



HAL
open science

Etudes structurales et fonctionnelles de deux protéines précoces du cycle lytique du virus d'Epstein-Barr : l'enzyme d'UTPase et le facteur d'Export EB2

Lucy Freeman

► **To cite this version:**

Lucy Freeman. Etudes structurales et fonctionnelles de deux protéines précoces du cycle lytique du virus d'Epstein-Barr : l'enzyme d'UTPase et le facteur d'Export EB2. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00463398

HAL Id: tel-00463398

<https://theses.hal.science/tel-00463398>

Submitted on 12 Mar 2010

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.

**Thèse en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université Joseph
Fourier**

Spécialité : Sciences de la Vie

Ecole Doctorale : EDCSV

Unit of Virus Host-Cell Interactions

Soutenue publiquement le Vendredi 18 Décembre 2009

Par **Lucy Freeman**

***Etudes structurales et fonctionnelles de protéines
précoces du cycle lytique du virus d'Epstein-Barr :
l'enzyme dUTPase et le facteur d'export EB2***

Jury de soutenance

Rapporteurs :

Dr. Evelyne Manet

Pr. Friedrich Grässer

Examineur :

Pr. Patrice Gouet

Président du Jury :

Pr. Patrice Morand

Directeur de thèse :

Pr. Wim Burmeister

These réalisée a l'UVHCI, Unit of Virus Host Cell interactions, UMI 3265, UJF-CNRS-EMBL, 6 rue Jules Horowitz, BP181, 38042 Grenoble Cedex9.

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à mon jury, tout d'abord au **Dr Evelyne Manet** et **Pr Friedrich Grässer** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'aux **Pr Patrice Gouet** et **Pr Patrice Morand** d'être examinateurs de mon travail de thèse.

Je voudrais également remercier le **Pr Rob Ruigrok** de m'avoir accueillie à l'IVMS tout d'abord, aujourd'hui l'UVHCI, et d'avoir marqué les souvenirs de mes années passées au sein de l'institut.

Tous mes remerciements au **Pr Wim Burmeister**, mon directeur de thèse, pour sa gentillesse, sa culture et ses connaissances scientifiques qui m'ont guidée au cours de ma thèse. Je lui exprime toute ma gratitude pour le soutien et la patience qu'il m'a accordés.

Un grand merci (qui ne suffit pas pour exprimer ma reconnaissance) aux **Dr Marlyse Buisson** et **Dr Nicolas Tarbouriech**, qui m'ont encadrée, conseillée et soutenue depuis mes débuts dans le laboratoire. Sans vous je n'aurais pas pu réaliser ce travail.

Merci également aux autres membres de l'équipe **Xav, Eric** et **Céleste**, pour la bonne ambiance dans le laboratoire et lors des group meetings ;).

Merci aux anciens, **Jeanne, Tibo, Céline, Aurélie** pour leur accueil et leurs conseils depuis le début et encore à ce jour. Merci à **Francine** pour son sourire incessant, **Majida** pour sa gentillesse, **Pierre-Alain** et **Denis** pour les rigolades. Merci à **Alex** et **Juju** de m'avoir supportée et épaulée depuis le M2. Un grand merci aux autres, **Julien Lupo** (pour le bruitage dans le bureau), **Ivan** (pour sa rigueur bulgare), **Cédric** (pour m'avoir initiée au calendrier Maya), **NicoZ** (pour son aide avec les « espaces protégés »), **Euripedes** (pour son aide au MALLS et son sourire brésilien), et également **Ambroise, Nico Martinelli, Thibaut C, Delphine, Habib, Bettina**, et bien sûr **Charlotte** pour son amitié, sa bonne humeur et les cafés du matin. Tous ont contribué à faire de ma thèse un moment inoubliable.

J'exprime toute ma reconnaissance à **Pierre Métais, Jocelyne Visconti, Marie-Laure Guérant** et **Sandrine Vignon** sans qui l'institut ne fonctionnerait pas.

Je voudrais également remercier mes parents qui m'ont donné envie et permis de faire de longues études. Merci à **mon père** qui m'a transmis le goût pour la science en m'expliquant à l'âge de 8 ans comment fonctionnait un synchrotron, et à **ma mère** qui m'a soutenue tout au long de cette expérience.

Sans oublier un grand merci à mes amis, **Bat, Jenny, Laura, Aurél** toujours présents.

Et enfin, merci à **Yann** de m'avoir écoutée et soutenue durant ces années, et de m'avoir supportée surtout ces dernières semaines!

Sommaire

Liste des abréviations	7
Chapitre I : Introduction Générale	9
Introduction	11
I. Les virus : des agents infectieux largement étudiés.....	11
1) Importance des études portant sur les agents infectieux.....	11
2) Historique de la Virologie.....	12
i) La découverte des virus	12
ii) La définition d'un virus.....	13
II. Le virus d'Epstein-Barr ou EBV	15
1) La découverte d'EBV	15
2) EBV : un herpesvirus	16
3) Composition moléculaire d'EBV	18
4) Cycle viral	19
i) La primo-infection	19
ii) L'attachement aux lymphocytes B et l'internalisation	19
iii) L'infection latente <i>in vitro</i>	21
iv) Modèle d'infection latente <i>in vivo</i> :	23
v) Le cycle lytique.....	23
5) La persistance d'EBV est associée à un grand nombre de pathologies.....	27
i) Les lymphomes B	27
ii) Les carcinomes épithéliaux :.....	29
iii) EBV chez l'immunodéprimé.....	29
iv) Autres types de pathologie	30
v) Les traitements antiviraux	30
III. Le contexte du travail de thèse.....	31
1) L'étude structurale de protéines EBV au sein de projets européens.....	31
2) Le sujet de la thèse	34
i) Le mécanisme enzymatique de la dUTPase d'EBV.....	34
ii) SPINE 2 Complexes: Etude de la protéine EB2	34
Chapitre II : La dUTPase, une enzyme du métabolisme des acides nucléiques	35

Introduction	37
I. Les nucléotides et acides nucléiques.....	37
II. Voies de synthèse <i>de novo</i> des nucléotides.....	37
1) Les purines	38
2) Les pyrimidines	38
III. L'uracile dans l'ADN : L'importance de la dUTPase.....	40
1) Les causes de la présence d'uracile dans l'ADN.....	40
2) Les mécanismes de réparation	41
IV. Pourquoi EBV code-t-il pour une dUTPase ?.....	42
V. Les dUTPases comme cibles thérapeutiques	44
1) Les autres implications de la dUTPase d'EBV.....	44
2) Les thérapies anti-dUTPase	45
VI. Plusieurs familles de dUTPase.....	46
1) Les dUTPases Homotrimériques.....	46
2) Les dUTPases dimériques	47
3) Les dUTPases monomériques.....	48
VII. La réaction catalysée par la dUTPase	50
1) La réaction.....	50
2) Les enzymes trimériques et monomériques partagent le même modèle de mécanisme catalytique	50
i) Spécificité de substrat et catalyse:.....	50
ii) Le site actif :	51
iii) Le magnésium	53
iv) Le motif V.....	54
v) Une particularité de l'enzyme EBV : Le pont disulfure	55
Objectifs du travail de thèse :	55
Matériels et méthodes	56
I. Etude enzymatique	56
1) L'étude enzymatique par suivi de pH avec indicateur coloré	56
2) L'étude enzymatique par quantification du PPi	58
II. La résonance plasmonique de surface (SPR)	60
1) Le principe général.....	60

Article :	64
Résumé:.....	64
Discussion & Perspectives	75
Chapitre 3 : EB2 facteur d'export des ARNm viraux.....	79
Introduction	81
I. Le transport nucléaire.....	81
II. Le transport des ARNm	81
1) Le facteur d'export des ARNm : TAP.....	81
2) La maturation des ARNm est impliquée dans les fonctions d'export.....	82
3) La protéine REF/Aly.....	84
III. L'export des ARNm viraux : un mécanisme différent des ARNm cellulaires	84
1) Les propriétés fonctionnelles d'EB2	85
i) EB2 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme	86
ii) EB2 agit au niveau post-transcriptionnel.....	87
iii) EB2 lie directement l'ARN	88
2) Les partenaires d'EB2	89
i) REF.....	89
ii) TAP	90
iii) Les protéines spen et Sp110.....	91
iv) CK2	92
IV. Les objectifs du travail de thèse	94
Matériels et Méthodes	95
I. L'étude bioinformatique préalable	95
1) Repliement	95
2) Paramètres physico-chimiques.....	95
3) Structures secondaires.....	95
4) Homologues	95
5) Codons rares.....	96
II. Les constructions utilisées.....	96
III. L'expression en système bactérien des protéines EB2 et REF	97
IV. Purification de protéines en conditions natives	97
1) Purification d'EB2-Cter et EB2-Short (fusion His-tag)	97

2)	Purification de la protéine REF-GST	98
3)	La copurification d'EB ₂ -Cter-His et REF-GST	99
V.	Purifications en conditions dénaturantes et renaturation des constructions Δ ₂₀₀ et Δ ₂₁₈ d'EB ₂	99
VI.	Séquençage N-terminal	99
VII.	Essais d'interaction	100
VIII.	Etudes biophysiques et biochimiques :	101
1)	Thermofluor	101
2)	DLS	102
3)	CD	103
4)	SEC-MALLS-RI	105
IX.	Essais de cristallogénèse	106
	Résultats	107
I.	L'étude bioinformatique préalable	107
II.	Les constructions Δ ₁₀₄ , Δ ₂₀₁ et Δ ₂₁₉ d'EB ₂	109
1)	Essais d'expression en système bactérien	109
2)	La purification en conditions dénaturantes et renaturation	109
III.	L'optimisation des conditions d'expression et de purification d'EB ₂ -Cter	111
IV.	Le séquençage N-terminal	112
V.	Etude de la protéine EB ₂ -Cter en Thermofluor	114
VI.	Le contrôle qualité des purifications d'EB ₂ -Cter et EB ₂ -short	115
1)	Les chromatographies d'exclusion de taille	115
VII.	La caractérisation biophysique des constructions Cter et Short d'EB ₂	117
1)	CD d'EB ₂ -Cter et EB ₂ -Short	117
2)	DLS	120
3)	MALLS-SEC sur EB ₂ short	122
VIII.	Etude de l'interaction avec les partenaires cellulaires	122
1)	EB ₂ -REF	122
i)	Pull-down EB ₂ -REF su résine Ni-NTA : Les deux protéines ne coéluent pas	122
ii)	Pull down EB ₂ -REF sur Ni-NTA après purification de REF en présence de nucléase : Les deux protéines ne coéluent pas	124

iii) Copurification d'EB2 et REF après mélange des deux culots bactériens : Les deux protéines coéluent.....	125
2) EB2-CK2β.....	125
i) Pull-down EB2-Short/CK2β sur résine Ni-NTA.....	125
ii) Pull-down EB2-Short/CK2β-MBP sur résine amylose	128
iii) Pull-down EB2-Cter/CK2β sur résine Ni-NTA.....	128
IX. Les essais de cristallogénèse	130
Discussion	131
I. La protéine EB2	131
II. Les complexes	132
1) EB2-REF.....	132
2) EB2-CK2.....	133
Conclusions générales	134

Liste des abréviations

- BCR : B-Cell receptor
- CD: dichroïsme circulaire
- CMV : cytomégalovirus
- DLS: diffusion dynamique de la lumière
- DO: densité optique
- DTT: dithiothréitol
- dUMP : deoxyuridine monophosphate
- dUTP : deoxyuridine triphosphate
- dUTPase : deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase
- EBER : EBV encoded RNA
- EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigen
- EBV: virus d'Epstein-Barr
- EJC : exon junction complex
- FIV: virus de l'immunodéficience féline
- GP : glycoprotéine
- HSV: virus Herpes-Simplex
- KSHV : Kaposi sarcoma herpesvirus
- KSHV : kaposi sarcoma herpesvirus
- LB : luria broth
- LCL : Lignée cellulaire lymphoblastoïde
- LMP : latent membrane protein
- LRR : région riche en leucines
- MALLS : multi angle laser light scattering
- MNI : mononucléose infectieuse
- MPMV: Mason-Pfizer monkey virus
- NES : nuclear export signal
- NLS : nuclear localisation signal
- NPC : nuclear pore complex
- nt : nucléotide
- REF : RNA export factor
- RI : Indice de réfraction
- RU: unité de résonance
- SEC: chromatographie d'exclusion de taille
- SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
- Spen : Split end (protein)
- SPOC : Spen ortholog C-terminal
- SPR: résonance plasmonique de surface
- TAP : transport activating protein
- TEV: virus de la mosaïque du tabac
- TK : thymidine kinase
- TNF : Tumor necrosis factor
- TREX : transcription and export
- UNG : uracile DNA glycosylase
- VIH : virus de l'immunodéficience humaine
- VZV : varicella zoster virus
- ZRE : Zebra responsive element

Chapitre I : Introduction Générale

Introduction

I. Les virus : des agents infectieux largement étudiés

1) Importance des études portant sur les agents infectieux

Les maladies infectieuses sont causées par des bactéries, champignons, virus, prions ou d'autres parasites tels que les acariens, et sont l'une des causes principales de décès dans le monde (Figure 1), tuant plus de 14 millions de personnes chaque année (Organisation Mondiale pour la Santé, OMS). Les maladies infectieuses comptent pour 43 % des décès dans les pays en voie de développement contre 1 % dans les pays développés, étant responsables de 25 % des décès mondiaux. Ce pourcentage est nettement supérieur si l'on regarde la mortalité infantile (Figure 1B).

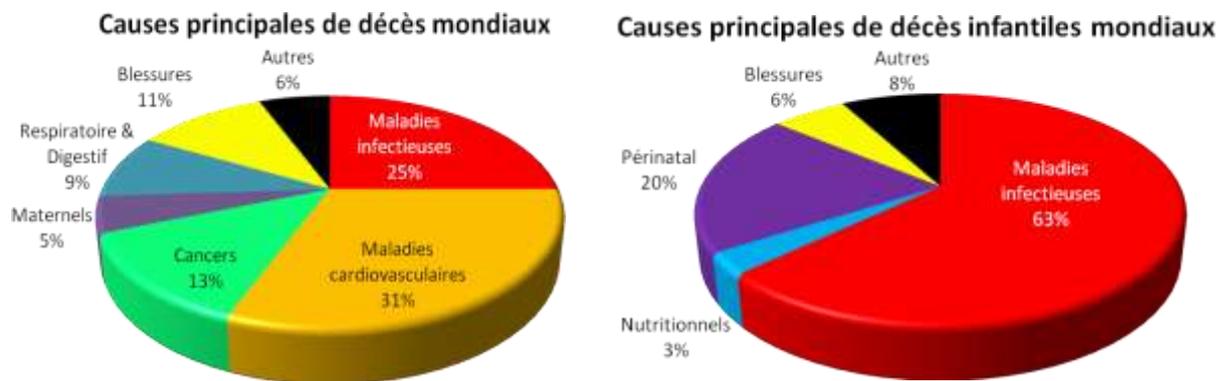


Figure 1 : Causes principales de décès dans le monde représentées par des camemberts. **A) Décès totaux** : $\frac{1}{4}$ des décès est causé par les maladies infectieuses, la cause principale de décès étant les maladies cardiovasculaires. **B) Décès infantiles** : Plus de la moitié des décès infantiles sont causés par les maladies infectieuses. (Statistiques de l'OMS)

L'impact de ces maladies est également important sur le plan social et économique. En plus du coût humain, la propagation de ces maladies a une répercussion économique importante, pouvant entraîner une forte baisse de productivité et du PIB. Sur le continent Africain, la lutte contre le paludisme mobiliserait 12 milliards de dollars par an, (d'après le Fonds mondial de

lutte contre le sida, la tuberculose et le paludisme) et une épidémie de grippe en France coûterait environ 500 millions d'Euros à l'Assurance Maladie (Statistique de l'Institut Pasteur).

L'expansion des maladies infectieuses est favorisée par des facteurs environnementaux tels que la croissance démographique, l'absence de réseaux d'assainissement et de structures de santé, ou les famines. Le contexte actuel voit également une augmentation des échanges internationaux, créant une augmentation de vecteurs de transmission potentiels ainsi que du périmètre géographique des épidémies.

Pour ces raisons, les études portant sur les maladies infectieuses sont primordiales pour prévenir et traiter ces maladies, et suscitent beaucoup d'intérêt depuis bon nombre d'années.

2) Historique de la Virologie

i) La découverte des virus

Les maladies virales sont connues de l'homme depuis plusieurs siècles. En 1400 avant JC des hiéroglyphes égyptiens montraient des pharaons atteints de poliomyélite (Figure 2), et il était aussi connu que la rage était transmise par morsure de chien. La variolisation était pratiquée en Asie depuis de nombreux siècles, mais n'arriva en Europe qu'au 18^{ème} siècle. Lady Mary Wortley Montagu joua un rôle dans l'avancée de ces techniques en Angleterre, non au niveau scientifique mais en traçant la voie de la variolisation : lors d'un voyage en Turquie en 1718 elle accepta de faire inoculer son fils, et à son retour en Angleterre demanda l'inoculation de sa fille et chercha à promouvoir cette procédure. En 1798 Jenner publia une étude sur la vaccination contre la variole, moins néfaste que la procédure de variolisation, et en 1885 Pasteur mit au point la vaccination contre la rage. Ces pratiques de prévention étaient orchestrées sans réelle connaissance du type de pathogène impliqué.



