.80)
Completeness	0.996 (1.000)	0.991 (0.986)	1.000 (1.000)	0.965 (0.817)
Multiplicity	3.8 (3.8)	6.7 (6.8)	14.9 (15.5)	6.0 (3.1)
<i>I</i> / σ	6.0 (2.0)	5.5 (2.3)	3.4 (2.0)	4.9 (3.9)
<i>R</i> _{merge}	0.090 (0.32)	0.083 (0.326)	0.102 (0.330)	0.093 (0.168)
<i>R</i> _{anomalous}		0.065 (0.148)	0.063 (0.107)	0.043 (0.147)
Phasing				
Overall FOM	Overall 0.33	At 4.6 Å: 0.71	At 3.4 Å: 0.28	At 2.9 Å: 0.06
FOM after RESOLVE	Overall 0.54	At 4.6 Å: 0.89	At 3.3 Å: 0.60	At 2.6 Å: 0.15
Refinement				
No. of reflections working set	6962			
<i>R</i> _{cryst}	0.176 (0.225)			
<i>R</i> _{free}	0.244 (0.319)			
Average <i>B</i> factor (Å ²)	43.5			
R.m.s. bonds (Å)	0.043			
R.m.s. angles (°)	3.3			

A test set containing 5% of the reflections was used throughout the refinement. Values for the highest resolution bin are given in parentheses.

to that of the full-length protein (Figure 1D). In contrast, the addition of NEP^{54–121} had no effect on GTP hydrolysis, even at the highest concentration tested (20 μ M) (Figure 1D). Thus NEP appears to be a modular protein composed of a protease-sensitive N-terminal domain which mediates RanGTP-dependent Crm1 binding, and a protease-resistant C-terminal domain chiefly responsible for M1 binding.

Crystal structure of the NEP C-terminal domain

Although NEP^{1–54} failed to crystallize and NEP^{54–121} yielded crystals of only poor quality, we could obtain well-diffracting crystals by digesting a slightly shorter construct (NEP^{54–116}) with subtilisin to obtain the C-terminal fragment NEP^{59–116} (Figure 1B). Crystals belong to space group *P*3₂21, with cell parameters *a* = *b* = 82.7 Å, *c* = 61.1 Å, and two molecules per asymmetric unit. Phases obtained using two heavy-atom derivatives resulted in a 2.6 Å experimental map which was readily interpreted (Table I). The final model, with *R*_{cryst} = 0.176 and *R*_{free} = 0.244, includes residues 63–116 and 48 water molecules. Residues 59–62 are disordered.

The C-terminal NEP domain forms a helical hairpin with approximate dimensions 40 × 25 × 15 Å (Figure 2A). Residues 64–85 and 94–115 comprise helices C1 and C2, respectively, while residues 86–93 form the interhelical turn. The two helices are equal in length and nearly perfectly antiparallel, giving the structure a remarkably flat appearance. Because of their shallow crossing angle (14°), the two helices share extensive contacts over their entire length, the majority of which are hydrophobic in nature. These are mediated by a total of 12 hydrophobic and four polar residues, with the two helices contributing one or two side chains from each of their six helical turns (Figure 2A and B). The hairpin is further stabilized by interactions involving three arginine residues from helix C1: Arg84 forms a hydrogen bond with glutamine Gln96, Arg77 forms a bifurcated salt bridge with glutamates Glu74 and Glu110, and Arg66 has its guanidium group favourably located near backbone

carbonyl groups at the C-terminus of helix C2, such that its positive charge interacts with the helix dipole (Figure 2A). The eight residues forming the interhelical turn are well ordered (average *B* factors resemble those of helical residues) and include two hydrophobic residues partially buried between the helices. Thus the C-terminal domain is a highly compact unit with little flexibility, explaining its resistance to proteolytic digestion.

The helical hairpin is strikingly amphipathic, with one face hydrophobic and the other hydrophilic (Figure 2C and D). The former contains 16 of the 21 hydrophobic residues present in the domain; these form a broad swathe that extends from the top to the bottom of the hairpin (Figure 2D, bottom left). In contrast, the opposite face bears 15 of the domain's 19 charged residues, almost all of which are located on helix C1. Six glutamate side chains cluster near the centre of this face, whereas basic residues localize to the top and bottom (Figure 2D, top right). This face also contains five hydrophobic residues (Figure 2D, bottom right). Four of these (Ile97, Met100, Leu103 and Leu107) form a continuous groove on the surface; the fifth is a prominently exposed tryptophan (Trp78) located in the centre of the glutamate cluster.

The isolated NEP C-terminal domain is a dimer

In the crystal structure, the hydrophobic face of one helical hairpin is buried against that of a second hairpin, related to the first by a non-crystallographic dyad. The two form an antiparallel four-helix bundle, with helix C1 from one hairpin packing against helix C2 of the other, and all four N- and C- termini located at one end (Figure 3A). The interface between the two monomers buries an accessible surface area of 1268 Å², representing 27% of the total surface area. Comparable values have been observed for homodimers of a similar molecular weight (Jones and Thornton, 1996) and for protein–protein interfaces in general (Lo Conte *et al.*, 1999). Twenty-four residues from each hairpin interact with residues from the other monomer (Figure 2B). Most of these residues mediate hydrophobic contacts, and with only a few exceptions are

identical to those mediating intramonomer contacts between the C1 and C2 helices. These residues are located near the 2-fold axis in each of the six layers defined by the turns of the four helices (Figure 3A). Interactions within and between layers give the helical bundle a tightly packed hydrophobic core, similar to that observed in the interior of globular proteins. Additional interactions stabilizing the dimer are a hydrogen bond between Glu95 and the backbone carbonyl group of Val83, and a salt bridge between Lys72 and glutamates Glu108 and Glu112 (Figure 3A).