Figure 2 : Un pharaon vraisemblablement atteint de poliomyélite. Photographie d'un hiéroglyphe égyptien datant envrion de 1350 Avant JC (18^{ème} dynastie) représentant un pharaon atteint de poliomyélite. Longtemps avant de connaître l'existence des virus, les maladies causées étaient déjà reconnues. (Exposé au musée Carlsberg de Copenhague)

L'existence de ces pathogènes fut mise en évidence par un heureux hasard, grâce à un dispositif en céramique destiné à filtrer l'eau mis au point par Charles Chamberland en 1884 : le 12 février 1892 Dimitri Iwanowsk, un botaniste de l'académie de Science de St Petersburg, se rendit compte que l'agent responsable de la maladie de la mosaïque du tabac n'était pas retenu par ce filtre. En 1898 Martinus Beijernick approfondit ces résultats en précisant que le pathogène filtrable n'était pas une bactérie et nécessitait des cellules vivantes pour sa croissance ; il employa l'expression « contagium vivum fluidum » ou « fluide vivant contagieux » pour le décrire. La même année Friedrich Löffler et Paul Frosch décrivent que l'agent infectieux de la fièvre aphteuse était un agent filtrable bien plus petit qu'une bactérie et qui ne pouvait être cultivé dans des milieux de culture classiques (Brock 1998). D'autres agents filtrables et invisibles au microscope optique furent découverts et nommés « virus » un mot venant du grec, signifiant poison. La première observation d'un virus fut effectuée par Buist en 1887 lorsqu'il visualisa au microscope des particules d'environ un quart de μM après coloration au méthyl violet d'un échantillon provenant d'une lésion de variole (Smith and Lauffer 1955).

ii) La définition d'un virus

A la fin du XIX^{ème} siècle, les virus avaient donc déjà été partiellement décrits mais il a fallu près d'un demi-siècle pour obtenir l'information essentielle concernant la morphologie ou la composition chimique. La cristallisation du TMV par Wendell Stanley en 1935 lui permit d'affirmer la présence de protéines. Les acides nucléiques furent mis en évidence un peu plus

tard par Bawden & Prie en 1937, la morphologie étant décrite grâce à la visualisation en microscopie électronique du virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Kausche and Pfankuch 1939). Ces études ont permis à André Lwoff en 1957 d'aboutir à la définition d'un virus :

- Le génome viral est codé par un seul type d'acide nucléique, ARN ou ADN
- Les virus se reproduisent par réplication de leur matériel génétique
- Ce sont des parasites intracellulaires absolus
- Ils sont dotés d'une structure particulière les différenciant des structures cellulaires

Quelques années plus tard (1962) cette définition mena Lwoff et al à établir un système de classification des virus qui est à l'origine de la classification actuelle. Les virus furent classés selon quatre caractéristiques : le type d'acide nucléique composant le génome, la symétrie, la présence ou non d'une enveloppe et le diamètre de la capsidite ou le nombre de capsomères.

Le début du XXème siècle marqua la découverte des premiers virus oncogènes, avec Bang et Rous qui montrèrent respectivement en 1908 et 1911 qu'une leucémie ou un sarcome aviaires peuvent être transmis de manière horizontale ou verticale par des agents filtrables (Rous 1911). Le premier virus humain identifié est celui de la fièvre jaune, décrit en 1901 par Walter Reed, James Carroll, Jesse Lazear, qui définissent l'origine de cette maladie comme un agent filtrable transmis par un insecte. Le développement du vaccin contre ce virus procura à Theiler le prix Nobel de médecine en 1951. Bien que les premiers virus oncogènes aient été découverts au début du siècle avec le virus du sarcome aviaire, le premier virus oncogène humain fut découvert dans les années 60, il s'agissait d'EBV.

Les avancées technologiques de la seconde moitié du XXème siècle ont permis la multiplication des découvertes dans le milieu de la virologie, les thérapies antivirales ainsi que la vaccination.

II. Le virus d'Epstein-Barr ou EBV

1) La découverte d'EBV

L'identification du virus d'Epstein-Barr (EBV) se fit via la découverte d'un lymphome auquel il est associé. La première description de cette pathologie fut réalisée en 1904 par Albert Ruskin Cook, un médecin anglais en mission en Ouganda qui observa la présence de grosseurs importantes aux mâchoires de certains enfants. Après la seconde guerre mondiale, un autre médecin anglais du nom de Denis Burkitt également en poste en Ouganda, observe la récurrence de ce même type de cas clinique et mena une étude épidémiologique. Burkitt décriva qu'il s'agissait du lymphome le plus commun chez les enfants, se développait très rapidement induisant la mort quelques mois à peine après les premiers symptômes. Mais il ne put identifier de facteur commun pouvant expliquer l'origine de cette pathologie (Burkitt 1958). Entre 1957 et 1964 il poursuivit ses études sur la prévalence géographique, le traitement ainsi que les facteurs associés à ce cancer qui fut dès lors nommé lymphome de Burkitt. L'importance des conditions géographiques et climatologiques sur la distribution de ce cancer (Burkitt 1961) suscita alors l'intérêt d'un jeune professeur de pathologie, Michael Anthony Epstein. Ce dernier s'intéressait fortement au lien entre virus et cancer suite à son étude menée sur le virus aviaire découvert par Rous en 1911, qui mit en évidence la présence de particules virales dans des cellules tumorales de sarcome aviaire (Epstein 1955). Après l'accord d'une collaboration, Burkitt expédia rapidement un échantillon de cellules de lymphome à son collègue Epstein qui entreprit d'analyser les cellules cancéreuses. Durant deux ans, Anthony Epstein, sa jeune doctorante Yvonne Barr ainsi que leur collègue Bert Achong travaillèrent sans relâche cherchant à mettre en évidence des particules virales dans les lymphomes de Burkitt. Le moment tant attendu arriva finalement grâce à un échantillon qui, présentait des cellules tumorales en suspension dans le milieu. L'inspection en microscopie électronique révéla que ces cellules contenaient des inclusions rondes qu'Epstein reconnut immédiatement comme étant des particules virales (Epstein *et al.* 1964). Les lymphoblastes possèdent une forte capacité de prolifération en culture cellulaire. L'étude des particules virales présentes dans ces cellules permit d'identifier un nouveau membre de la famille des herpes-virus, nommé virus d'Epstein-Barr (EBV) (Epstein *et al.* 1965). EBV fut le premier exemple de pathogène viral à l'origine d'un cancer humain.

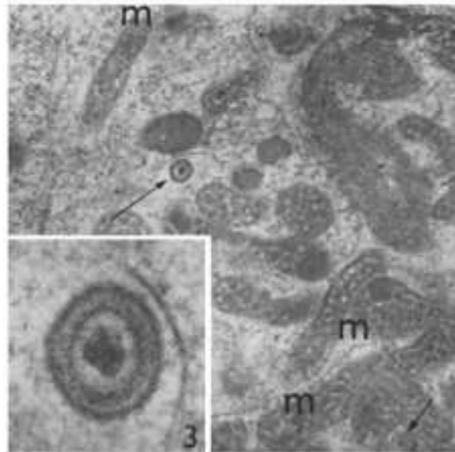


Figure 3 : Particules d'EBV visualisés en microscopie électronique dans des coupes de lignées lymphoblastoïdes. Des particules matures délimitées par deux membranes renfermant un nucléoïde dense sont visibles (désignées par la flèche longue) ainsi que des particules immatures entourées d'une seule membrane (désignées par la flèche courte). « m » désigne les mitochondries. Dans l'insert 3 on voit une particule virale mature mesurant environ 115 nm de diamètre. (Source : (Epstein *et al.* 1965))

2) EBV : un herpesvirus

Le virus d'Epstein-Barr appartient à la famille des *Herpesviridae* dans le genre des *Lymphocryptovirus* (Kieff and Rickinson 2001). Les herpesvirus sont impliqués dans un grand nombre de maladies animales et humaines, faisant de cette famille de virus l'objet de nombreuses études. La particularité de cette famille de virus est d'établir une infection latente qui persiste au cours de la vie de l'hôte. Ces virus ont la capacité à être réactivé pour produire des virions infectieux au cours du cycle lytique. Il existe plus de 120 herpesvirus qui infectent un large spectre d'hôtes, notamment les mammifères, oiseaux, poissons, amphibiens, reptiles, marsupiaux et également les mollusques.

Les herpesvirus ont été classifiés en trois sous-familles, α , β et γ en fonction de leur tropisme cellulaire et la durée de leur cycle lytique. L'étude ultérieure des séquences d'ADN a révélé des similarités des génomes au sein d'une même famille (Roizman and Pellett 2001). Les maladies causées par ces virus ne sont généralement pas létales, sauf dans certains cas d'association à d'autres facteurs, qui seront développés plus loin.

- ♦ Les herpesvirus de la sous famille Alpha établissent une infection latente dans les ganglions sensoriels avec un cycle court et une rapide progression en culture cellulaire.

Ces virus sont très cytotoxiques. Les α herpesvirus infectent un grand nombre d'hôte, atteignant à la fois les oiseaux et une grande variété de mammifères, chaque virus étant cependant très spécifique d'un hôte donné.

- ♦ Ceux du groupe Beta ont un spectre d'hôte plus restreint, et ces virus se multiplient beaucoup plus lentement en culture cellulaire, avec un cycle réplcatif plus long. Les cellules infectées grossissent (cytomégalie), ces virus peuvent être maintenus sous forme latente dans les glandes sécrétrices ou les cellules de rein par exemple.
- ♦ Les gamma herpesvirus, tels EBV, ont le spectre d'hôte le plus restreint et possèdent un cycle assez long. *In vitro* ces virus se répliquent dans les cellules lymphoblastoïdes.

Il existe 8 herpesvirus humains répartis dans les trois sous familles, décrits brièvement dans le tableau 1.

Herpes Virus	Nom commun	Sous famille	Siège de latence	Pathologies en primo-infection	Pathologies associées/réactivation
HHV-1	HSV ₁	α	Neurones	Aphtes, pharyngites	Lésions épithéliales, ulcère etc.
HHV-2	HSV ₂	α	Neurones	Herpes génital et néonatal	
HHV-3	VZV	α	Neurones	Varicelle	Herpes zoster, manifestations neurologiques
HHV-4	EBV	γ	Lymphocytes B	Mononucléose Infectieuse	Lymphomes (Burkitt, nasopharynx, gastrique)
HHV-5	CMV	β	Cellules hématopoïétiques	Mononucléose CMV	Rétinites, encéphalites (pateints immunodéprimés)
HHV-6 A et B	Roséolovirus	β	Monocytes et cellules du SNC	Roséole infantile	
HHV-7	Roséolovirus	β	Lymphocytes T		
HHV-8	KSHV	γ	Cellules épithéliales, lymphocytes		Sarcome de Kaposi

Tableau 1 : Les 8 herpesvirus humains. Ces virus ont différents sièges de latence et sont répartis dans les 3 sous familles α , β et γ , et sont à l'origine de diverses pathologies. (CMV : Cytomégalovirus, SNC : Système nerveux central, VZV : Varicella Zoster virus, KSHV : Kaposi sarcoma associated herpesvirus)

Le KSHV est l'autre gamma herpesvirus humain qui est également impliqué dans des processus tumorigènes qui peuvent être associés au VIH (Laurent *et al.* 2008). En particulier trois maladies prolifératives sont associées au KSHV (Moore and Chang 2001) :

- Le sarcome de Kaposi, une tumeur d'origine endothéliale.
- Le lymphome primitif des séreuses, ou PEL (Primary effusion lymphoma), un lymphome B.
- La maladie de Castelman multicentrique, une affection lymphoproliférative.

3) Composition moléculaire d'EBV

La particule virale d'EBV (Figure 4) contient un génome constitué d'un ADN bicaténaire linéaire, renfermé dans une capsidie icosaédrique composée de 5 protéines : BcLF1 (protéine majeure de la capsidie), BORF1 (protéine du triplex), BDLF1 (protéine du triplex), et BFRF3 (petite protéine de capsidie) ainsi que la protéine scaffold interne BDRF1. La capsidie est entourée d'un tégument protéique qui est lui-même enveloppé d'une bicouche lipidique contenant des glycoprotéines de surface, dont gp350, gp42 et gp150, qui permettent l'attachement à la cellule hôte.

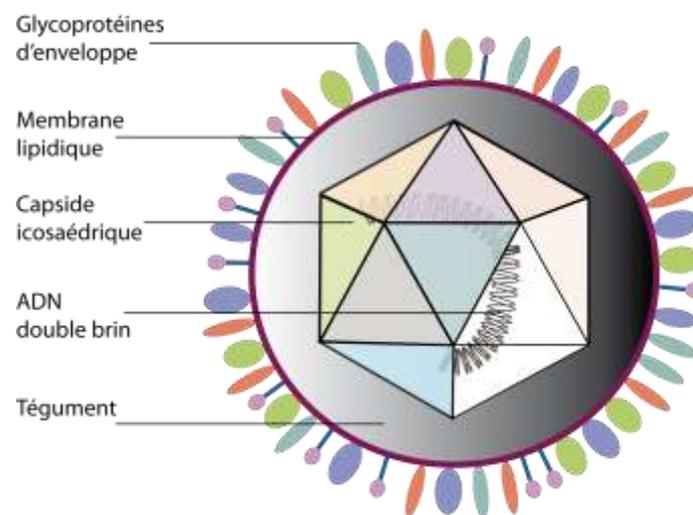


Figure 4 : Schéma d'une particule virale d'EBV contenant l'ADN double brin renfermé dans la capsidie icosaédrique entourée du tégument et de la membrane de glycoprotéines.

4) Cycle viral

i) La primo-infection

EBV établit une infection persistante dans environ 95% de la population mondiale. La primo-infection survient généralement au cours des premières années de la vie d'un individu, le virus étant transmis par voie salivaire essentiellement. Les lymphocytes B présents dans l'oropharynx sont les cibles préférentielles d'EBV (Niedobitek *et al.* 1997). EBV persiste de façon latente au sein des lymphocytes B durant toute la vie de l'individu, et la réactivation sporadique produisant de faibles quantités de virus permet la transmission salivaire de virions infectieux.

Lorsque la primo-infection survient à l'âge adulte ou à l'adolescence, elle peut causer la mononucléose infectieuse ou MNI (dans environ 50 % des cas de primo-infection tardive). Le lien entre MNI et EBV fut mis en évidence en 1968 par Henle et al qui travaillaient sur la détection du virus dans les cellules de lymphomes de Burkitt (Henle *et al.* 1968). En poursuivant leurs études ils révélèrent qu'EBV était présent dans plus de 90% de la population. La MNI se caractérise généralement par de la fièvre, des adénopathies aiguës et une pharyngite. Les manifestations cliniques sont essentiellement dues à la présence de lymphocytes T atypiques, une augmentation du nombre de cellules mononucléaires périphériques, et un taux élevé de transaminases, dues à la réponse immunitaire des cellules T contre les antigènes viraux tels les glycoprotéines (Cohen 2000), (Rickinson and Moss 1997).

ii) L'attachement aux lymphocytes B et l'internalisation

L'attachement à la membrane cellulaire des lymphocytes B se fait par une interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe virale gp350/220 (Figure 5 A) et le récepteur CD21 (récepteur complément CR2) des lymphocytes B (Fingerth *et al.* 1984). Gp350 est largement recouverte de peptidoglycane et des modélisations ont localisé l'interaction au niveau d'un domaine de gp350 chargé négativement et dépourvu de peptidoglycane (Szakonyi *et al.* 2006), (Young *et al.* 2008). La glycoprotéine gp42 interagit avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Figure 5 B) (Mullen *et al.* 2002) (Speck *et al.* 2000). Cette interaction est nécessaire pour l'infection des lymphocytes B et semble être une étape clé dans la formation d'un complexe entre 3 glycoprotéines gH, gL et gp42 (Wang *et al.* 1998), (Molesworth *et al.* 2000) ainsi que dans le processus de fusion membranaire (Sorem *et al.* 2009). En l'absence de gp42, EBV est capable de se lier aux lymphocytes B mais l'infection ne peut avoir lieu (Wang and

Hutt-Fletcher 1998). Gp110 est également une protéine d'enveloppe abondante, impliquée dans le mécanisme de fusion (Figure 9).

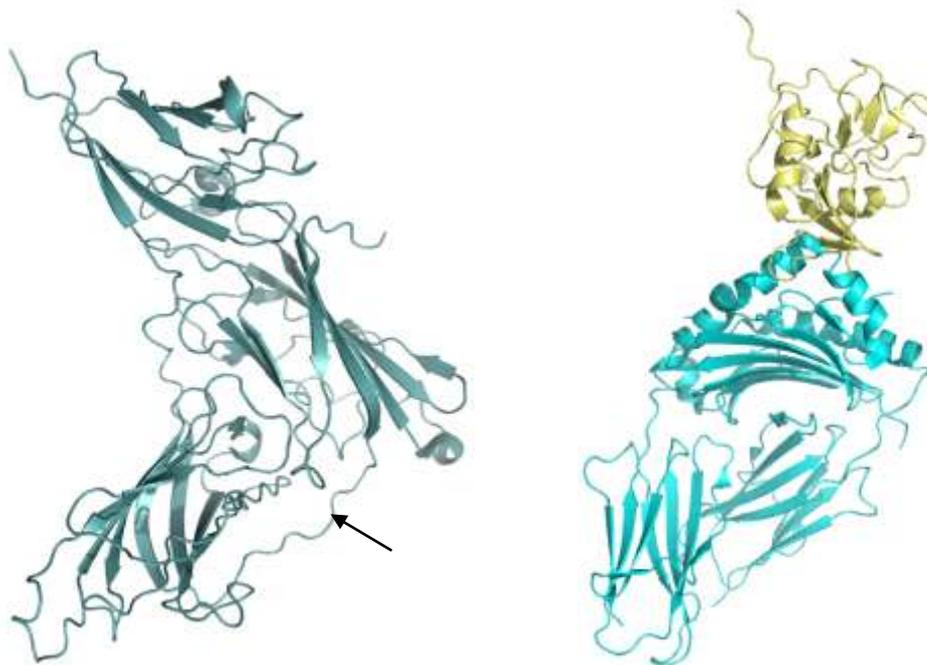


Figure 5: A) Structure du domaine de liaison de gp350 d'EBV à son récepteur (Szakonyi *et al.* 2006). Seule la surface d'interaction avec le récepteur est libre de glycanes (flèche), des mutations dans ce domaine inhibent l'interaction. **B) Structure de gp42 (jaune) en complexe avec son récepteur cellulaire (cyan)** (Mullen *et al.* 2002). L'étude de ces structures peut permettre le développement de molécules antivirales en inhibant l'attachement du virus aux cellules cibles.

Après attachement à la membrane cellulaire par l'intermédiaire des glycoprotéines, la fusion des membranes cellulaire et virale survient, suivis de l'internalisation du virus. Les mécanismes de dissolution de la capsid et le transport du génome ainsi que sa circularisation au sein du noyau sont peu connus.

In vivo l'infection de cellules épithéliales a également été décrite, mais le mode d'infection des cellules épithéliales reste controversé et peut être expliqué selon deux hypothèses : la liaison aux cellules épithéliales *via* une glycoprotéine et un récepteur différents de ceux mis en œuvre pour l'infection des lymphocytes B via la glycoprotéine gH (Molesworth *et al.* 2000), (Wu *et al.* 2005). L'infection des cellules épithéliales peut également être effectuée par un transfert direct à partir des lymphocytes infectés *via* une synapse virale (Shannon-Lowe *et al.* 2006). La présence de gp42 n'est pas nécessaire à l'infection des cellules épithéliales. Toutefois, l'infection des cellules épithéliales résulte en une réplication virale et la production

de virions infectieux (Sixbey *et al.* 1983). L'infection dans les cellules épithéliales et les lymphocytes B ne présente pas les mêmes caractéristiques dans les deux cas révélant des différences substantielles dans l'expression de gènes viraux ainsi que dans le maintien du génome au cours des divisions cellulaires (Shannon-Lowe *et al.* 2009). Certaines études décrivent également l'infection de lymphocytes T qui sont rares *in vitro*, et *in vivo* elles sont généralement associées à des pathologies lymphoprolifératives.

Comme les autres herpesvirus, EBV peut établir un état latent au sein de la cellule hôte ce qui permet le maintien du génome viral et la persistance au cours de la vie de l'hôte. L'activation du cycle productif ou lytique permet la production de virions infectieux.

iii) L'infection latente *in vitro*

Les lymphocytes B sont le siège de latence d'EBV (Gratama *et al.* 1988). *In vitro* EBV possède la capacité d'immortaliser les lymphocytes B. Ceci permet l'établissement *in vitro* de lignées lymphoblastoïdes ou LCL. Les LCL constituent un modèle d'étude des propriétés de transformation d'EBV. En plus de l'expression de protéines induisant la prolifération (LMP1), l'expression de facteurs viraux anti-apoptotiques (de type vBcl-2) est essentielle pour la transformation des lymphocytes en LCL (Altmann and Hammerschmidt 2005). Pendant l'état latent, EBV n'exprime qu'un nombre de gènes limité, son génome est maintenu sous forme d'épisome au sein de la cellule hôte (Adams and Lindahl 1975). Plusieurs types de latence associés à différentes pathologies *in vivo* peuvent être observés *in vitro*: Les latences I, II et III (Rowe *et al.* 1992) déterminées en fonction du nombre de protéines exprimées (Tableau 2). Il existe également la latence de type 0, où l'on ne retrouve aucune protéine, seulement les EBER 1 et 2, des ARN viraux non codants. Dans les lignées LCL le virus établit une latence de type III. Au cours de la latence, jusqu'à 9 protéines EBV sont exprimées : les six antigènes nucléaires d'EBV ou EBNA (EBNA₁, 2, 3A, 3B, 3C et EBNA-LP), ainsi que les protéines de latence membranaire LMP₁, 2A et 2B. Toutes ces protéines sont exprimées au cours de la latence de type III.

Protéine/ Gène de latence	EBNA				LMP		ARN	
	1	2	3ABC	LP	1	2A & B	EBER	BART
Type de latence associé	I,II,III	III	III	III	II,III	II,III	I,II,III	I,II,III

Tableau 2 : Gènes exprimés au cours des différents programmes de latence d'EBV (adapté de (Cohen 2000))

Les protéines EBNA sont des antigènes nucléaires d'EBV. EBNA₁ est nécessaire à la réplication de l'épisome viral au cours des divisions cellulaires via la liaison à l'origine de réplication OriP (Reisman *et al.* 1985), (Yates *et al.* 1985). L'interaction se fait via la liaison à deux sites spécifiques dans le sillon majeur et sept bases dans le sillon mineur de l'ADN ainsi que des contacts non spécifiques avec les phosphates (Figure 6) (Bochkarev *et al.* 1995; Bochkarev *et al.* 1996; Bochkarev *et al.* 1998).

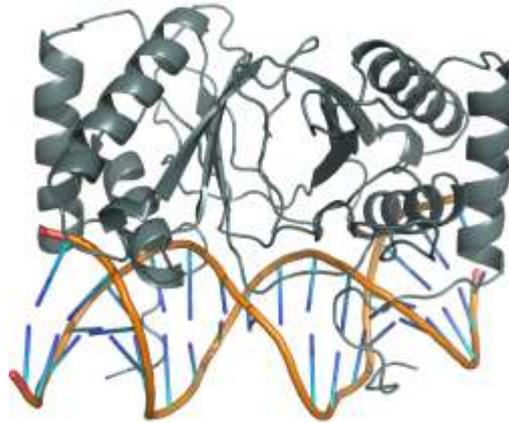


Figure 6 : Structure du domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN de la protéine EBNA1 en complexe avec l'ADN (Bochkarev *et al.* 1998). De nombreuses interactions permettent la liaison d'EBNA1 à l'ADN au niveau de l'origine OriP.

EBNA₂ est la première protéine exprimée après l'infection des lymphocytes B *in vitro* et régule l'expression d'un grand nombre de facteurs cellulaires et viraux. EBNA₂ est essentielle à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro*. EBNA₃ A, B et C sont des régulateurs transcriptionnels et EBNA₃C est aussi un régulateur de facteurs cellulaires qui permettent la prolifération des cellules B (Zhao and Sample 2000).

Les protéines LMP sont les protéines de latence membranaire : LMP₁ est la protéine oncogène principale d'EBV. LMP₁ est constitutivement activé et imite le facteur cellulaire CD40 de la famille des Tumor Necrosis Factor (TNF) ce qui permet d'induire la voie NFκB en l'absence de facteurs externes. LMP₁ joue ainsi un rôle inhibiteur sur l'expression de protéines anti-apoptotiques ce qui peut entraîner la prolifération cellulaire. Les virus déficients en LMP₁ sont incapables de transformer les cellules B. L'expression de LMP₁ est régulée par EBNA₂ (Abbot *et al.* 1990). LMP₂A inhibe la voie de signalisation des récepteurs des cellules B (BCR) et permet la prolifération des cellules B sans signaux externes. LMP₂A possède des propriétés d'inhibition

de la réactivation (Miller *et al.* 1995), et une capacité de transformation a aussi été mise en évidence pour cette protéine (Fukuda and Longnecker 2007).

Des ARN sont aussi transcrits au cours de la latence. Les EBER, ARN non codants, pourraient stimuler la croissance des lymphocytes B en induisant la sécrétion d'interleukine 10, et permettre la résistance des LB à l'interféron alpha. Les autres gènes exprimés au cours de la phase de latence (les BART) codent pour une vingtaine de miARN exprimés à des taux variables au sein d'une même lignée cellulaire (Pratt *et al.* 2009). Il semblerait que le transcrit miARN BART2 joue un rôle dans la régulation de la polymérase BALF5 *via* une interaction avec la région 3'UTR, inhibant ainsi la réactivation et le passage en phase lytique (Barth *et al.* 2008).

iv) Modèle d'infection latente *in vivo*:

Les études de Babcock et al ont révélé que le profil d'expression des gènes de latence virale dépend largement de l'état de différenciation de la cellule. Ces études ont permis d'établir les bases d'un modèle décrivant la persistance d'EBV (Babcock *et al.* 1998; Babcock *et al.* 2000). Dans l'oropharynx, les particules EBV infectent des cellules B naïves qui sont alors activées et prolifèrent. Dans ces cellules EBV présente un profil d'expression des gènes correspondant à une latence de type III, exprimant l'ensemble des gènes de latence (Kuppers 2003). Certaines cellules B activées vont subir un passage en centre germinatif où elles exprimeront les gènes de latence de type II. Cette étape permet leur différenciation en lymphocytes B mémoires qui expriment un nombre plus restreint de gènes EBV (Latence o) (Figure 7). Les lymphocytes B mémoires sont le siège de latence d'EBV. Cet état de latence permet au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte tant que la cellule reste dans un état quiescent. Sa différenciation en cellule de plasma peut induire la réactivation du cycle lytique d'EBV.

v) Le cycle lytique

Le cycle lytique est le cycle répliatif du virus résultant en la production de virions infectieux. Il peut être induit *in vitro* par des réactifs tels que l'ester phorbol phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA), un promoteur de tumeurs connu (zur Hausen *et al.* 1978) ou le butyrate. La réactivation du virus *in vitro* a été étudiée de manière extensive grâce à ces drogues. D'autres mécanismes de réactivation *in vitro* ont été décrits : le cross-linking des immunoglobulines de surface, ou bien dans les cellules de lymphome de Burkitt la voie du TGF- β peut réactiver le cycle lytique d'EBV. L'expression des gènes lytiques se fait de manière séquentielle et ordonnée avec l'expression de facteurs d'activation très précoces, puis les gènes précoces, pour finir avec les gènes tardifs.

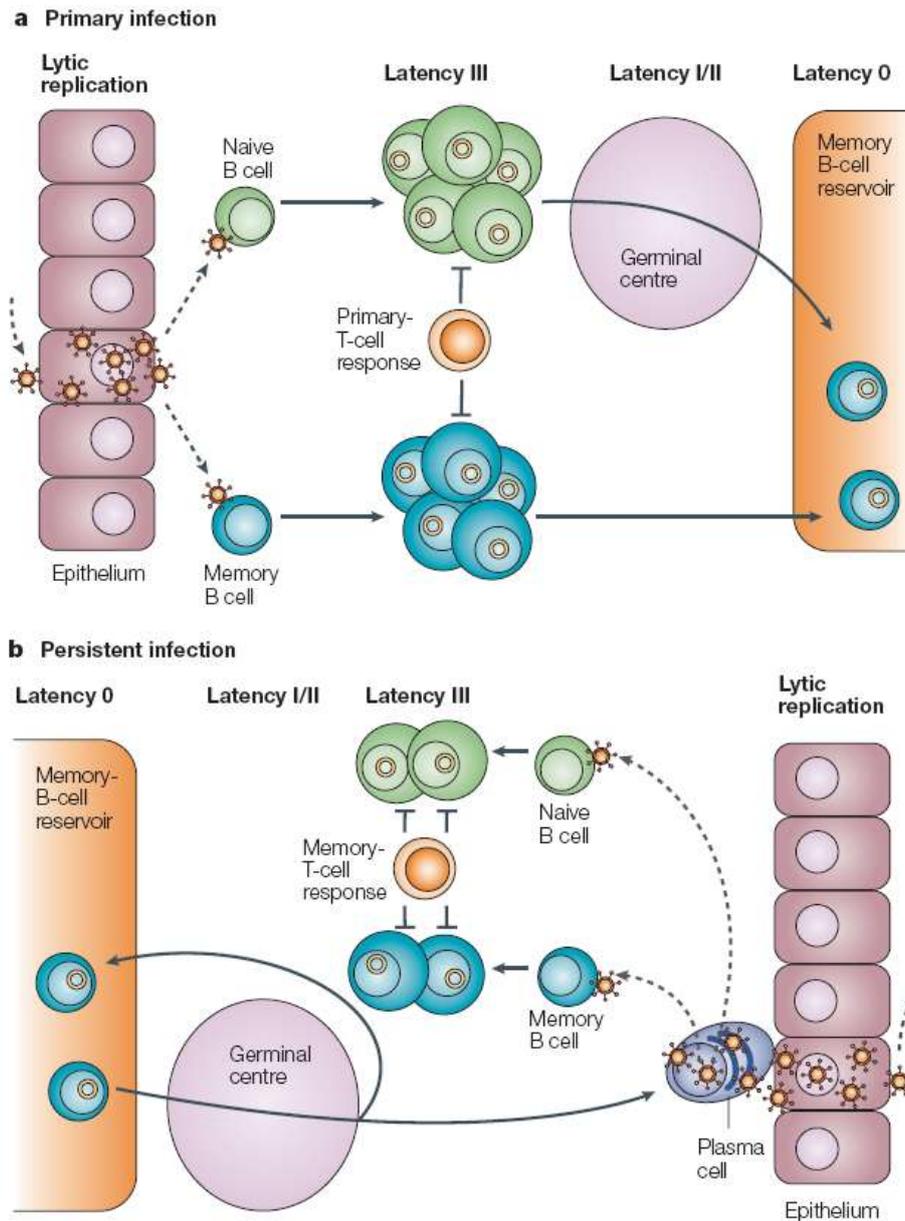


Figure 7 : A) La primo-infection: Après répllication lytique dans les cellules épithéliales, le virus passe dans les tissus lymphoïdes où il établit une latence de type III. Ces cellules sont ciblées par la réponse immunitaire des cellules T, mais certaines y échappent par une différenciation en lymphocyte B mémoire en centre germinatif. Les lymphocytes B mémoires sont le siège de latence d'EBV qui présente un état latent de type 0. L'infection directe de LB mémoires reste une hypothèse. **B) Infection persistante :** Les lymphocytes B mémoires sont parfois recrutés en centre germinatif avant de subir une phase de différenciation, ce qui peut permettre la réactivation et amorcer la phase lytique ou promouvoir l'établissement de la latence III dans les cellules B mémoires qui seront alors ciblées par la réponse T. (Source : (Young and Rickinson 2004))

Les facteurs très précoces :

La réplication lytique est amorcée par l'expression du facteur de transcription codé par l'ORF BZLF₁, ainsi qu'un autre facteur très précoce codé par BRLF₁. Le produit du gène BZLF₁ appelé ZEBRA, Zta ou EB₁ forme un dimère (Figure 8) capable de reconnaître un large spectre de séquences promotrices spécifiques nommées ZRE (Zebra response elements). Zebra/EB₁ se lie entre autres aux sites reconnus par le facteur de transcription cellulaire AP₁ (Farrell *et al.* 1989). EB₁/ZEBRA montre une préférence pour les promoteurs méthylés de deux gènes, BRLF₁ et une protéine précoce BRRF₁ (Dickerson *et al.* 2009), ce qui permet certainement une régulation du passage entre les phases lytique et latente. BRLF₁ code pour le facteur Rta qui est lui-même capable d'induire l'expression d'EB₁/ZEBRA, créant ainsi une boucle d'autocontrôle positive. Les deux facteurs très précoces induisent l'expression des gènes précoces du cycle lytique.

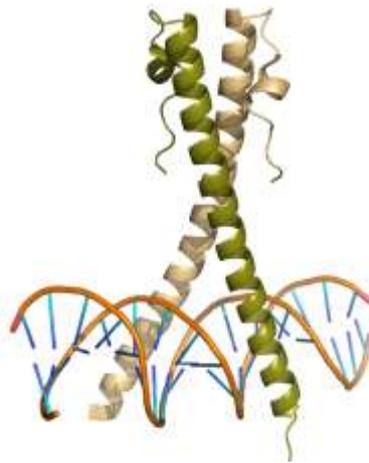


Figure 8 : Structure du domaine C-terminal de la protéine EB₁/ZEBRA en complexe avec l'ADN (Petosa *et al.* 2006). Zebra appartient à la famille des facteurs de transcription bZip (comme les facteurs eucaryotes c-Fos et c-Jun). La structure a révélé de grandes différences dans le domaine de dimérisation, dépourvu des répétitions leucines. Cette particularité peut permettre de cibler la dimérisation de Zebra par des thérapies visant à inhiber la réactivation du cycle lytique d'EBV.

Les protéines précoces :

Les gènes précoces sont l'ensemble des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN viral ou la régulation de l'expression des protéines tardives. L'ADN polymérase ou BALF₅, le facteur de régulation BMRF₁ qui lui est associé, la primase BSLF₁ ainsi que ses protéines associées BBLF_{2/3}, l'hélicase BBLF₄ et la protéine de liaison à l'ADN BALF₂ ainsi que la deoxyribonucléase alcaline (DNAse) sont des protéines précoces qui composent la machinerie de réplication. Les enzymes associées au complexe de réplication qui sont des protéines

importantes pour le métabolisme des acides nucléiques sont également exprimées lors de cette phase précoce et font également partie des protéines précoces : la déoxyuridine triphosphate nucléotidohydrolase (dUTPase), la thymidine kinase (TK), les deux sous-unités de la ribonucléotide réductase ainsi que l'uracile DNA glycosylase (UNG).

Une autre protéine précoce est la protéine EB2, codée par les ORFs viraux BMLF1/BSLF2 et impliquée dans l'export des ARNm viraux non épissés (Semmes *et al.* 1998). Une revue détaillée de cette protéine sera présentée plus loin.

Les protéines tardives :

En dernier sont exprimées les protéines tardives impliquées dans la formation de la particule virale. Il s'agit des protéines de capsid, ainsi que des glycoprotéines de surface. Durant cette phase on retrouve la glycoprotéine gp110 (Figure 9), qui est nécessaire à la production de virions (Herrold *et al.* 1996) et présente au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, lieu d'assemblage de la capsid (Papworth *et al.* 1997). Son long domaine C-terminal est essentiel dans sa localisation intracellulaire et la production de virions infectieux (Lee and Longnecker 1997).

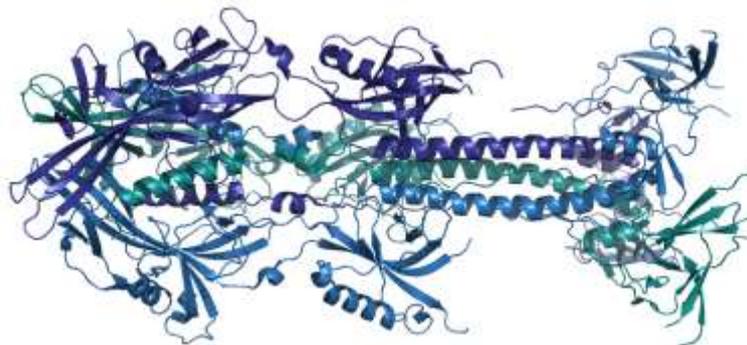


Figure 9 : Structure du domaine C-terminal de la protéine gp110 ou glycoprotéine B (pdb 3fvc, (Backovic *et al.* 2009)). Cette protéine est un homologue structural de la protéine G de fusion du virus de la stomatite vésiculaire, étudiée d'un point de vue structural dans les états pré et post-fusion. La comparaison de gp110 avec cette dernière pourrait révéler des résidus impliqués dans la fusion membranaire ou la spécificité pour la cellule hôte.