The many interactions between the two monomers and the hydrophobic nature of the interface suggest that the observed dimer is not merely an artefact of crystallization, but represents the state of the NEP C-terminal fragment in solution. Indeed, unlike the monomer, the dimer has relatively few solvent-exposed hydrophobic residues and thus is more consistent with the highly soluble nature of this fragment. To verify this, we performed analytical gel filtration on NEP⁵⁴⁻¹¹⁶ and on full-length NEP, which is known to be monomeric (Lommer and Luo, 2002). Despite their nearly 2-fold difference in molecular weight (8.5 versus 14.5 kDa), both NEP⁵⁴⁻¹¹⁶ and full-length NEP elute at the same volume, corresponding to that expected for a globular protein of 15 kDa (Figure 3B). Given that the crystal structures of monomeric and dimeric NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ are both highly compact (i.e. essentially globular), the result is consistent with the C-terminal fragment being dimeric in solution. This conclusion is further supported by the results of a cross-linking study. NEP treated with the cross-linking reagent ethylene glycol bis-succinimidylsuccinate (EGS) yields essentially a single band on a denaturing gel, consistent with a monomeric species (Figure 3C, lanes 1–4). In contrast, treatment of NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ results in the appearance of a second band whose size corresponds to that expected for a dimer (lanes 5–8).

In these experiments, identical results were obtained regardless of whether the C-terminal fragment was expressed from a plasmid or obtained by proteolysis of the full-length protein. Therefore we conclude that proteolytic degradation of the N-terminal domain leads to spontaneous dimerization of the C-terminal domain. A likely explanation is that the N-terminal domain packs against the hydrophobic face of the C-terminal domain in the structure of full-length NEP, sterically hindering access to the dimerization interface; thus proteolysis would remove this steric hindrance. Burial of the hairpin's hydrophobic face by the N-terminal domain would also explain why full-length NEP is highly soluble in the absence of detergents.

NEP/M1 binding is mediated by the NLS motif of M1 and residue Trp78 of NEP

In order to localize the sites of interaction between NEP and M1, we set out to find mutants deficient for binding activity. M1 is known to consist of two domains: an N-terminal domain (residues 1–164), for which the crystal structure is known (Sha and Luo, 1997; Arzt *et al.*, 2001), and a C-terminal domain (residues 165–252) that mediates vRNP binding (Baudin *et al.*, 2001). Pull-down assays performed as above show that NEP⁵⁴⁻¹¹⁶ associates with the N-terminal, but not the C-terminal, domain of M1 (Figure 4B; data not shown). Because NEP has previously

been reported to bind an M1 fragment lacking residues 1–88 (Yasuda *et al.*, 1993), we conclude that a critical NEP binding epitope is located within the M1 N-terminal domain between residues 89 and 164. In the crystal structure of M1¹⁻¹⁶⁴, residues 89–164 form a four-helix bundle constituting a compact subdomain. This subdomain includes an exposed basic motif ¹⁰¹RKLLKR¹⁰⁵ that mediates binding to negatively charged liposomes (Baudin *et al.*, 2001) and is recognized by the cellular import machinery as a nuclear localization signal (NLS) (Ye *et al.*, 1995; Liu and Ye, 2002). We tested the ability of NEP to bind to M1^{mutNLS}, an M1 mutant in which the four basic residues of the NLS are replaced by alanines (¹⁰¹AALAA¹⁰⁵). This mutant was found to have severely reduced NEP binding affinity (Figure 4C). Failure to bind NEP cannot be ascribed to misfolding of the mutant protein, as its N-terminal domain (residues 1–164) has essentially the same crystal structure as that of wild-type M1 (unpublished results). It has been reported that M1 protein bearing a single mutation of either Lys102 or Lys104 is no longer imported into the nucleus of infected cells and results in lethality 72 h after transfection, whereas mutation of R101 or R105 has little effect on M1 nuclear import or RNP export (Liu and Ye, 2002). To assess the relative contribution of the two half-sites of the NLS motif to NEP binding, we constructed double point mutants of M1 in which either residues Arg101 and Lys102 or residues Lys104 and Arg105 were simultaneously replaced by alanine residues (mutants M1^{R101A, K102A} and M1^{K104A, R105A}, respectively). In pull-down experiments, both mutants bound NEP more weakly than wild-type M1 but more strongly than the M1^{mutNLS} mutant which lacks all four basic residues (compare Figure 4A and C with D and E). This indicates that at least one basic residue from each NLS half-site contributes to NEP binding, and that residues in both half-sites are required for full binding activity. Masking of the NLS motif by NEP may ensure that newly exported progeny vRNPs destined for virus assembly at the plasma membrane are not reimported into the nucleus.