L'assemblage de la capsid chez EBV est peu caractérisé, les études portant essentiellement sur HSV. Après expression des protéines tardives, l'assemblage débute dans le cytoplasme puis l'ensemble des protéines seront transportées dans le noyau où une procapsid sera formée. Sous l'action de la protéase la procapsid arrivera à maturation et l'ADN viral sera encapsidé

(Gao *et al.* 1994; Sheaffer *et al.* 2001). L'assemblage de la capsid est médié par des interactions protéine-protéine, les protéines de capsid d'HSV, de KSHV et EBV s'assemblant de manière « autonome » (Newcomb *et al.* 1999; Perkins *et al.* 2008; Henson *et al.* 2009).

In vivo, EBV est spontanément réactivé dans certaines cellules plasmiques des amygdales, résultant en la production de virus et leur transmission subséquente par voie salivaire. La différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes peut induire la réactivation du virus et le basculement en phase lytique, l'expression de EB1/Zebra ayant été observée dans les plasmocytes d'amygdales (Laichalk and Thorley-Lawson 2005). Les états psychologiques tels que le stress ou la dépression peuvent également être un facteur à l'origine de la réactivation d'EBV (Glaser *et al.* 1991). Le vieillissement semble aussi être associé à une réactivation chronique d'EBV ainsi que du CMV (Glaser *et al.* 1985), (Stowe *et al.* 2007). Le cycle lytique résulte en l'expression des gènes précoces et des gènes de capsid.

Bien des éléments restent incompris dans le mode de fonctionnement de ce virus, et des herpesvirus en général comme le montre une étude récente illustrant que la latence d'un herpesvirus murin proche d'EBV conférerait une résistance à l'infection de certaines bactéries pathogènes : est-ce une capacité du virus à permettre la survie de son hôte et donc son maintien ? (Barton *et al.* 2009). EBV coévolue avec l'homme depuis plus de 100000 ans et le succès de cette coexistence repose sur un équilibre fin permettant le maintien du virus au cours de la vie de son hôte.

5) La persistance d'EBV est associée à un grand nombre de pathologies

EBV est associé à d'autres pathologies que la mononucléose infectieuse causée par la primo-infection. Ce virus est associé à environ 1% des tumeurs mondiales qui touchent un grand nombre de types cellulaires. La détection d'EBV dans ces pathologies peut être relevante dans la mise au point de traitements, surtout dans les cas d'association à d'autres facteurs (Delecluse *et al.* 2007) & (Gandhi 2006) pour revue.

i) Les lymphomes B

- Lymphome de Burkitt : Les cas endémiques en Afrique sub-saharienne sont associés dans plus de 90% des cas à EBV. Les cas sporadiques dans le reste du monde sont associés environ 15% du temps à EBV et chez les individus VIH positifs, l'association à EBV est environ de 40% (Bornkamm 2009) pour revue. Le lymphome de Burkitt se caractérise par une

translocation chromosomique entraînant une régulation anormale de l'oncogène c-myc et une apparition du caractère tumorigène de ces cellules (Langdon *et al.* 1986), (Adhikary and Eilers 2005). Il a aussi été montré que dans les lignées de cellules de lymphome de Burkitt, la réactivation d'EBV et l'expression de protéines tardives provoque une inhibition de l'apoptose via une inhibition de l'expression de facteurs proapoptotiques (Oussaief *et al.* 2009). On constate une corrélation entre la répartition des lymphomes de Burkitt endémique et celle du paludisme, ou malaria, (Figure 10) causé par *Plasmodium falciparum* qui est reconnu comme étant avec EBV un cofacteur des lymphomes de Burkitt. Certaines protéines de *P. falciparum*, tel qu'un domaine riche en cystéine de l'antigène membranaire (CIDR1 α) sont impliquées dans l'activation de lymphocytes B et peuvent également jouer un rôle dans la réactivation d'EBV (Chene *et al.* 2007). Dans les lymphocytes B de lymphome de Burkitt, EBV présente l'expression des gènes caractéristiques d'un état latent de type 1 avec expression seulement de EBNA1 (Damania 2004) pour revue.

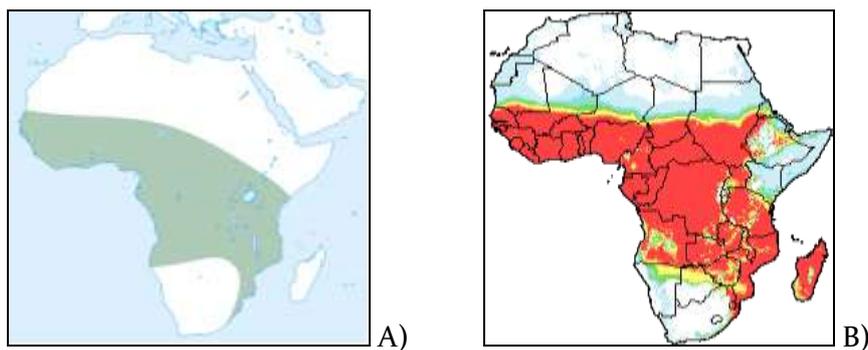


Figure 10 : Répartition géographique A) du Lymphome de Burkitt (Van den Bosch *et al.*, 2004) **et B) du paludisme** (Source : Mapping Malaria Risk in Africa, www.mara.org.za). La ceinture des lymphomes et la zone de prévalence du paludisme se recouvrent, localisées d'Est en Ouest en Afrique sub-saharienne

- Lymphome de Hodgkin : La maladie de Hodgkin est un syndrome lymphoprolifératif affectant les lymphocytes B. Les lymphomes de Hodgkin classiques sont associés dans près de 40% des cas à EBV. Dans ces lymphomes EBV exprime les gènes caractéristiques d'une latence de type II avec l'expression des facteurs EBNA1, LMP1 et LMP2. Ce lymphome transforme lymphocytes B en cellules lymphoïdes B atypiques malignes, les cellules de Reed-Sternberg. Cette pathologie est caractérisé par exemple par une augmentation de l'activité de NF κ B, un anti-apoptotique connu (Bargou *et al.* 1997). Les cellules atteintes peuvent exprimer des

variants de LMP1 différents de ceux des cellules B normales, qui pourraient être impliqués dans la tumorigénicité (Faumont *et al.* 2009).

ii) Les carcinomes épithéliaux :

♦ Le carcinome indifférencié du nasopharynx : Les carcinomes du nasopharynx (NPC) sont très répandus dans certaines régions du monde, particulièrement en Asie du Sud-Est. Les patients atteints de carcinome du nasopharynx présentent un taux élevé d'anticorps anti EBV, et la présence d'ADN d'EBV a été observée dans 100% des carcinomes indifférenciés du nasopharynx étudiés (zur Hausen *et al.* 1970) suggérant l'association entre le virus et ce carcinome (Henle *et al.* 1970). Les cellules de NPC expriment LMP1 et EBNA1 (Young *et al.* 1988) caractéristiques d'un état latent de type II (Damania 2004). BARF1 est également exprimé dans environ 90% des cas (Decaussin *et al.* 2000) et (Seto *et al.* 2005). Les gènes viraux les plus abondamment transcrits dans les NPC codent pour les ARN non messagers EBER 1 et 2. Les patients atteints de NPC présentent également des taux élevés d'anticorps anti DNase (Cheng *et al.* 1980). La réactivation d'EBV semble être impliquée dans la pathologie du NPC, l'activateur EB1/Zebra étant capable d'induire l'expression d'interleukines cellulaires qui peuvent être impliquées dans la croissance tumorale (Hsu *et al.* 2008).

♦ Les autres carcinomes épithéliaux :

EBV est associé aux cancers gastriques dans environ 10 % des cas, avec l'expression de l'oncogène BARF1 dans 100 % des cas EBV positifs (Seto *et al.* 2005). Cette protéine peut donc jouer un rôle important dans la tumorigénicité (zur Hausen *et al.* 2000). Environ 50 % des cas de cancers du sein ont également révélé la présence d'EBV dans quelques foyers de cellules (Bonnet *et al.* 1999; Perkins *et al.* 2006), mais le rôle du virus dans la tumorigénèse reste controversé.

iii) EBV chez l'immunodéprimé

Les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (SLPT) surviennent après une greffe chez près de 5 % des patients greffés. Ces SLPT sont associés à EBV dans environ 90 % des cas et certainement causés par l'inhibition de la réponse immunitaire des cellules T ((Thorley-Lawson and Gross 2004) pour revue). Le traitement de maladies auto-immunes par le methotrexate, agent chimiothérapeutique répandu peut également entraîner des syndromes lymphoprolifératifs dont 50% sont associés à EBV ((Tran *et al.* 2008) pour revue). Les patients porteurs du VIH ou atteints du SIDA sont également plus susceptibles de développer des

pathologies associées à EBV. En effet ces patients présentent différents types de lymphomes associés à EBV dans 60 à 90 % des cas selon le type de lymphome, et même si le rôle direct d'EBV n'est pas connu il peut être un cofacteur dans le développement des lymphomes par association à un système immunitaire compromis et d'autres facteurs oncogènes (Carbone *et al.* 2009).

La leucoplasie chevelue de la langue est une pathologie associée au SIDA, dont l'agent étiologique est EBV (Greenspan *et al.* 1985 a). La mise en évidence d'EBV dans des cellules de leucoplasie orale chevelue de la langue révéla que le virus était capable de se répliquer au sein des cellules épithéliales (Greenspan *et al.* 1985 b).

iv) Autres types de pathologie

Certaines études controversées lient EBV à la sclérose multiple. Cette maladie est causée par une démyélination du système nerveux central et semble être liée dans 100% des cas à la présence d'EBV avec un taux d'IgG anti EBNA-1 élevé (Farrell *et al.* 2009). L'infection active chronique par EBV semble être associée au syndrome lymphoprolifératif des cellules T, (Kanegane *et al.* 1998) mais le rôle d'EBV dans la pathologie lors d'infection de ces cibles atypiques que sont les cellules T est encore méconnu.

v) Les traitements antiviraux

Les molécules qui peuvent être des candidates dans le traitement de l'infection par EBV sont des analogues nucléotidiques (cidofovir, adefovir) ou nucléosidiques (acyclovir, ganciclovir) acycliques ainsi que des analogues de pyrophosphates qui ont pour cible l'ADN polymérase virale ((Gershburg and Pagano 2005) review). Malgré une bonne efficacité de l'acyclovir ([9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine]triphosphate) sur l'inhibition de la réplication d'EBV en culture cellulaire (Datta *et al.* 1980; Pagano *et al.* 1983), les essais cliniques n'ont pas révélé son efficacité en traitement de la MNI (van der Horst *et al.* 1991). L'efficacité de l'acyclovir a été mise en évidence pour l'inhibition de la réplication d'EBV dans les cellules épithéliales de la leucoplasie chevelue de la langue (Resnick *et al.* 1988).

La plupart des autres pathologies sont liées à la phase latente d'EBV et la réplication de l'épisome viral de facteurs cellulaires. Il est donc peu probable que les thérapies antivirales visant à inhiber les enzymes virales de synthèse de l'ADN puissent être efficaces dans ce contexte. Il a été montré que le traitement par l'hydroxyurée entraînerait la perte d'épisomes

(Chodosh *et al.* 1998; Pan *et al.* 2005) et serait efficace dans le traitement d'un lymphome du système nerveux associé à EBV chez des patients atteints du SIDA (Slobod *et al.* 2000). Récemment, des études ont révélé l'efficacité d'une thérapie génique pour augmenter l'efficacité de traitements existants contre des cancers associés à EBV en ciblant LMP1 qui est seulement exprimée dans les lignées tumorales (Lifang *et al.* 2008).

Le Rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur CD20 des lymphocytes B, ayant un effet cytotoxique sur ces cellules. L'efficacité de cet anticorps a été mise en évidence dans les pathologies lymphoprolifératives associées à EBV tels le SLPT (Kunitomi *et al.* 2007).

III. Le contexte du travail de thèse

1) L'étude structurale de protéines EBV au sein de projets européens

J'ai débuté mon expérience de recherche au sein de l'UVHCI dans l'équipe EBV dirigée par le Pr Wim Burmeister. L'objectif de recherche du groupe est d'étudier d'un point de vue structural et fonctionnel des protéines du virus d'Epstein-Barr. Les structures tridimensionnelles sont étudiées en vue de développer des molécules inhibitrices pouvant conduire à l'élaboration de nouvelles thérapies anti-EBV. A mon arrivée, les travaux de l'équipe s'inscrivaient dans un projet international nommé SPINE « Structural Proteomics In Europe ». Ce projet visait à rassembler des équipes de recherche et des technologies et méthodologies pointues en biologie structurale, dans le but d'étudier la structure d'un grand nombre de macromolécules biologiques ayant un rôle dans des pathologies humaines.

En effet l'étude des structures atomiques de protéines impliquées dans la pathogénicité permet la conception rationnelle de nouvelles thérapies. L'information structurale permet de visualiser la liaison de molécules inhibitrices aux protéines, de déterminer les zones intéressantes à cibler en prenant en compte des notions d'encombrement physique. Les enzymes sont des cibles thérapeutiques très intéressantes car elles sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques essentielles. Outre l'implication des enzymes humaines dans les maladies non-infectieuses telles les maladies génétiques, elles peuvent être impliquées dans les maladies infectieuses car essentielles à la survie des organismes pathogènes. L'inhibition des pathogènes par l'inactivation d'enzymes essentielles a été l'objectif principal d'un grand

nombre de développements pharmacologiques en thérapies antivirales notamment. Il existe plusieurs exemples de thérapies antivirales ciblant les enzymes, notamment contre la protéase et la reverse transcriptase du VIH et plus récemment contre l'intégrase de ce virus (Markowitz *et al.* 2006; Katlama and Murphy 2009), review.). Les thérapies antigrippales zanamivir et oseltamivir (commercialisé sous le nom de Tamiflu®) ont été élaborées de manière rationnelle grâce à la structure de la neuraminidase (von Itzstein *et al.* 1993). Il y a d'autres domaines d'implications des enzymes dans le développement pharmacologique, par exemple de nouvelles approches dans la mise au point de molécules contraceptives peuvent être exploitées grâce à la structure de l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase contenue dans le sperme (Frayne *et al.* 2009).

C'est pour cette raison que l'équipe du Pr Wim Burmeister a choisi d'étudier en priorité les enzymes d'EBV. La mise en place de systèmes à haut débit à l'EMBL permet le criblage de nombreuses conditions de cristallisation pour les protéines purifiées. Au cours du projet SPINE, entre 2003 et 2006, plusieurs structures de protéines d'EBV furent résolues (Tarbouriech *et al.* 2006 a): deux enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, la dUTPase ou déoxyuridine triphosphatase catalysant l'hydrolyse du dUTP en dUMP (Tarbouriech *et al.* 2005) et l'UNG ou Uracile ADN-glycosylase (Geoui *et al.* 2007), ainsi que la protéine non-enzymatique BARF1 (Tarbouriech *et al.* 2006 b) une protéine oncogène. La structure de la protéase, cible antivirale inspirée du succès de la thérapie anti protéase du VIH fut également déterminée au début du projet SPINE (Buisson *et al.* 2002).

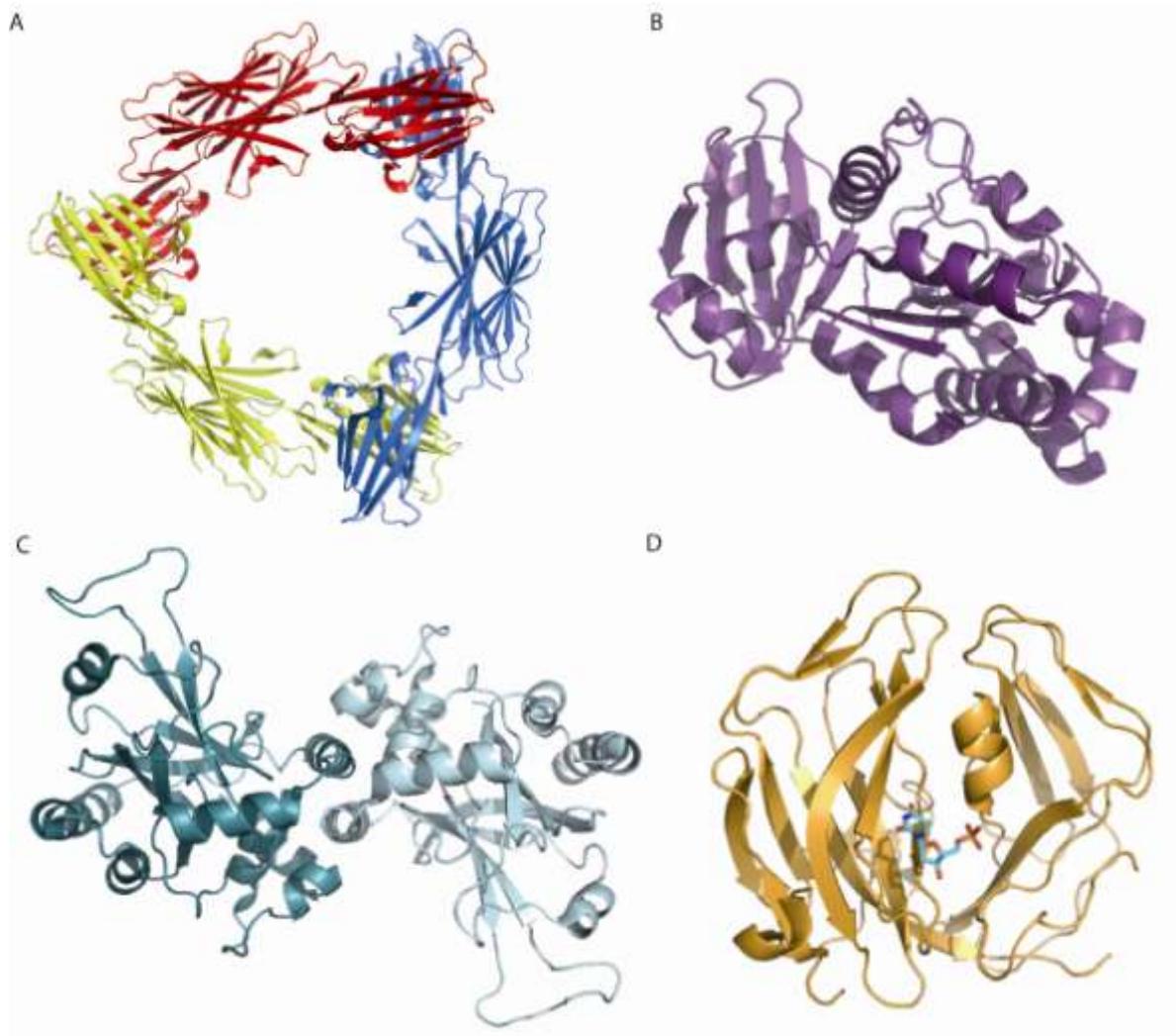


Figure 11 : Quatre structures cristallographiques de protéines EBV obtenues au sein de l'équipe EBV de l'UVHCI au cours du projet SPINE. A) l'hexamère de BRF1 formant un anneau (Tarbouriech *et al.* 2006 b), B) UNG, enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN via l'excision de l'uracile, en complexe avec son inhibiteur (Geoui *et al.* 2007), C) la protéase sous forme dimérique (Buisson *et al.* 2002) et D) la dUTPase en complexe avec le produit dUMP (Tarbouriech *et al.* 2005).