We next set out to localize the M1 binding site on NEP. We focused on residues which are solvent exposed in the structure of the NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ dimer, reasoning that residues buried in the dimer were probably also buried in full-length NEP (and hence unable to mediate binding). Thus we examined the hydrophilic face of the helical hairpin, which is not involved in dimer formation, for possible binding epitopes. As described above, a conspicuous feature of this face is the prominently exposed Trp78 residue surrounded by a ring of glutamate residues (Figure 2D). This tryptophan is probably similarly exposed in full-length NEP, as near-UV circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy have shown that the three aromatic residues in NEP are highly solvent accessible and able to rotate freely (Lommer and Luo, 2002). Therefore we constructed an NEP mutant in which Trp78 was replaced by a serine (NEP^{W78S}). We also made a double mutant in which residues Glu81 and Glu82 were substituted by alanines (NEP^{E81A, E82A}). These glutamates have their side chains located next to Trp78 but are not conserved in influenza B virus, where they are replaced by basic residues (Figure 2B and D). A pull-down assay shows that, whereas the double mutant retains significant affinity

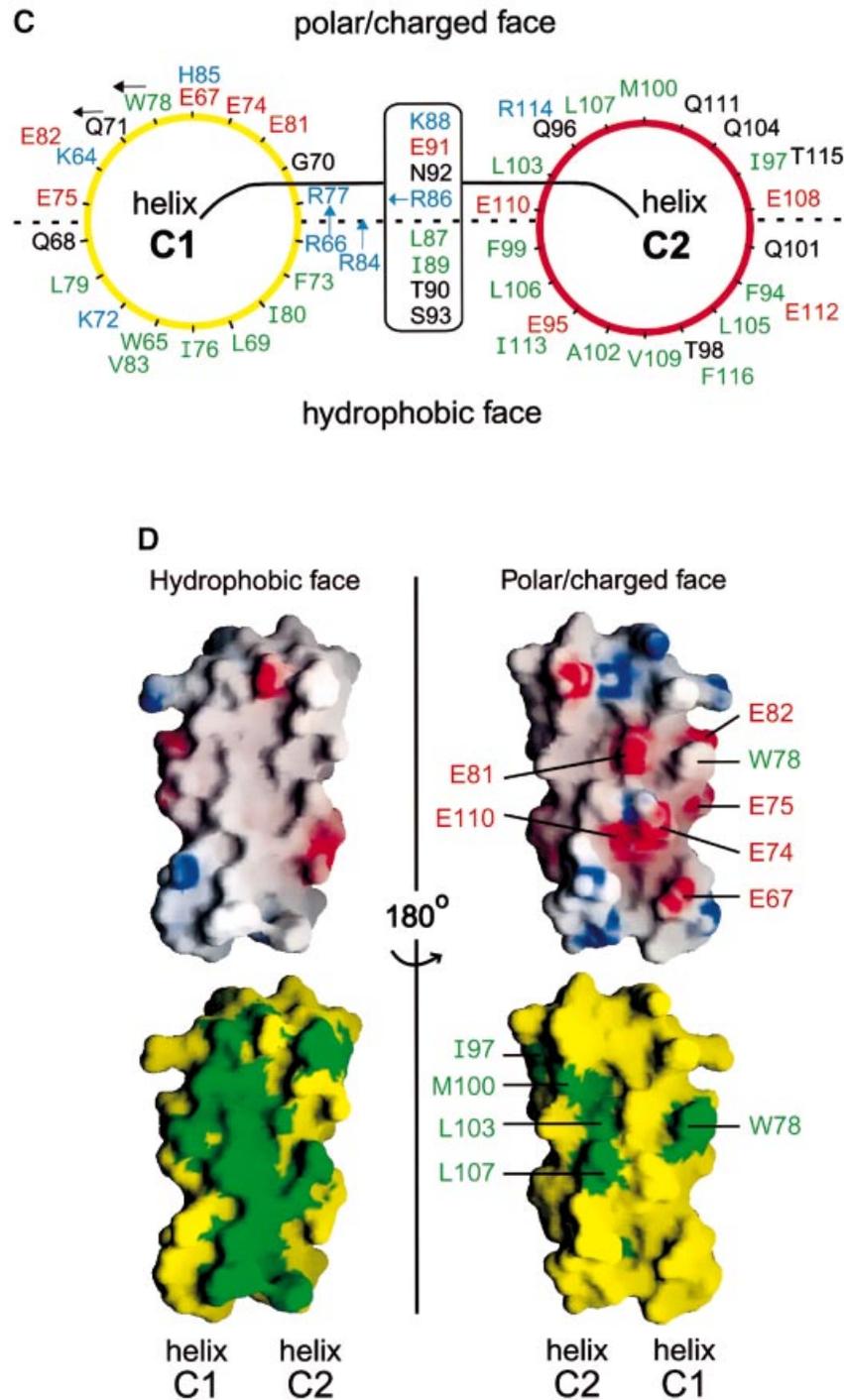


Fig. 2. Structure of the NEP C-terminal domain. (A) Ribbon diagram. The six layers of hydrophobic residues involved in interhelical contacts are shown. Also shown are the hydrogen bond between Arg84 and Gln96, the capping interaction between Arg66 and the C-terminus of helix C2, and the salt bridge involving Arg77, Glu74 and Glu110. For clarity, not all interhelical contacts are shown. (B) Sequence and secondary structure of NEP. Residues conserved between influenza A and B viruses are highlighted in yellow and grey. Residues predicted by the program PHD to be helical with >90% probability are labelled H. The NES motif and residue Trp78 implicated in M1 binding are boxed. Arrows mark limits of the proteolytically resistant fragment; residues in italics are absent from the construct used for structure determination; disordered residues are indicated by the dotted line. Contacts between helices C1 and C2 within one monomer, and those between two monomers of the dimer are indicated as follows: green squares, van der Waals contact involving a hydrophobic residue (filled square) or the aliphatic moiety of a polar residue (empty square); red square, salt bridge; filled black square, hydrogen bond; empty black square, capping interaction of Arg66 with C-terminus of helix C2. Typically, residues from helix C1 interact with those from helix C2 of the same or an adjacent layer. (C) Schematic diagram showing side-chain distribution. Helix C1 is viewed from C- to N-terminus and helix C2 from N- to C-terminus. Hydrophobic, polar, acidic and basic residues are coloured green, black, red and blue, respectively. The side chains of Arg66 and Arg84 emerge from the polar/charged face; those of Gln71, Trp78 and Arg86 point as shown by the arrows. (D) Surface properties of the C-terminal domain. Upper panels: electrostatic surface potential plotted from -10 kT (red) to +10 kT (blue). Lower panels: distribution of hydrophobic (green) and hydrophilic (yellow) side chains. The upper and lower left panels are in the same orientation as (A). The figure was produced using GRASP (Nicholls *et al.*, 1991).