Quelques structures d'autres protéines d'EBV sont disponibles à ce jour et ont permis d'éclairer nos connaissances sur leur rôle et leur mode de fonctionnement au sein du cycle complexe d'EBV.

2) Le sujet de la thèse

i) Le mécanisme enzymatique de la dUTPase d'EBV

Un autre axe développé au cours de ma thèse a été la caractérisation du mécanisme enzymatique de la dUTPase d'EBV. En effet durant mon stage de Master 2, j'ai entrepris la caractérisation fonctionnelle de la dUTPase d'EBV dont la structure avait été déterminée un an plus tôt dans le laboratoire (Tarbouriech *et al.* 2005). Plusieurs éléments intéressants ont été mis en évidence pendant ce stage, et la thèse était l'opportunité d'approfondir cette étude via la caractérisation structurale et fonctionnelle de cette protéine.

ii) SPINE 2 Complexes: Etude de la protéine EB2

Ma thèse débuta en octobre 2006 lors de la suite du programme SPINE, nommé « SPINE2 Complexes », qui s'intéressait aux structures de complexes protéiques impliqués dans l'immunité, la neurologie ou les cancers. Pour ce projet l'équipe EBV de l'UVHCI Grenoble travailla en collaboration avec Evelynne Manet de l'ENS de Lyon, le groupe de T. Ooka à Laennec, Lyon ainsi que le groupe de P. Busson à l'IGR, Villejuif. Dans ce contexte nous nous sommes attachés à caractériser les complexes entre protéines virales et leurs partenaires cellulaires :

- ♦ BARF₁ d'EBV en complexe avec la protéine cellulaire CSF₁
- ♦ LMP₁ avec les protéines des voies de signalisation impliquées
- ♦ ZEBRA et les facteurs cellulaires avec lesquels elle interagit
- ♦ EB₂ protéine précoce d'EBV avec plusieurs facteurs cellulaires précédemment décrits

Le sujet de ma thèse a été défini par rapport au contexte scientifique entourant l'équipe de recherche et comprenait l'étude structurale et fonctionnelle de la protéine EB₂ en complexe avec ses partenaires cellulaires. Ce projet fut conduit avec l'équipe de l'ENS de Lyon, qui avait effectué une étude fonctionnelle approfondie de cette protéine et caractérisé diverses protéines partenaires.

Chapitre II : La dUTPase, une enzyme du métabolisme des acides nucléiques

Introduction

I. Les nucléotides et acides nucléiques

Les nucléotides sont impliqués dans un grand nombre de processus biologiques. Ce sont les composants essentiels de l'ARN et l'ADN et ils servent de précurseurs à la biosynthèse d'autres molécules biologiques. L'ATP est certainement le plus « célèbre » nucléotide car il permet de fournir l'énergie d'un grand nombre de réactions biochimiques et est le précurseur des coenzymes NAD⁺ et le coenzyme A, ainsi que du messenger secondaire AMPc.

Les cinq bases principales composant les acides nucléiques sont l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G), l'uracile (U) et la thymine (T)(Figure 12). Les acides nucléiques sont composés de ribonucléotides, comprenant la base liée à un sucre (ribose ou désoxyribose) et un ou plusieurs groupements phosphate. L'ARN est synthétisé à partir des ribonucléotides suivants : ATP, CTP, GTP et UTP, et l'ADN à partir des désoxyribonucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP. Dans l'ADN double brin, les purines G et A s'apparient respectivement avec les pyrimidines C et T (ou U pour l'ARN) par des liaisons hydrogène formant ainsi les paires de bases canoniques Watson et Crick.

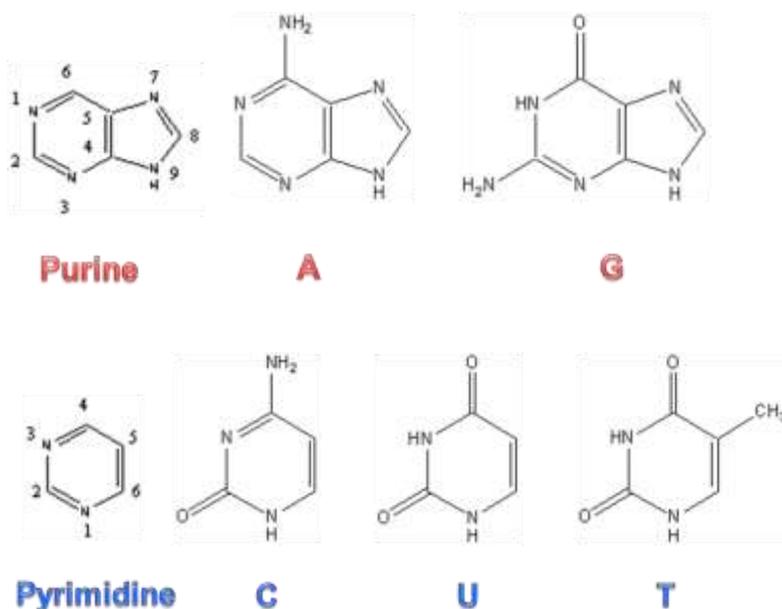


Figure 12 : Bases puriques et pyrimidiques. Les bases sont liées au ribose via l'atome N9 pour les purines et N1 pour les pyrimidines. La thymine, présente seulement dans l'ADN ne diffère de l'uracile (présente seulement dans l'ARN) que par la présence d'un groupement méthyle en C5.

II. Voies de synthèse *de novo* des nucléotides

Les nucléotides peuvent être synthétisés *de novo*, à partir d'éléments simples fournis par les différentes voies métaboliques. Ils peuvent également être synthétisés par recyclage

d'éléments provenant de leur dégradation, tels que la base libre ou le sucre qui nécessiteront moins d'étapes pour produire un nucléotide fonctionnel. Les voies de synthèse *de novo* des nucléotides sont étroitement liées à de nombreuses voies métaboliques cellulaires, telle que la voie des pentoses phosphates ou la synthèse des acides aminés. Ces voies sont coûteuses en énergie et sont minutieusement régulées notamment via des mécanismes de rétroaction négative des produits des réactions, qui auront un effet inhibiteur sur la « committed step » une étape d'engagement essentielle de la réaction de synthèse. Voici un résumé succinct des voies de synthèse *de novo* des nucléotides.

1) Les purines

Les purines sont synthétisées *de novo* à partir d'acides aminés (glutamine, glycine et aspartate), de 10-formyl tétrahydrofolate et de CO₂ via des réactions complexes. Le ribose 5' phosphate est fourni par le PRPP (5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate), lui-même obtenu à partir d'ATP et ribose-5-phosphate. La base purique est ensuite assemblée directement sur le ribose. Ces réactions permettent de former l'inosinate (IMP), précurseur de l'AMP et du GMP, eux-mêmes inhibiteurs de leur propre synthèse à partir de l'IMP. La production de nucléosides triphosphates et de désoxyribonucléotides est identique pour les purines et pyrimidines et sera adressé plus bas.

2) Les pyrimidines

A la différence des purines, l'anneau pyrimidique est synthétisé avant d'être associé au ribose phosphate. La réaction entre l'acide aminé aspartate et le carbamoyl phosphate suivie de la cyclisation de l'anneau pyrimidique permet la production de l'orotate, précurseur cyclique de la base pyrimidiques (Figure 13). Comme pour les purines, le ribose phosphate est fourni par le PRPP, et la réaction de celui-ci avec l'orotate suivi d'une décarboxylation produit l'UMP. L'UMP sert alors de précurseur dans les voies de synthèse *de novo* des thymines et cytosines, ainsi que d'inhibiteur de la synthèse de carbamoyl pour réguler cette voie de biosynthèse.

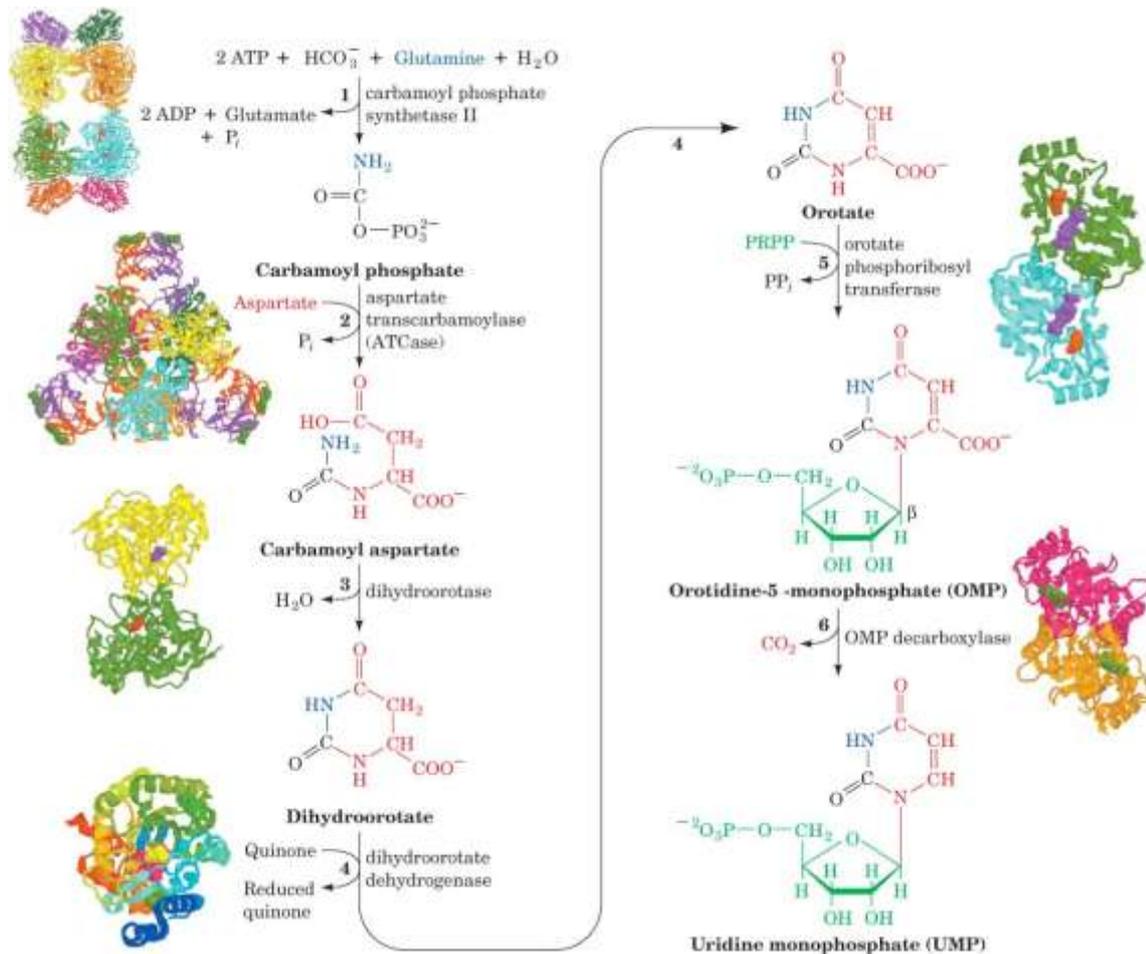


Figure 13 : Voie de synthèse *de novo* de l'UMP. Sept étapes sont nécessaires à la synthèse *de novo* de l'UMP, précurseur des nucléotides pyrimidiques.

A la fois pour les purines et les pyrimidines, la conversion des nucléosides monophosphates en di- puis triphosphates est réalisée par des kinases qui utilisent l'ATP comme donneur de phosphate. Dans le cas des pyrimidines, l'UTP ainsi produit après deux phosphorylations successives de l'UMP permet la formation de CTP via amination par la glutamine et consommation d'une molécule d'ATP. Le CTP régule négativement la formation d'un précurseur de l'orotate à partir d'aspartate et de carbamoyl phosphate.

Les désoxyribonucléotides sont synthétisés par réduction des ribonucléosides diphosphates, grâce à la ribonucléotide réductase ainsi que le cofacteur NADPH. Cette réduction est essentielle pour permettre la synthèse du dTMP (Figure 14). Celui-ci ne peut être produit qu'à partir de dUMP par méthylation effectuée par l'enzyme Thymidylate synthase en présence du tétrahydrofolate, donneur d'électrons et de groupement méthyle. La seule voie de production du dTTP qui sera incorporé dans l'ADN est à partir du dUMP, dont la principale voie de synthèse *de novo* est à partir de l'hydrolyse du dUTP par l'action de la dUTPase. La

dCTP déaminase permet de produire le dUTP nécessaire à cette réaction chez les bactéries (Wang and Weiss 1992). Chez les eucaryotes la déamination survient essentiellement au niveau du dCMP par l'action d'une déaminase hexamérique, absente chez les bactéries (Almog *et al.* 2004). L'action combinée de la dCTP déaminase et de la dUTPase permet de produire 70 % du dUMP, révélant l'importance de ces enzymes au sein du métabolisme (Neuhard and Thomassen 1971).

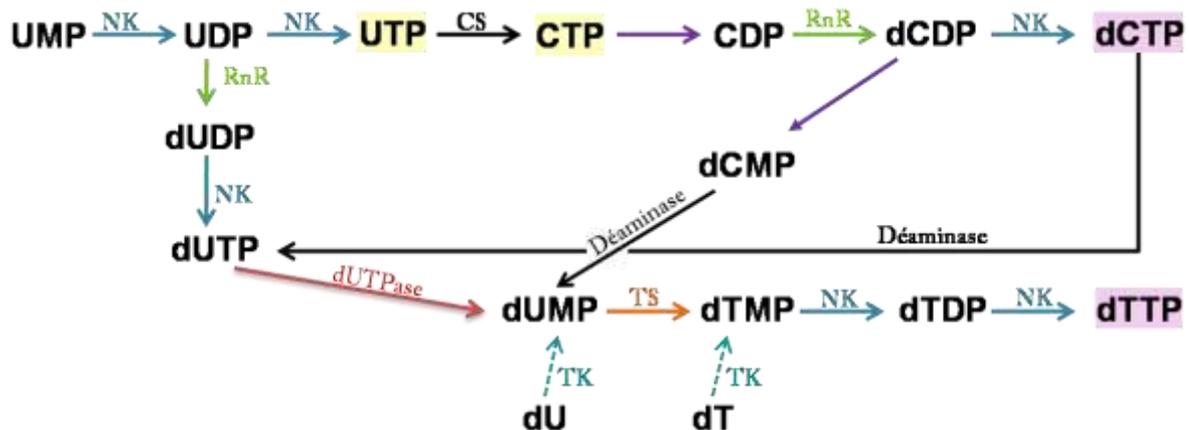


Figure 14 : Voie de synthèse des nucléotides pyrimidiques à partir d'UMP. Les nucléotides sur fond rose seront incorporés dans l'ADN, et ceux sur fond jaune dans l'ARN. Les flèches pleines sont les voies de synthèse de novo essentielles, les flèches en pointillés les voies de recyclage. Les **phosphorylations** sont en bleu, NK : Nucléotide (mono ou diphosphate) kinase, TK : Thymidine kinase. En noir les réactions d'**amination** ou **désamination**, CS : CTP synthétase. Les **réductions** de NDP en dNDP sont indiquées en vert, RnR : Ribonucléotide Réductase. En rouge, **l'hydrolyse du dUTP** par la dUTPase : dUTP pyrophosphatase. En orange la **méthylation**, TS : Thymidylate Synthase.

III. L'uracile dans l'ADN : L'importance de la dUTPase

1) Les causes de la présence d'uracile dans l'ADN

La méthylation du dUMP produit par hydrolyse est la seule voie de synthèse *de novo* du dTTP, faisant du dUTP un précurseur important, mais celui-ci n'est pas directement incorporé dans les acides nucléiques. L'uracile est une base naturelle de l'ARN (utilisé sous la forme UTP) mais son incorporation dans l'ADN sous forme de dUTP entraîne des conséquences parfois lourdes pour l'organisme. Il y a deux causes principales à la présence d'uracile dans l'ADN.

Celle-ci peut être causée par désamination (enzymatique ou spontanée) d'une cytosine (pour revue, (Yonekura *et al.* 2009)), résultant en une paire de bases G:U au lieu de la paire canonique G:C. Si l'erreur n'est pas réparée, lors de la réplication cette paire de bases deviendra A:T et persistera dans le génome, pouvant conduire à des mutations dysfonctionnelles ou létales. Pour cette raison la cellule a développé des mécanismes de réparation visant à éliminer l'uracile de l'ADN.

Une autre cause de la présence d'uracile dans l'ADN est l'augmentation du pool de dUTP. En effet, la majorité des ADN polymérases ne peuvent discriminer entre dTTP et dUTP, le taux d'incorporation est donc directement dépendant du ratio dUTP/dTTP, qui se situe autour de 0.01 dans des cellules mammifères (Traut 1994). Afin de maintenir ce faible taux de dUTP dans la cellule, le mécanisme mis en œuvre par l'ensemble des systèmes vivants est l'hydrolyse du dUTP en dUMP par l'enzyme dUTPase. Cette hydrolyse permet de diminuer la quantité de dUTP et permettant d'augmenter la synthèse de dTTP. En cas de forte concentration de dUTP, lors d'une inhibition de la dUTPase, celui-ci est incorporé dans l'ADN. Cette incorporation n'est pas mutagène en soi, ne modifiant pas l'interaction avec la base opposée (A), mais les mécanismes de réparation à l'encontre de l'uracile dans l'ADN sont tout de même activées, et peuvent être à l'origine de la perte d'intégrité du génome.

2) Les mécanismes de réparation

La présence d'Uracile dans l'ADN déclenche la réparation par l'excision de l'uracile (Tye and Lehman 1977). Cette voie est initiée par l'attaque par l'Uracile DNA glycosylase (UNG) qui clive la liaison N-glycosylique entre la base uracile et le désoxyribose du squelette phosphate (Lindahl *et al.* 1977). Associé à l'action des endonucléases, déoxyribophosphodiesterase, ADN polymérase et ligase, la base est excisée et l'ADN réparé (Figure 15 A). Mais une excision excessive de bases résulte en une fragmentation de l'ADN double brin compromettant alors l'intégrité du génome (Figure 15 B). Ce phénomène est connu sous le nom de thymine-less cell death, ou la mort cellulaire engendrée par un fort ratio de dUTP/dTTP (Ingraham *et al.* 1986).

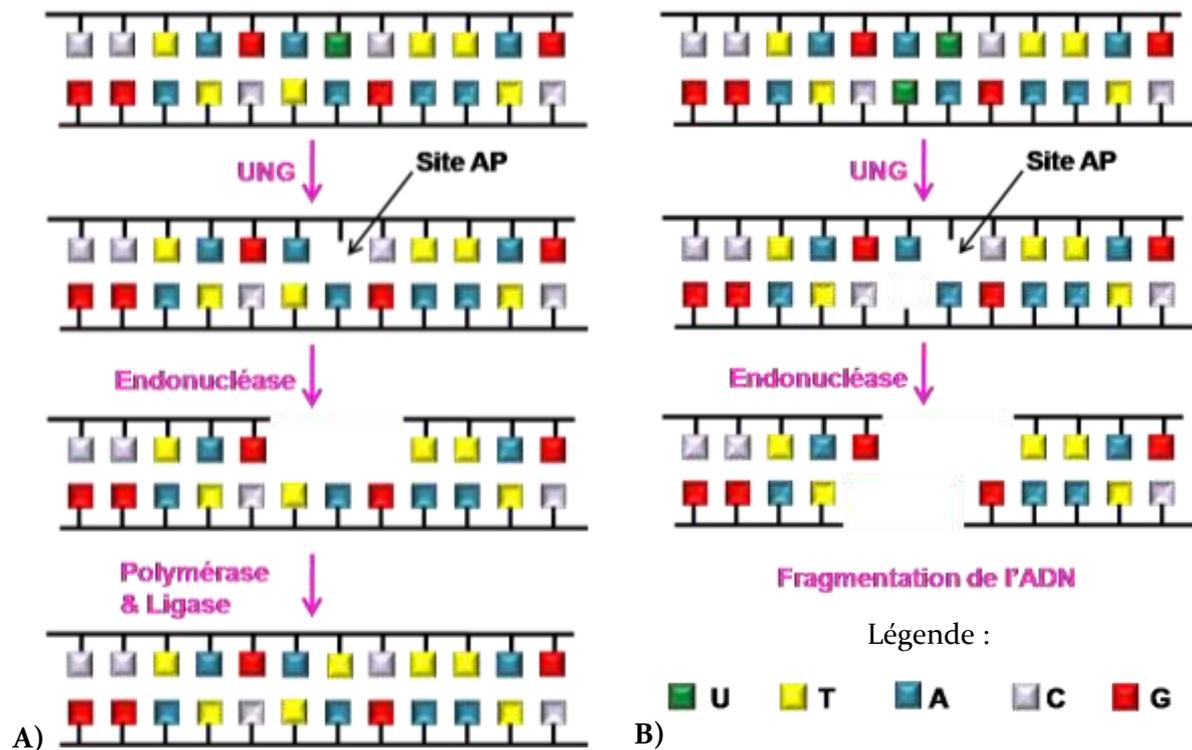


Figure 15: A) Mécanisme d'excision des bases et réparation de l'ADN lors de la présence d'Uracile. La base non canonique est reconnue et excisée par la DNA glycosylase (UNG dans le cas de l'incorporation d'uracile) créant un site abasique (AP) qui sera reconnu par l'endonucléase. Les bases manquantes de l'ADN seront restituées par l'ADN polymérase et la ligase. **B) Fragmentation de l'ADN après réparation de plusieurs uraciles dans la séquence du à une forte activité endonucléase.**

En résumé, l'enzyme ubiquitaire dUTPase joue deux rôles dans le métabolisme cellulaire : le maintien d'un faible ratio dUTP/dTTP, limitant la mésincorporation dans l'ADN, et la production de l'unique précurseur dans la synthèse du dTTP. Cette activité fait d'elle une enzyme essentielle dans le maintien de l'intégrité du génome. Il s'agit d'une enzyme indispensable pour la survie des organismes comme il a été montré pour *S. cerevisiae* et *E. coli* (Gadsden *et al.* 1993) & (el-Hajj *et al.* 1988).

IV. Pourquoi EBV code-t-il pour une dUTPase ?

La dUTPase est une enzyme ubiquitaire, présente chez tous les organismes « indépendants » et même chez certains virus (Baldo and McClure 1999). Certains virus possèdent un génome très

restreint et optimisent l'espace pour coder pour un nombre limité de protéines essentielles, telles que les protéines structurales ou glycoprotéines et quelques enzymes comme par exemple les polymérase. Les virus dépendent de la machinerie cellulaire pour assurer les autres fonctions. Cependant, beaucoup de virus et notamment les herpesvirus dont EBV, les poxvirus ou certains rétrovirus codent pour des protéines qui sont également codées par le génome de la cellule hôte, comme l'UNG et la dUTPase (Preston and Fisher 1984). La raison pour cela est certainement expliquée par le fait qu'EBV possède la capacité de se répliquer dans des cellules quiescentes qui contiennent une faible concentration de nucléotides avec un ratio élevé de dUTP/dTTP (pour revue, (Chen *et al.* 2002)). Chez l'homme le gène *dut* code pour deux isoformes de la dUTPase, l'une mitochondriale et l'autre nucléaire exprimée en quantités importantes lors de la réplication mais presque indétectable dans des cellules quiescentes (Ladner and Caradonna 1997), (Ladner *et al.* 1996). Le fait que les virus codent pour ces protéines révèle qu'ils sont aussi sensibles à la présence d'uracile dans leur génome. L'activation d'herpesvirus dans les cellules infectées de manière latente résulte en l'expression de la dUTPase virale pour EBV (Williams *et al.* 1985), HSV (Williams 1988) et KSHV (Kremmer *et al.* 1999).

La délétion ou mutation de la dUTPase chez différents virus résulte en une réduction de la virulence ou de la production de virions infectieux. Des poneys infectés avec le rétrovirus EIAV délété du gène codant pour la dUTPase présentent un taux de virus 10 à 100 fois inférieur aux témoins infectés avec le virus sauvage (Lichtenstein *et al.* 1995). Les virus HSV-1 dépourvu du gène codant pour la dUTPase possède la même capacité à établir la latence dans le système nerveux, mais une neurovirulence et une capacité de réactivation fortement diminuées (Pyles *et al.* 1992). L'absence de la dUTPase chez le virus de la vaccine n'a pas d'effet sur la réplication virale, mais résulte en l'efficacité accrue d'un antiviral compétitif du dTMP (Prichard *et al.* 2008). Les dUTPases virales sont donc de potentielles cibles thérapeutiques pour lutter contre les infections virales ou la réactivation des herpesvirus après une phase de latence.

V. Les dUTPases comme cibles thérapeutiques

1) Les autres implications de la dUTPase d'EBV

In vivo, dans les cellules infectées par EBV, la dUTPase virale est exprimée dans les cellules où une réplication virale est active ce qui peut être mis en évidence par l'expression de EB1/Zebra. En effet, la dUTPase est détectée essentiellement dans les noyaux (parfois dans le cytoplasme) de cellules épithéliales supérieures de leucoplasie chevelue de la langue, ainsi que dans quelques cellules lymphoïdes lors de mononucléose (Fleischmann *et al.* 2002). L'expression de la dUTPase virale est observée dans des cellules où la dUTPase cellulaire n'est pas exprimée, illustrant l'état quiescent des cellules. Outre le rôle de la dUTPase d'EBV dans la synthèse des acides nucléiques, d'autres implications de cette enzyme ont été étudiées quant à son rôle éventuel dans la physiopathologie d'EBV.

L'expression de la dUTPase lors de la réactivation d'EBV engendre la synthèse d'anticorps contre cette enzyme, absents généralement chez les porteurs sains (Sommer *et al.* 1996), cette enzyme peut donc être impliquée dans des mécanismes plus complexes que sa seule activité catalytique. Il a été montré que la dUTPase d'EBV était capable de déréguler le système immunitaire en diminuant l'expression de l'INF- γ lorsque la protéine purifiée est injectée dans des souris et en augmentant le taux d'expression de TNF- α et les interleukines 1, 6 et 10 dans des cellules mononucléaires de sang *in vitro* ((Padgett *et al.* 2004), (Glaser *et al.* 2005), (Glaser *et al.* 2006)). Il est possible que la dUTPase d'EBV joue un deuxième rôle dans la pathologie des infections avec EBV. En effet, les cytokines telles l'IFN- γ sont importantes dans la lutte de l'organisme contre les infections virales et elles peuvent être inhibées par l'interleukine 10 (Fiorentino *et al.* 1989). La stimulation de l'IL-10 par la dUTPase d'EBV pourrait potentiellement faciliter l'infection virale. De plus récentes études permettent d'éclaircir les mécanismes de dérégulation du système immunitaire de l'hôte : l'expression de TNF- α par la dUTPase d'EBV est activée par la voie NF- κ B via le récepteur TLR2 (Toll-like receptor) (Waldman *et al.* 2008), (Ariza *et al.* 2009). Ce type de récepteur reconnaît et lie des motifs spécifiques pathogènes, les PAMP (pathogen associated molecular patterns) ce qui engendre une cascade de signalisation intracellulaire. La dUTPase est la première évidence de l'interaction d'une protéine non-structurale d'EBV avec ce type de récepteur (Figure 16).

L'interaction de la dUTPase d'EBV avec le TLR2 cellulaire met en évidence un rôle non enzymatique de la dUTPase agissant au niveau extracellulaire, malgré une localisation plutôt cytoplasmique ou nucléaire de cette protéine. Les mécanismes impliquant la dUTPase dans la

pathologie de l'infection par EBV ne sont pas encore bien compris, mais son activation de voies de signalisation cellulaire impliquées dans la réponse immunitaire rend cette enzyme d'autant plus intéressante à cibler en vue de thérapie anti-EBV.

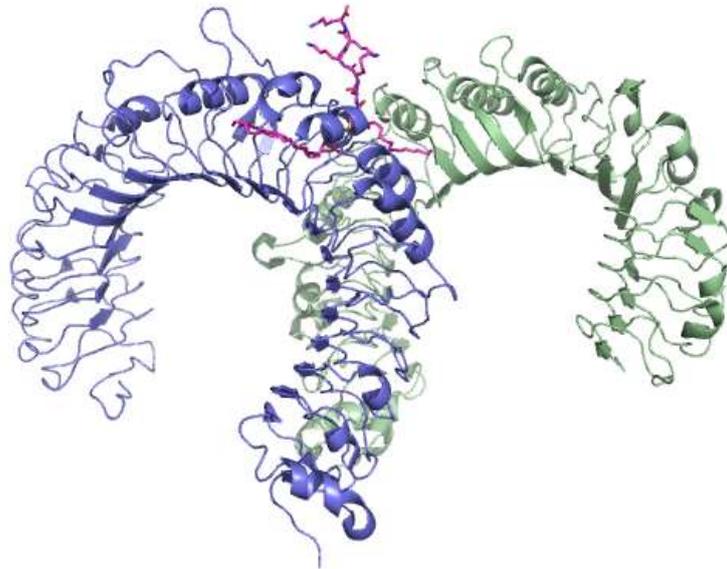


Figure 16 : Structure du complexe de récepteurs TLR2-TLR1 (Jin *et al.* 2007). Seuls les domaines extracellulaires sont représentés, TLR2 en bleu et TLR1 en vert, reliés par un lipopeptide adaptateur (rose). Après liaison d'une protéine à ce récepteur, telles les lipoprotéines pathogènes ou les PAMP, les deux sous-unités sont rapprochées et une cascade de signalisation est déclenchée, activant différentes voies de signalisation.

2) Les thérapies anti-dUTPase

Le ciblage de dUTPases virales avec des thérapies antivirales a été suggéré déjà il y a 25 ans lors des premières études visant à différencier les propriétés de dUTPase cellulaire de celle de HSV (Caradonna and Adamkiewicz 1984). Le métabolisme des thymines est également une voie très ciblée en chimiothérapie avec l'usage d'analogues pyrimidiques, tels le 5-fluorouracile (5-FU) qui est largement utilisé dans les cas de cancer colorectal et également de cancer du sein. Le 5-FU inhibe l'action de la thymidylate synthase produisant une accumulation du pool de dUMP, qui peut être converti en dUTP sous l'action de kinases. Ainsi l'activité dUTPase peut être ciblée en vue d'une multi-thérapie car l'enzyme est exprimée largement dans les cellules tumorales en division (Ladner *et al.* 2000).

VI. Plusieurs familles de dUTPase

Les dUTPases peuvent être classifiées en 3 groupes en fonction de leur organisation oligomérique.

1) Les dUTPases Homotrimériques

Les dUTPases homotrimériques sont les plus courantes présentes dans l'ensemble des organismes, les eucaryotes, certains virus comme le virus de l'immunodéficience féline (FIV) ou le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV), et certains prokaryotes tels *E.coli* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Les enzymes des différents organismes sont très similaires et sont composées de 5 motifs conservés (McGeoch 1990). Elles contiennent 3 sites actifs à l'interface des sous-unités (Larsson *et al.* 1996) et chaque site actif est formé par des motifs provenant des 3 sous-unités (Figure 17 A & B). Les motifs I, II et IV sont fournis par un monomère, le motif III par un deuxième et le motif V flexible vient de la sous-unité opposée.

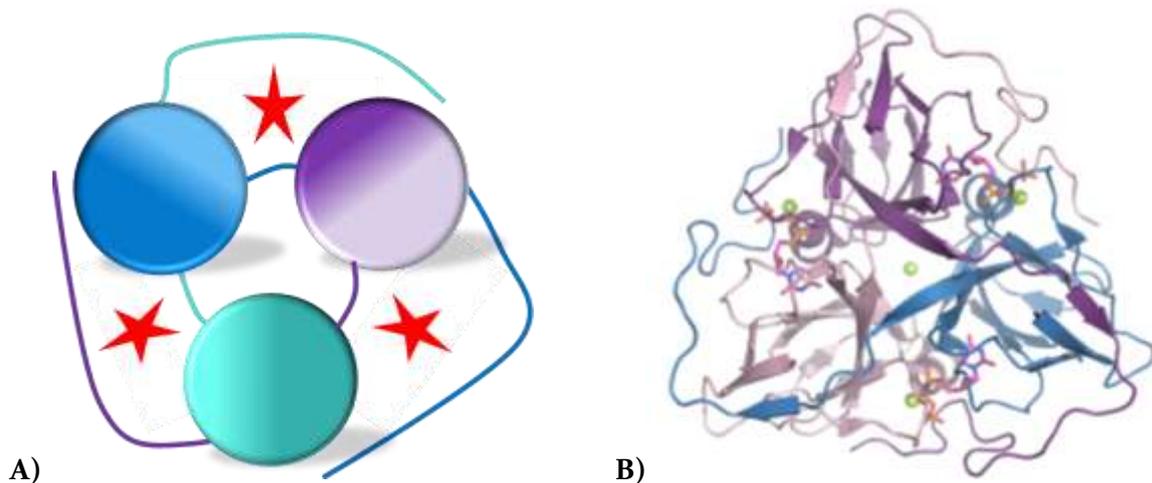


Figure 17: A) Schéma d'une dUTPase trimérique Les 3 sites actifs sont représentés par des étoiles rouges, et composés de résidus issus des 3 sous-unités (deux sous-unités représentées par des cercles et le domaine C-ter de la troisième sous-unité représenté par un trait). **B) dUTPase trimérique humaine en présence de l'inhibiteur α,β -imido-dUTP et de Mg^{2+} (PDB 3ehw, (Takacs *et al.* 2009)).** Les 3 sous-unités sont représentées en rose, violet et bleu, une molécule d'inhibiteur est présente dans chacun des 3 sites actifs, accompagnée d'un atome de Mg^{2+} (sphère verte). Le motif V flexible de la sous-unité opposée vient se rabattre sur le site actif.

Le motif V situé en partie C-terminale essentiel à l'activité de l'enzyme. La délétion de ce motif dans la dUTPase d'*E. coli* entraîne une perte de plus de 95% de l'activité mais a peu d'effet sur l'affinité pour le substrat, avec une variation du K_m d'un facteur 2 (Vertessy 1997). Ce motif est

flexible et souvent invisible dans les structures cristallographiques, mais récemment plusieurs structures en présence de l'analogue de substrat α,β -imido-dUTP permettent de le voir (Takacs *et al.* 2009) (Figure 17 B).

Chaque monomère contient environ 150 à 200 résidus et est composé essentiellement de feuillets β . Ces enzymes ont une très forte spécificité pour leur substrat dUTP, ne leur permettant pas d'accommoder des analogues présentant des modifications sur l'anneau uracile ou le ribose. Les dUTPases ont seulement une très faible activité (diminuée d'un facteur 10^5) sur les nucléotides dCTP, dTTP et UTP (Larsson *et al.* 1996).

Il a récemment été montré que l'archae *Methanocaldococcus jannaschii* et *M. tuberculosis* expriment une protéine trimérique bifonctionnelle, possédant à la fois une activité dCTP déaminase qui permet la production de dUTP, ainsi qu'une activité dUTPase permettant de former le produit final dUMP (Johansson *et al.* 2003), (Bjornberg *et al.* 2003). Une étude récente révèle que les deux activités sont simultanées. L'activité dUTPase est effectuée par un résidu Asp similaire au résidu catalytique des dUTPases trimériques (Siggaard *et al.* 2009) et le domaine C-terminal vient se rabattre sur le site actif (Helt *et al.* 2008). Malgré certaines similarités, ces protéines bifonctionnelles ressemblent davantage aux dCTP déaminases qu'aux dUTPases. Les organismes codant pour ces dUTPases ne possèdent pas de dCMP déaminase, donc la seule voie de synthèse *de novo* du dTTP est par la voie dCTP→dUTP→dUMP, rendant essentielles ces deux étapes étroitement liées (Figure 14).