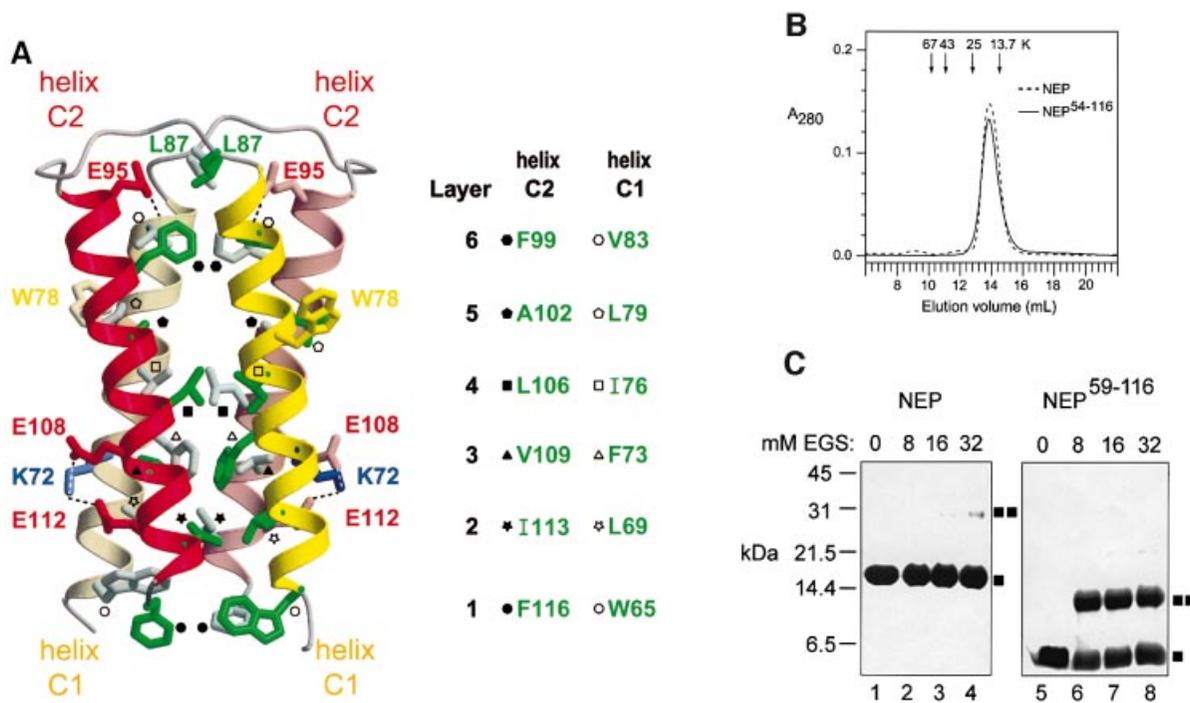


Fig. 3. The NEP C-terminal domain dimer. (A) Ribbon diagram of the four-helix bundle. The two monomers belong to the same asymmetric unit, related by a non-crystallographic dyad running nearly parallel to the individual helices. Six successive layers of interacting side chains define the hydrophobic core. Each of the helices in the bundle contributes one or more side chains per layer, with symmetry-related residues in the same layer. Not all residues in the dimerization interface are shown (but see Figure 2B). Hydrophobic residues in the dimer interface are identified in the legend to the right. Also shown are residue Trp78 implicated in M1 binding, the hydrogen bond between Glu95 and the backbone carbonyl of Val83, and the salt bridge involving Lys72, Glu108 and Glu112. (B) Analytical gel filtration of NEP and NEP⁵⁴⁻¹²¹. Arrows (from left to right) indicate elution volumes of the globular reference proteins bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A and RNase A. The elution volumes of NEP (14.5 kDa) and NEP⁵⁴⁻¹²¹ (8.5 kDa) are nearly identical, suggesting that the latter is a dimer in solution. (C) Cross-linking experiment. NEP or NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ was incubated with the indicated amount of EGS for 1 h on ice. Reactions were quenched by adding 100 mM Tris and analyzed by denaturing gel electrophoresis. Squares indicate the positions of monomers and dimers. Small amounts of the dimeric NEP and tetrameric NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ species at high EGS concentrations are probably due to transient interactions between molecules in solution.

somewhat different between the two viral types. Indeed, the M1 NLS motif in influenza A, (¹⁰¹RKLKR¹⁰⁵) differs from the corresponding motif in influenza B (RKMRR) at two positions. We speculate that the replacement of NEP residue Trp78 by the shorter Leu side chain is compensated by the replacement of M1 residues Leu103 and Lys104 by the longer Met and Arg side chains, permitting the mode of M1–NEP interaction to be essentially preserved between the two viral types.

Speculations about vRNP export

Although NEP putatively mediates the association of Crm1 with vRNPs, we have been unable to detect a direct interaction *in vitro* between NEP and either NP or RNP (data not shown). This suggests that M1 may mediate the association of NEP with vRNPs, consistent with the interaction of M1 with vRNPs being essential for export (Martin and Helenius, 1991; Whittaker *et al.*, 1995; Bui *et al.*, 2000). Epitopes located in different domains of NEP mediate binding to M1 and Crm1, just as epitopes in different domains of M1 mediate binding to NEP and vRNP. Therefore it is possible that a ‘daisy-chain’ complex of Crm1, NEP, M1 and vRNP exists without the individual binary interactions interfering with one another (Figure 5A). Indirect evidence for this comes from

a GTPase assay in which Crm1 and RanGTP are incubated with NEP (Figure 5B). Neither the addition of M1 nor that of M1 plus vRNPs significantly alters the ability of NEP to inhibit GTP hydrolysis. Thus RanGTP-dependent recognition of NEP by Crm1 appears to be compatible with the presence of M1 and vRNP. The use of two adaptor proteins (NEP and M1) instead of just one between Crm1 and vRNP may offer influenza virus the possibility of greater regulatory control, especially since NEP binds the NLS motif of M1, an epitope involved in many other interactions. Masking of the NLS motif of M1 by NEP could ensure that the complex is not directly reimported to the nucleus when exported towards the cytoplasm. The putative use of two adaptor proteins for vRNP export is reminiscent of the situation in Crm1-mediated U snRNA export: Crm1 binds to the adaptor protein PHAX, which in turn recognizes a second adaptor, CBC, bound directly to U snRNA (Ohno *et al.*, 2000).

We note that, of the viral components tested, only NEP binds Crm1 cooperatively with RanGTP (Figure 5B). NP has also been proposed to mediate vRNP export, as it encapsidates vRNA, shuttles between the nucleus and the cytoplasm (Whittaker *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1997) and interacts directly with Crm1 *in vitro* (Elton *et al.*, 2001). We have confirmed that Crm1 interacts directly

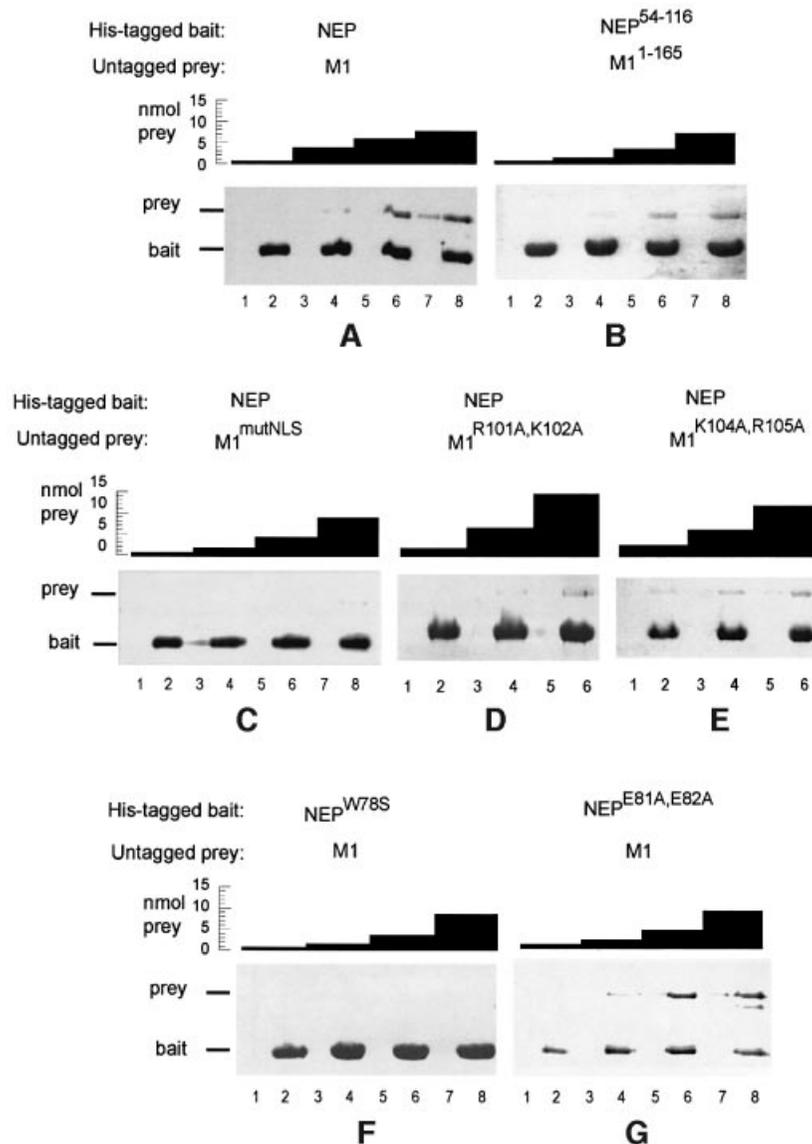


Fig. 4. NEP residue Trp78 and the NLS of M1 mediate NEP–M1 binding. Nickel–agarose beads preincubated with a His-tagged NEP construct ('bait') (even-numbered lanes) or buffer (odd-numbered lanes) were incubated with the indicated amounts of untagged M1 or an M1 mutant ('prey'). After washing, bound proteins were eluted and analyzed by denaturing gel electrophoresis. (A) NEP binds to M1. (B) The C-terminal NEP domain binds to the N-terminal domain of M1. (C) Mutation of the NLS motif in M1 severely reduces binding to NEP. (D) Mutation of R101 and K102 residues in M1 reduces binding to NEP. (E) Mutation of K104 and R105 residues in M1 reduces binding to NEP. (F) Mutation of NEP residue Trp78 disrupts binding to M1. (G) Mutation of NEP residues Glu81 and Glu82 has little effect on binding to M1.

with vRNP in a cosedimentation assay (not shown); however, our GTPase assay suggests that this interaction is not RanGTP dependent (Figure 5B).