2) Les dUTPases dimériques

Les dUTPases dimériques sont moins courantes et ne ressemblent pas aux dUTPases trimériques. Elles sont retrouvées par exemple chez *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* ou *Campylobacter jejuni* et possèdent également 5 motifs conservés qui sont complètement différents de ceux trouvés chez les dUTPases trimériques. Elles présentent une structure essentiellement en hélice α , avec un domaine rigide à l'interface entre les deux monomères et une partie flexible permettant d'accueillir le nucléotide (Figure 18, (Harkiolaki *et al.* 2004)). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le dUTP ainsi que le dUDP, avec une affinité 30 fois inférieure pour le dUDP (Hidalgo-Zarco *et al.* 2001), ce qui est différent des dUTPases des autres familles pour lesquelles le dUDP n'est pas hydrolysé (Larsson *et al.* 1996) et joue un rôle inhibiteur.

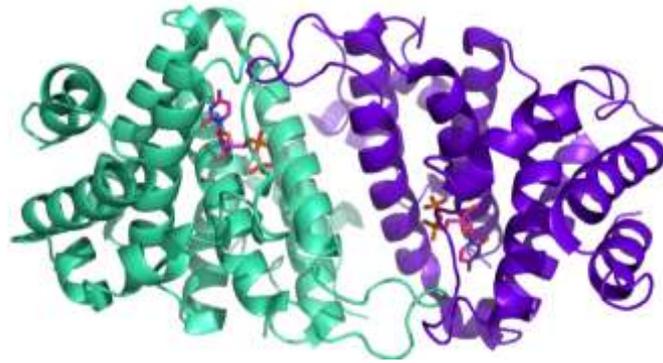


Figure 18 : Structure de la dUTPase dimérique de *Trypanosoma cruzi* en présence de dUDP (PDB 1ogk, (Harkiolaki *et al.* 2004)). Les deux sous-unités sont de couleurs différentes, les deux molécules de dUDP sont présentes dans les deux sites actifs.

3) Les dUTPases monomériques

Caenorhabditis elegans possède un gène codant vraisemblablement pour une dUTPase monomérique de 491 résidus contenant trois répétitions des cinq motifs répartis sur la séquence, potentiellement issus d'une triplification d'un gène codant pour un monomère des dUTPases trimériques (Hill *et al.* 1998).

Les herpesvirus aviaires et de mammifères possèdent aussi des dUTPases monomériques (Caradonna and Adamkiewicz 1984), avec les cinq motifs conservés chez les dUTPases trimériques présents en un seul exemplaire mais arrangés différemment sur le gène (McGeoch 1990) (Figure 19).

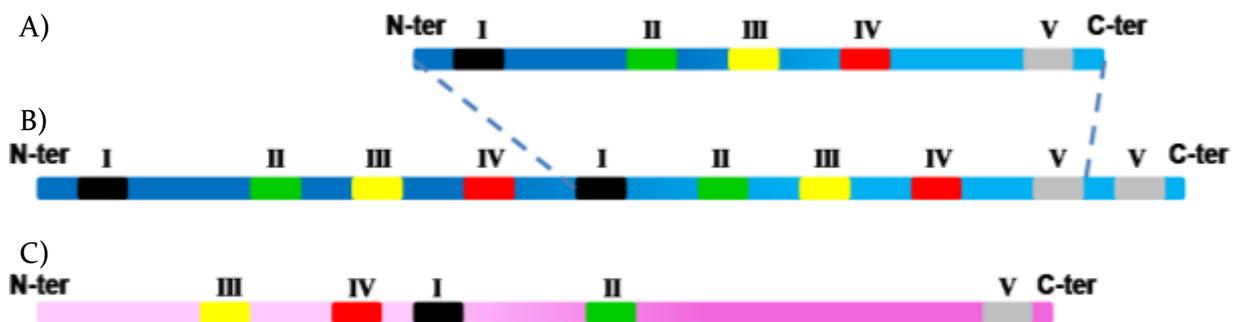


Figure 19 : Modèle d'évolution possible de dUTPase monomérique via la duplication d'un monomère de dUTPases trimérique. **A)** Une sous-unité de dUTPase trimérique (**Bleu**). **B)** Gène deux fois plus long après duplication du gène en A) et l'insertion entre les motifs IV et V (entre les pointillés). **C)** dUTPase monomérique d'herpesvirus (**Rose**) plus longue qu'un monomère d'une enzyme trimérique, certains motifs étant perdus pour aboutir à 5 motifs fonctionnels réarrangés sur la séquence.

Les enzymes monomériques ont pu évoluer à partir du gène codant pour un monomère de dUTPase trimérique. Ceci a pu survenir par la triplication du gène, pour former ainsi une protéine telle que celle de *C. elegans*. Une autre possibilité est la duplication interne du gène codant pour un monomère, où le gène dupliqué est inséré entre les motifs IV et V suivi d'une étape de recombinaison pour résulter en un monomère « réarrangé » (Tarbouriech *et al.* 2005), (Davison and Stow 2005).

HSV1 et EBV possèdent des gènes codant pour des dUTPases monomériques fonctionnelles (Williams 1988 et Williams 1985), dont les propriétés cinétiques sont similaires à celles des enzymes trimériques (Bergman *et al.* 1998), (Tarbouriech *et al.* 2005). La dUTPase monomérique d'EBV est codée par le gène BLLF3, permettant d'exprimer une protéine fonctionnelle de 279 résidus (31 kDa). Celle-ci est présente dans des lignées cellulaires après réactivation d'EBV par le TPA (Sommer *et al.* 1996). La structure de la dUTPase d'EBV (Tarbouriech *et al.* 2005) fut la première structure de dUTPase monomérique et a permis d'étudier le mécanisme fonctionnel de cette dUTPase en relation avec les dUTPases trimériques. Ces enzymes monomériques possèdent un site actif unique, formé par les 5 motifs conservés, entre 3 domaines remplaçant les 3 sous-unités des enzymes trimériques (Figure 20).

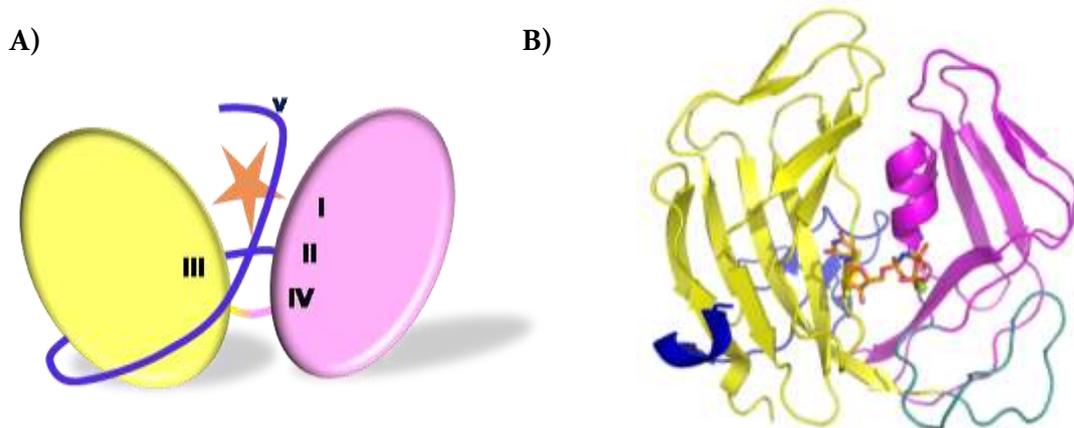


Figure 20 : **A) Schéma d'une dUTPase monomérique**, les domaines N (jaune) et C (rose) terminaux sont reliés par une région de liaison, la queue C-terminale (bleu) se rabat sur le site actif unique représenté par une étoile. Le domaine N-terminal porte le motif III, le domaine C-terminal porte les motifs I, II, IV et le motif V est contenu dans l'extrémité C-terminale flexible. Ces 3 domaines jouent les rôles des 3 sous-unités des dUTPases trimériques. **B) Structure cristallographique de la dUTPase d'EBV en présence d' α,β -imido-dUTP et de Mg^{2+}** ((Tarbouriech *et al.* 2005), code pdb 2bsy). Domaine 1, jaune, 2, rose et 3 bleu. Région de liaison, vert. Le motif V à l'extrémité de la queue C-terminale n'est pas visible du à sa flexibilité.

VII. La réaction catalysée par la dUTPase

1) La réaction

La dUTPase catalyse l'hydrolyse du dUTP en dUMP et pyrophosphate en présence de magnésium, engendrant le relargage d'ions H⁺ (Figure 21). Le dUTP a une affinité relativement élevée pour le magnésium et est souvent complexé à celui-ci en solution. Le magnésium est ainsi présent dans la réaction d'hydrolyse du dUTP, jouant un rôle de cofacteur.

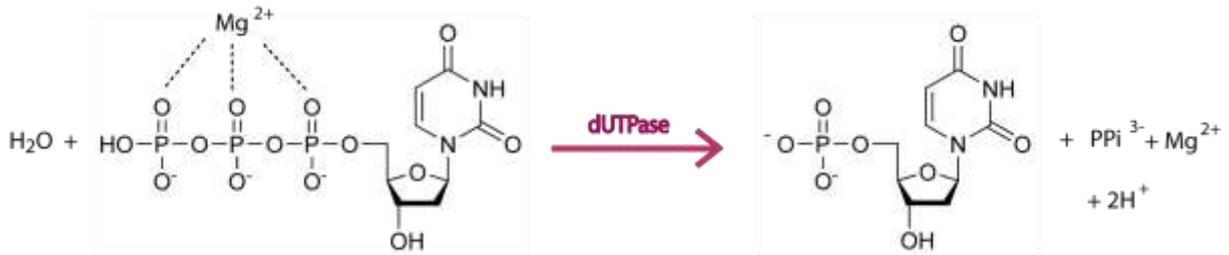


Figure 21 : Hydrolyse du dUTP par la dUTPase. Le dUTP est complexé avec un atome de magnésium en solution, coordonnant les 3 phosphates. Le magnésium joue le rôle de cofacteur de la réaction.

2) Les enzymes trimériques et monomériques partagent le même modèle de mécanisme catalytique

Plusieurs éléments importants permettant d'expliquer le mécanisme catalytique de la dUTPase ont été mis en évidence. Un grand nombre de structures cristallographiques ainsi que des études cinétiques approfondies révèlent de grandes similitudes entre les mécanismes des dUTPases trimériques et monomériques.

i) Spécificité de substrat et catalyse:

Les constantes catalytiques initialement déterminées pour l'enzyme EBV $K_m=0,7 \mu\text{M}$ et $k_{\text{cat}}=2,7-4 \text{ s}^{-1}$ (Tarbouriech *et al.* 2005) sont proches des valeurs obtenues avec l'enzyme monomérique de HSV1 (Bergman *et al.* 1998) ou la trimérique d'*E. coli* (Larsson *et al.* 1996), respectivement de 0,3 et 0,2 μM pour le K_m et 5-15 et 6-9 s^{-1} et pour le k_{cat} . L'étude sur la dUTPase humaine a révélé que l'hydrolyse du substrat était l'étape limitante de la réaction, accompagnée d'une association et dissociation rapide (Toth *et al.* 2007). L'affinité pour le substrat dUTP est la plus importante, mais une inhibition compétitive par le dUDP a pu être observée. Une catalyse très faible du dCTP et du dTTP a également été montrée, environ 10^5 fois moins efficace que pour le dUTP, révélant une grande spécificité de la dUTPase pour son

substrat (Larsson *et al.* 1996). Les groupements phosphate interagissent avec les résidus conservés aspartate du motif I, arginine et sérine du motif II et glutamine du motif IV. Ces interactions sont perdues lorsque le nombre de phosphate diminue, expliquant la plus faible affinité pour le dUDP et le dUMP (Figure 22) (Barabas *et al.* 2004). Le motif V interagit également avec les groupements phosphate, les résidus sérine et thréonine forment des liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygène du phosphate (Varga *et al.* 2007). La spécificité pour l'uracile semble quant à elle être médiée essentiellement par le motif III qui comporte des résidus hydrophobes recouvrant la surface du site actif (Larsson *et al.* 1996; Vertessy 1997).

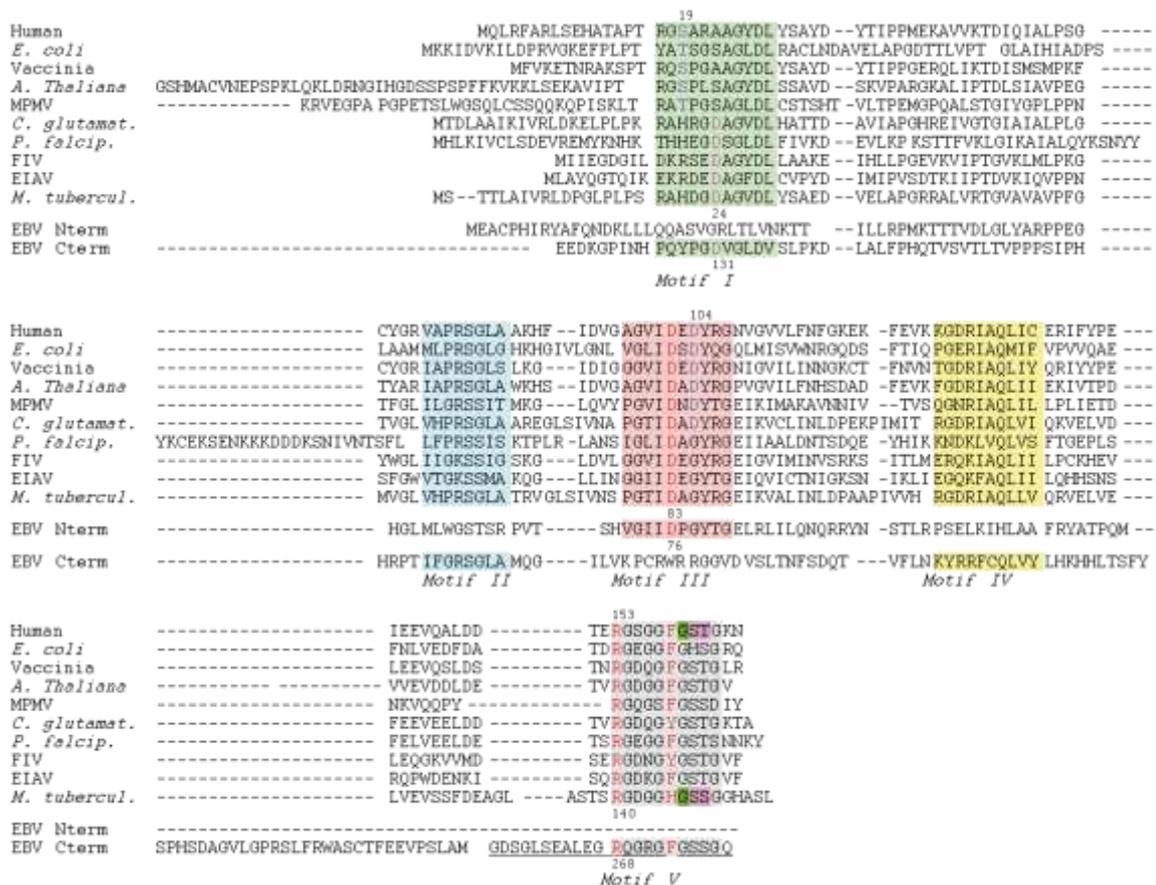


Figure 22 : Alignement de séquences de dUTPases. Les motifs conservés sont indiqués en couleurs. L'ordre des motifs dans la séquence de la dUTPase EBV du N vers le C-terminal est III, I, II, IV, V, les deux moitiés de la protéine sont alignées indépendamment pour correspondre aux trimériques. Le résidu catalytique conservé du motif III (rose) est indiqué en rouge.

ii) Le site actif :

La réaction est médiée par un aspartate conservé (Figures 22 & 24) (Asp76 dans la séquence EBV) dans le site actif, contenu dans le motif III ((Mol *et al.* 1996), (Larsson *et al.* 1996)) (Figure

23). Plusieurs structures mettent en évidence une molécule d'eau à proximité de ce résidu, notamment celles de *M. tuberculosis* (Chan *et al.* 2004) et *E. coli* (Barabas *et al.* 2004). C'est cette molécule d'eau qui est responsable de l'attaque nucléophile sur le substrat. La position de la chaîne de phosphates est importante pour la catalyse, on parle de conformation *trans* (inactive), généralement observée en présence de dUDP pour les enzymes humaine, du EIAV et FIV, et de conformation *gauche* (active) (Figure 23 A). Dans la conformation active, les phosphates peuvent être coordonnés par le magnésium, l' α -phosphate est aligné avec la molécule d'eau catalytique (Figure 23), alors que dans la conformation inactive, l'hydrolyse ne peut avoir lieu car la distance avec la molécule d'eau est trop importante.

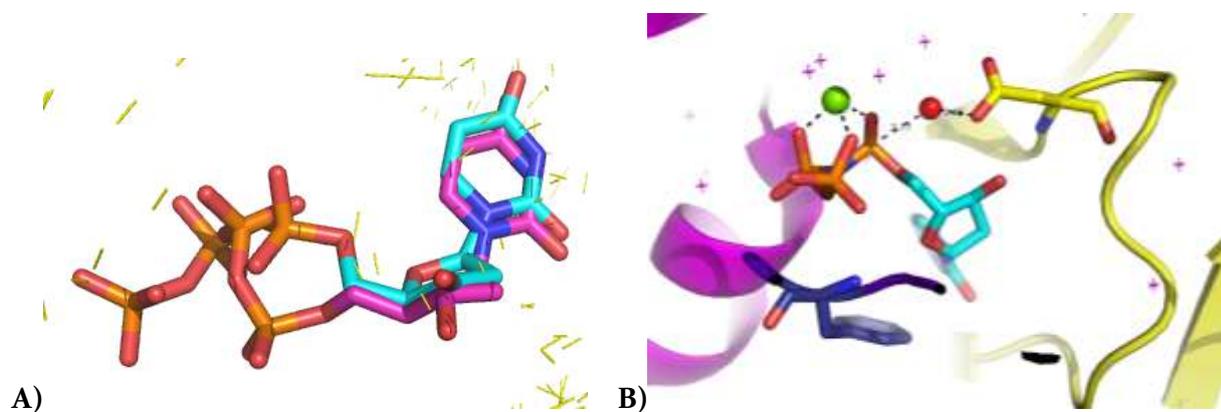


Figure 23 : A) Conformations Trans (dUDP, rose) et Gauche (dUTP, cyan) dans le site actif de la dUTPase trimérique du FIV (Codes pdb 1F7Q et 1F7R, (Prasad *et al.* 2000)). Dans la conformation trans, l' α -phosphate est loin de la position « active », rendant la catalyse inefficace. **B) Site actif de la dUTPase humaine en présence de α,β -imido-dUTP (cyan)** (2HQU (Varga *et al.* 2007)). Les 3 phosphates en conformation active sont coordonnés par l'atome de magnésium (vert). Les 3 sous-unités sont représentées en rose (contenant les motifs I, II et IV), jaune (fournissant le motif III) et bleu (fournissant le motif V). La phénylalanine du motif V se plaque au dessus de l'uracile et l'aspartate du motif III (jaune) est en position pour activer la molécule d'eau catalytique (rouge).