The efficient passage of particularly large molecules through the nuclear pore complex has been shown to require the recruitment of more than one nuclear transport receptor (Ribbeck and Görlich, 2002). Indirect evidence suggesting that several Crm1 molecules are required for Rev-mediated export of unspliced HIV mRNA is the observation that export critically depends on the cooperative assembly of Rev multimers on the Rev response element (RRE). For example, stem-loop IIB within the RRE has high affinity for Rev monomers but is unable to direct Rev-mediated RNA export (Huang *et al.*, 1991; Mann *et al.*, 1994), while Rev variants or

mutants unable to form multimeric complexes are defective in the nuclear export of unspliced RRE-containing mRNAs (Malim *et al.*, 1989; Malim and Cullen, 1991; Thomas *et al.*, 1998). Similar evidence is lacking for the export of influenza vRNPs, but their large size (average ~5 MDa) suggests that they may also recruit several Crm1 molecules. Although the precise M1:vRNP binding stoichiometry during export is undetermined, the results from a number of studies suggest that an individual vRNP can bind several M1 molecules (Watanabe *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 1999; Baudin *et al.*, 2001). Thus association of NEP with more than one of these would permit a single vRNP to recruit multiple Crm1 molecules (Figure 5A). Experiments to test this hypothesis are currently under way.

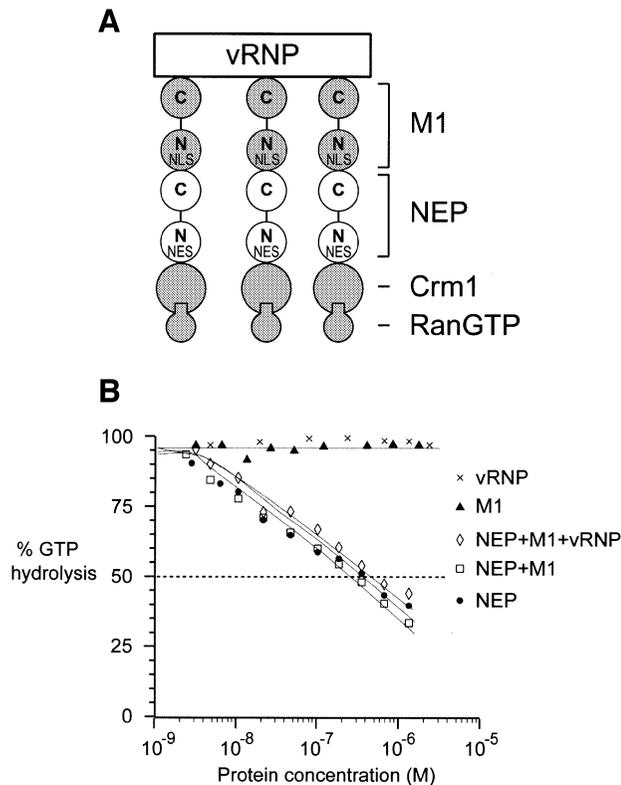


Fig. 5. Possible interactions among influenza viral components. (A) A hypothetical export complex. Crm1/RanGTP binds to NEP, NEP binds to M1 and M1 binds to vRNP. The binding surfaces involved in the individual interactions are spatially distinct. The N- and C-terminal domains and NLS and NES motifs of M1 and NEP are indicated. A single vRNP may recruit several molecules of Crm1. (B) RanGTPase assay involving several viral components. The assay was performed essentially as for Figure 1D. NEP, but not M1 or vRNP, binds to Crm1 cooperatively with RanGTP. NEP preincubated with an equimolar amount of M1 or with M1 plus vRNP behaves similarly to NEP alone.

Materials and methods

Viral components and nuclear transport proteins

Expression and purification of M1, M1¹⁻¹⁶⁵, M1¹⁶⁵⁻²⁵² and M1^{mutNLS} (Baudin *et al.*, 2001) and isolation of vRNP and NP from influenza virus A/PR/8/34 (Baudin *et al.*, 1994; Klumpp *et al.*, 1997) have been described. The DNA coding for NEP was PCR amplified from the gene encoding the alternative splice variant NS1 (influenza virus A/WSN/33) and subcloned into pET16b (Novagen) using sites *NdeI* and *XhoI*; deletion mutants NEP¹⁻⁵⁴, NEP⁵⁴⁻¹¹⁶ and NEP⁵⁴⁻¹²¹ were subcloned using a Mutagenesis Ex-site kit (Stratagene). NEP and mutant proteins were expressed as N-terminally His-tagged proteins in *E. coli* BL21(DE3) by induction with 0.5 mM isopropylthiogalactoside at 30°C for 4 h. Proteins were purified by Ni-NTA chromatography followed by gel filtration on Superdex 75 (Pharmacia) in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 and 150 mM NaCl.

His-tagged Crm1 was expressed from a pQE60 plasmid in *E. coli* strain Tg1 by induction with 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 30°C for 4 h. His-tagged Snurportin 1 was expressed from a pQE30 plasmid in *E. coli* BL21(DE3) by induction with 0.1 mM IPTG for 4 h at 37°C. Both Crm1 and Snurportin 1 were purified on Ni-NTA-agarose, followed by monoQ chromatography and gel filtration on Superdex 200 (Pharmacia). Untagged Ran (Klebe *et al.*, 1995) and His-tagged Rna1p (Bischoff *et al.*, 1995) were purified as described.

Crystallization and structure determination

We obtained crystals of NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ while attempting to crystallize a complex of NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ bound to M1¹⁻¹⁶⁵. A complex of the two proteins purified by Superdex 75 chromatography (Pharmacia) was concentrated to 20 mg/ml. Despite the presence of M1¹⁻¹⁶⁵, crystals of the unbound NEP⁵⁹⁻¹¹⁶ species were obtained by hanging-drop vapour diffusion. The

high ionic strength of the precipitant (0.4 M ammonium di-phosphate) probably caused dissociation of the complex.

Heavy-atom derivatives were prepared by soaking crystals in 5 mM K₂PtCl₄ for 2 h (derivative I) or 4 h (derivative II), or in 5 mM K₂OsCl₆ (2 h) in 0.4 M ammonium diphosphate. Data were collected at 100K using 20% glycerol as the cryoprotectant on an ADSC area detector at ESRF beamline ID14-2. Data were processed using MOSFLM (Leslie *et al.*, 1992) and programs from the CCP4 suite (CCP4, 1994). Two heavy-atom sites were located in the platinum derivatives by SOLVE (Terwilliger and Berentzen, 1999), yielding an interpretable map after phase improvement with RESOLVE (Terwilliger, 2000) which automatically traced most of the main chain. Two low-occupancy Os sites were subsequently included for phasing at 2.8 Å resolution, and a final map was calculated to 2.6 Å resolution using non-crystallographic symmetry. Sixty-nine complete residues out of 116 were docked into the map by RESOLVE. The model was completed using O (Jones *et al.*, 1991) and refined using REFMAC (Winn *et al.*, 2001), treating the four helices of the dimer as independent TLS groups. The crystal packing was consistent with two possible choices of the biological dimer. However, the non-crystallographic dimer was easily assigned as the relevant one because of the large size and hydrophobic nature of its interface. Coordinates were deposited in the Protein Data Bank (accession No. 1PD3).

GTPase assays

Assays were performed as described (Bischoff *et al.*, 1995; Kutay *et al.*, 1997). First, 200 pmol of Ran were labelled with 30 nM [γ -³²P]GTP (5000 Ci/mmol). To measure substrate activities, 8 pmol of Ran [γ -³²P]GTP were incubated with 2 μ M Crm1 and 0.001–20 μ M of the tested substrate in a volume of 100 μ l. After incubating for 15 min at 4°C, 10 μ l aliquots of 0.1 μ M Rna1p (the *Schizosaccharomyces pombe* RanGAP) were added to the mix and incubated for a further 2 min at 25°C. The reaction was stopped with 1 ml of activated charcoal and centrifuged (2 min at 12 000 g). Radioactivity in the supernatant was counted on a Wallac 1410 scintillation counter.

Pulldown assays

Twenty microlitres of magnetic Ni²⁺-agarose beads (Qiagen) preincubated (20 min, 20°C) with a His-tagged bait protein in 80 μ l of buffer I (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM imidazole, 300 mM NaCl, 15 mM MgCl₂), were incubated with an untagged prey protein in 160 μ l of buffer I (30 min, 4°C). After washing twice with buffer I, beads were eluted with 20 μ l of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM imidazole and 500 mM NaCl.

Acknowledgements

We thank Peter Askjaer and Iain Mattaj for providing clones for Crm1, Ran, Rna1p and snurportin1, Martine Moulin for help with protein purification and Steffi Arzt for help with data collection on ID14 (ESRF).

References

- Arzt,S., Baudin,F., Barge,A., Timmins,P., Burmeister,W.P. and Ruigrok,R.W.H. (2001) Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology*, **279**, 439–446.
- Askjaer,P., Heick Jensen,T., Nilsson,J., Engelmeier,L. and Kjems,J. (1998) The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33414–33422.
- Baudin,F., Bach,C., Cusack,S. and Ruigrok,R.W.H. (1994) Structure of influenza RNP.I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to solvent. *EMBO J.*, **13**, 3158–3165.
- Baudin,F., Petit,I., Weissenhorn,W. and Ruigrok,R.W.H. (2001) *In vitro* dissection of the membrane binding and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*, **281**, 102–108.
- Bischoff,F.R., Krebber,H., Smirnova,E., Dong,W. and Ponstingl,H. (1995) Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J.*, **14**, 705–715.
- Bui,M., Wills,E.G., Helenius,A. and Whittaker,G.R. (2000) Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J. Virol.*, **74**, 1781–1786.

- CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D*, **50**, 760–763.
- Conti, E. and Kuriyan, J. (2000) Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . *Structure Fold Des.*, **8**, 329–338.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. and Kuriyan, J. (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell*, **94**, 193–204.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J. and Digard, P. (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J. Virol.*, **75**, 408–419.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., Luhrmann, R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, **82**, 475–483.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I.W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051–1060.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, **390**, 308–311.
- Huang, X.J., Hope, T.J., Bond, B.L., McDonald, D., Grahl, K. and Parslow, T.G. (1991) Minimal Rev-response element for type 1 human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, **65**, 2131–2134.
- Jones, S. and Thornton, J.M. (1996) Principles of protein–protein interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 13–20.
- Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A*, **47**, 110–119.
- Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. and Goody, R.S. (1995) The kinetic mechanism of Ran–nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry*, **34**, 12543–12552.
- Klumpp, K., Ruigrok, R.W.H. and Baudin, F. (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J.*, **16**, 1248–1257.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., Görlich, D. (1997) Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, **90**, 1061–1071.
- Lamb, R.A. and Krug, R.M. (2001) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In Fields, B.N. *et al.* (eds), *Fields' Virology*, 4th edn. Lippincott–Raven, Philadelphia, PA, pp. 1487–1531.
- Leslie, A.G. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. In Wolf, W.M. and Wilson, K.S. (eds), *Joint CCP4 and ESF-EADBM Newsletter on Protein Crystallography*, No. 26. SERC Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- Liu, T. and Ye, Z. (2002) Restriction of viral replication by mutation of the influenza virus matrix protein. *J. Virol.*, **76**, 13055–13061.
- Lo Conte, L., Chothia, C. and Janin, J. (1999) The atomic structure of protein–protein recognition sites. *J. Mol. Biol.*, **285**, 2177–2198.
- Lommer, B.S. and Luo, M. (2002) Structural plasticity in influenza virus protein NS2 (NEP). *J. Biol. Chem.*, **277**, 7108–7117.
- Ma, K., Roy, A.M. and Whittaker, G.R. (2001) Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology*, **282**, 215–220.
- Malim, M.H. and Cullen, B.R. (1991) HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell*, **65**, 241–248.
- Malim, M.H., Bohnlein, S., Hauber, J., Cullen, B.R. (1989) Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator—derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell*, **58**, 205–214.
- Mann, D.A. *et al.* (1994) A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J. Mol. Biol.*, **241**, 193–207.
- Martin, K. and Helenius, A. (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, **67**, 117–130.
- Martin-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortin, J. (2001) Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep.*, **2**, 313–317.
- Meyer, B.E. and Malim, M.H. (1994) The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.*, **8**, 1538–1547.
- Murti, K.G., Webster, R.G. and Jones, I.M. (1988) Localization of RNA polymerase on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology*, **164**, 562–566.
- Neumann, G., Castrucci, M.R. and Kawaoka, Y. (1997) Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J. Virol.*, **71**, 9690–9700.
- Neumann, G., Hughes, M.T. and Kawaoka, Y. (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.*, **19**, 6751–6758.
- Nicholls, A., Sharp, K. and Honig, B. (1991) Protein folding and association: insight from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **11**, 281–296.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. and Mattaj, I.W. (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell*, **101**, 187–198.
- O'Neill, R.E., Talon, J. and Palese, P. (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.*, **17**, 288–296.
- Paragas, J., Talon, J., O'Neill, R.E., Anderson, D.K., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2001) Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. *J. Virol.*, **75**, 7375–7383.
- Paraskeva, E., Izzaualde, E., Bischoff, F.R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R. and Görlich, D. (1999) CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J. Cell Biol.*, **145**, 255–264.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R. and Ludwig, S. (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 301–305.
- Ribbeck, K. and Görlich, D. (2002) The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.*, **21**, 2664–2671.
- Sha, B. and Luo, M. (1997) Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 239–244.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K. (1997) Exportin 1 (CRM1) is an essential nuclear export factor. *Cell*, **90**, 1041–1050.
- Terwilliger, T.C. (2000) Maximum likelihood density modification. *Acta Crystallogr. D*, **56**, 965–972.
- Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D*, **55**, 849–861.
- Thomas, S.L., Oft, M., Jaksche, H., Casari, G., Heger, P., Dobrovnik, M., Bevec, D. and Hauber, J. (1998) Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J. Virol.*, **72**, 2935–2944.
- Ward, A.C., Castelli, L.A., Lucantoni, A.C., White, J.F., Azad, A.A. and Macreadie, I.G. (1995) Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus. *Arch. Virol.*, **140**, 2067–2073.
- Watanabe, K., Handa, H., Mizumoto, K. and Nagata, K. (1996) Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J. Virol.*, **70**, 241–247.
- Watanabe, K., Takizawa, N., Katoh, M., Hoshida, K., Kobayashi, N. and Nagata, K. (2001) Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res.*, **77**, 31–42.
- Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112**, 441–451.
- Whittaker, G., Kemler, I. and Helenius, A. (1995) Hyperphosphorylation of mutant influenza virus matrix protein M1 causes its retention in the nucleus. *J. Virol.*, **69**, 439–445.
- Whittaker, G., Bui, M. and Helenius, A. (1996) Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J. Virol.*, **70**, 2743–2756.
- Winn, M.D., Isupov, M.N. and Murshudov, G.N. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr. D*, **57**, 122–133.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. and Ishihama, A. (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NEP protein with virion matrix. *Virology*, **196**, 249–255.
- Ye, Z., Robinson, D. and Wagner, R.R. (1995) Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. *J. Virol.*, **69**, 1964–1970.
- Ye, Z., Liu, T., Offringa, D.P., McInnis, J. and Levandowski, R.A. (1999) Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. *J. Virol.*, **73**, 7467–7473.

Received April 25, 2003; revised July 9, 2003;
accepted July 23, 2003