Un deuxième résidu qui semble également être important est un autre résidu aspartate conservé chez certains organismes, Asp₁₃₁ chez EBV. Dans les structures de la dUTPase d'EBV avec dUMP ou l'analogue, ce résidu adopte des conformations différentes. Asp₁₃₁ est « éloigné » du site actif en présence de l'analogue. Cette position est certainement due à un regroupement de charges négatives à cet endroit qui déstabiliserait la boucle à ce niveau

(Tarbouriech *et al.* 2005). Lors d'étude de séquences, ce résidu aspartate est contenu dans le motif I et conservé chez EBV, EIAV ou *M. tuberculosis* par exemple. Il existe également un deuxième groupe d'enzymes (celles de *E. coli* ou *H. sapiens*) qui ne possèdent pas cet aspartate du motif I, mais un aspartate dans le motif III, également proche du site actif. (Figure 24). Chez *M. tuberculosis* ce résidu Asp de l'enzyme interagit avec l'arginine conservée du motif V, permettant ainsi la stabilisation du motif V et son interaction avec le groupement phosphate (Chan *et al.* 2004). Cette interaction est aussi suggérée dans l'étude de l'enzyme du FIV (Prasad *et al.* 2000).

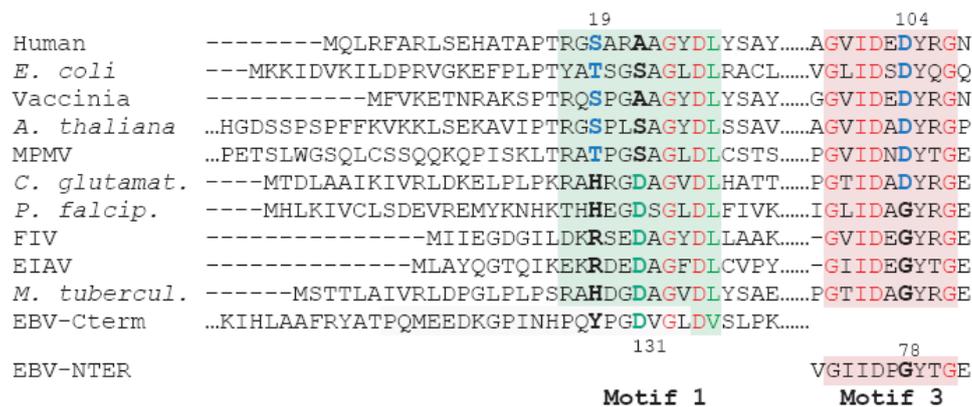


Figure 24: Alignement de séquences des motifs I et III de plusieurs dUTPases. Les deux classes de dUTPase sont visibles, Les 5 premières séquences possèdent un aspartate conservé dans le motif III, Asp104 chez l'humain (indiqués en bleu). Les 5 dernières possèdent l'aspartate conservé dans le motif I, Asp131 chez EBV (en vert). *Corynebacterium glutamicum* est l'exception, contenant les deux aspartates.

iii) Le magnésium

La présence de magnésium est importante dans la catalyse, pour la liaison de l'enzyme au substrat : En absence de cet ion, l'affinité des enzymes trimériques pour le substrat dUTP est fortement diminuée (d'un facteur 100 pour l'enzyme d'*E. coli* et d'un facteur 12 pour *P. falciparum*) révélant une importance de cet ion pour l'affinité. L'effet sur le k_{cat} négligeable pour *E. coli* est marqué pour *P. falciparum* avec une diminution d'un facteur 100 (Larsson *et al.* 1996), (Palmen *et al.* 2008), (Quesada-Soriano *et al.* 2008). L'activité spécifique en présence de différents cations est 5 à 10 fois plus faible qu'en présence de magnésium : en présence de 5mM $MgCl_2$ celle-ci est de $730 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} \cdot M^{-1}$, contre environ 150 et $45 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} \cdot M^{-1}$ avec 5 mM cobalt ou manganèse respectivement (Quesada-Soriano *et al.* 2008). La présence d'EDTA dans le milieu chélatant l'ensemble des cations divalents a un effet drastique, résultant en une activité spécifique d'environ $1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} \cdot M^{-1}$ (Quesada-Soriano *et al.* 2008). D'après des expériences

réalisées avec la dUTPase de *P. falciparum*, le magnésium n'a pas d'effet sur la stabilité de l'enzyme (Quesada-Soriano *et al.* 2007). Ceci a également été montré pour la dUTPase d'*E. coli* (Takacs *et al.* 2004). Au niveau structural, le magnésium semble inciter la conformation gauche du substrat en coordonnant les groupements phosphate (Figure 23) (Kovari *et al.* 2008). Le magnésium permettrait donc davantage de stabiliser les phosphates et ainsi coordonner leur position dans la conformation active dans le site actif de l'enzyme, rendant possible la catalyse.

iv) Le motif V

Le motif V composé des 20-25 derniers résidus C-terminaux contient un motif conservé RGXXGFG (Figure 25) et joue un rôle important dans la catalyse. Le motif V flexible permet au motif conservé de se rabattre par-dessus le site actif.

Human	-----	IIEVQALDDTE	RGSGGF	STGKN
<i>E. coli</i>	-----	FNLVEDFDATD	RGEGGF	GHSGRQ
Vaccinia	-----	LEEVSQSLDSTN	RGDQGF	FGSTGLR
<i>A. thaliana</i>	-----	VVEVDDLDETV	RGDGGF	FGSTGV
MPMV	-----	-----	NKVQQPY	RGQGS
<i>C. glutamat.</i>	-----	FEEVEELDDTV	RGDQGY	FGSTGKTA
<i>P. falcip.</i>	-----	FELVEELDETS	RGEGGF	FGSTSNNKY
FIV	-----	LEQGKVVMDSE	RGDNGY	FGSTGVF
EIAV	-----	RQPWDENKISQ	RGDKGF	FGSTGVF
<i>M. tubercul.</i>	-----	LVEVSSFDEAGLASTS	RGDGGH	SSGGHASL
EBV-Cterm	SPHSDAGVLGPRSLFRWASCTFEEVPSLAMGDSGLSEALE	GRQGRG	FGSSGQ	

Figure 25 : Alignement de séquences de motifs V de dUTPases. Le motif RGXXG(F/Y)G est largement conservé au sein des dUTPases mono- et trimériques.

La protéolyse de ce motif dans la dUTPase d'*E. coli* résulte en une diminution importante de l'activité catalytique, passant de 0,14 à 5,18 s⁻¹, alors que le Km n'est pas modifié de manière significative (Vertessy 1997). Il était supposé que ce motif venait se rabattre sur le site actif, et que la phénylalanine conservée jouait un rôle important (Mol *et al.* 1996). L'équipe de Vertessy a montré que cette phénylalanine du motif V (remplacée dans leurs expériences par un tryptophane) venait se placer au dessus du substrat dans le site actif lors de la catalyse et semblait être déplacé pour permettre la libération du produit (Toth *et al.* 2007). De récentes structures montrent le motif C-terminal de la dUTPase humaine en présence de l'analogue de substrat dans une conformation active. Ces structures révèlent que la phénylalanine conservée se rabat par-dessus l'anneau uracile et présente une liaison hydrogène avec l'anneau ribose, conférant la spécificité pour le dUTP (Varga *et al.* 2007). Ceci a également été montré pour les dUTPases de FIV et MPMV (Prasad *et al.* 1996), (Nemeth-Pongracz *et al.* 2007). De nombreuses

interactions sont visibles entre les résidus du motif V et les phosphates (sérine, thréonine). Le résidu arginine conservé permet de neutraliser la charge du γ -phosphate, et établit également une interaction avec une sérine du motif II, facilitant le rapprochement du motif V vers le site actif (Varga *et al.* 2007). Chez *Mycobacterium tuberculosis* la phénylalanine est remplacée par une histidine jouant le même rôle et le motif V interagit avec le γ -phosphate *via* les sérine et thréonine conservées, ainsi qu'avec un aspartate proche du site actif *via* l'arginine conservée (Varga *et al.* 2008).

v) Une particularité de l'enzyme EBV : Le pont disulfure

L'étude structurale de la dUTPase d'EBV (Tarbouriech *et al.* 2005) a révélé la présence d'un pont disulfure entre les résidus Cys₄ et Cys₂₄₆, reliant ainsi les extrémités N et C-terminales de la protéine. Ce pont disulfure pourrait être un artéfact causé par les conditions oxydatives de la purification ou permettre de rapprocher le motif V du cœur de la protéine et du site actif pour inciter ce domaine flexible à adopter sa position au dessus du substrat.

Objectifs du travail de thèse :

Les travaux de thèse visaient à étudier de manière approfondie le mécanisme enzymatique de la dUTPase d'EBV, par des études cristallographiques et fonctionnelles de mutants de la protéine. Dans ce but, nous avons étudié des éléments basés sur les observations tirées des structures de l'enzyme native et des comparaisons avec les autres dUTPases. Ces études ont été effectuées sur des mutants de la dUTPase d'EBV permettant d'adresser les différents aspects du fonctionnement de cette enzyme. Nous avons étudié le pont disulfure reliant les cystéines 4 et 246, afin de conclure quant à son rôle éventuel dans l'activité catalytique ou la structure de l'enzyme. Le motif V avait été décrit comme étant un facteur important dans la fonction de l'enzyme, son rôle a été confirmé grâce à deux mutants ponctuels touchant les résidus arginine et phénylalanine conservés, ainsi qu'un mutant dépourvu des 22 résidus C-terminaux. Le résidu aspartate 131 présent dans le motif I a également été muté pour évaluer son impact sur l'activité catalytique. Un double mutant rendant l'enzyme plus ressemblante aux enzymes du deuxième groupe auquel appartient la dUTPase d'*E. coli* fut également étudié pour chercher à comprendre si la présence d'un résidu aspartate dans le motif III pouvait remplacer son absence dans le motif I. Des mesures en absence et présence de magnésium ont permis d'étudier l'impact de cet ion sur la catalyse.

Matériels et méthodes

Le but de cette section n'est pas répertorier les toutes les conditions utilisées, mais davantage de détailler et illustrer les principes des différentes techniques mises en œuvre pour les études fonctionnelles de la dUTPase, pour les études enzymatiques ainsi que les mesures d'affinités par la technique de la résonance plasmonique de surface. Les conditions expérimentales des autres études sont citées dans l'article joint ci-après.

I. Etude enzymatique

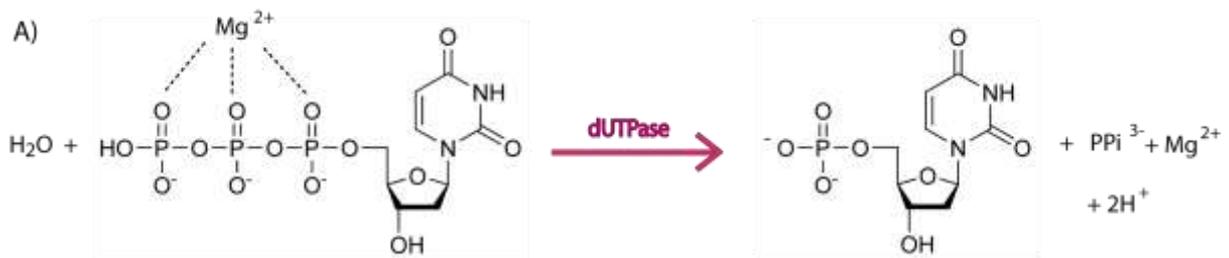


Figure 26 : Hydrolyse du dUTP par la dUTPase

L'étude enzymatique a été menée par deux approches différentes :

1) L'étude enzymatique par suivi de pH avec indicateur coloré

L'hydrolyse du dUTP engendre un relargage de protons (Figure 26) ce qui induit l'acidification du milieu réactionnel. Cette caractéristique a été utilisée afin de suivre la cinétique de la dUTPase. Le suivi de la variation de pH engendrée par la libération de protons lors de l'hydrolyse du dUTP a été effectué avec un indicateur coloré, le rouge crésol. Cet indicateur coloré est rose à pH basique avec une absorbance maximale située autour de 580 nm et à pH acide l'indicateur devient jaune avec un pic d'absorbance à 420 nm (Figure 27). Une gamme étalon de l'absorbance du rouge crésol à 573 nm en fonction du pH a été réalisée, la gamme de pH où la sensibilité de l'indicateur coloré est la plus importante se situe entre pH 7,5 et 9,5.

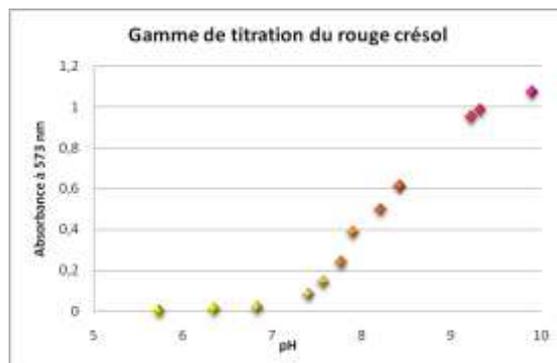


Figure 27 : Evolution de l'absorbance d'une solution de rouge crésol (25 μ M) à 573 nm en fonction du pH. Les points colorés donnent une indication de la couleur de la solution pour chaque pH. Pour un pH inférieur à 7 l'absorbance est quasi nulle à cette longueur d'onde, et au-delà de pH 9,5 un plateau est atteint. La gamme de sensibilité à 573 nm se situe entre pH 7,5 et 9,5.

La mesure est effectuée par lecture de l'absorbance à 573 nm et a donc été réalisée à un pH initial de 7,8 avec 25 μ M dUTP, 25 μ M rouge crésol dans un milieu faiblement tamponné avec 0,5 mM bicine NaOH. Ces conditions permettent d'effectuer l'intégralité de la mesure dans la gamme de sensibilité et de ne pas arriver à la limite de l'indicateur coloré. La réaction est initiée par l'ajout de 31 nM d'enzyme à 1 mL de milieu réactionnel dans une cuve en quartz (Hellma) d'1 cm de trajet optique et la mesure est réalisée pendant 20 min à 25°C dans un spectrophotomètre Cary Varian.

La diminution de l'absorbance à 573 nm est suivie au cours du temps (Figure 28 A). Parce que l'hydrolyse du dUTP est quasi-irréversible dans les conditions utilisées, la concentration de produit à chaque instant $[P]_t$ est déterminée ainsi : $[P]_t = [S]_o (Abs_o - Abs_t) / (Abs_o - Abs_\infty)$ avec $[S]_o$: la concentration initiale en substrat, Abs_o l'absorbance initiale, Abs_t celle au temps t et Abs_∞ l'absorbance finale (Larsson *et al.* 1996).

Les constantes enzymatiques (k_{cat} et K_m) sont déterminées graphiquement par linéarisation selon le calcul suivant : $[P]_t/t = V - (K_m/t * \ln([S]_o / ([S]_o - [P]_t)))$, où $[P]_t$ est la concentration de produit au temps t, t : le temps, V : la vitesse, et $[S]_o$: la concentration initiale en substrat (Figure 28 B, (Larsson *et al.* 1996)). En traçant la courbe représentant $[P]_t/t$ en fonction de $\ln([S]_o / ([S]_o - [P]_t))$ on peut en déduire le K_m qui est donné par la pente et la vitesse maximale qui est l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire des points correspondant à la partie juste avant la transition vers le plateau de la courbe de cinétique (en

rouge sur les graphes). Le k_{cat} est calculé à partir de la vitesse maximale avec l'équation $k_{cat} = V_m/[enz]$.

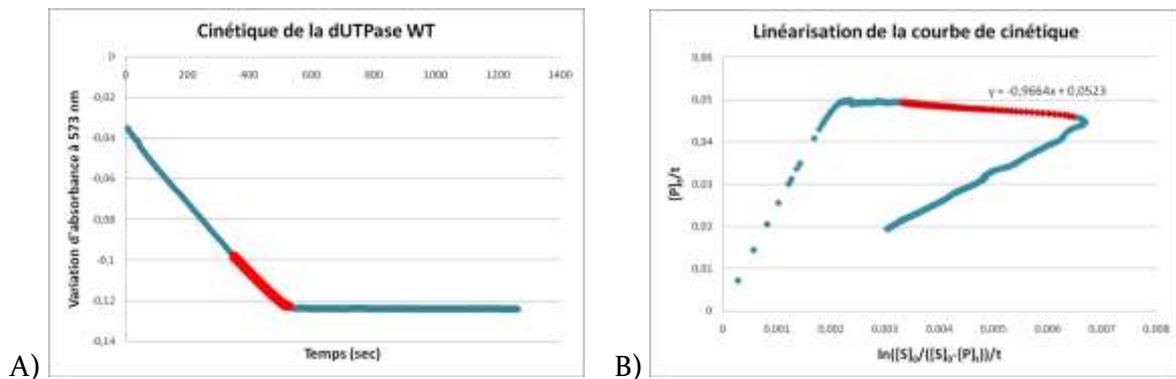


Figure 28 : Etude enzymatique avec l'indicateur coloré rouge crésol. A) Graphe représentant l'absorbance à 573 nm en fonction du temps. L'absorbance diminue au cours du temps dû au changement de couleur de l'indicateur engendré par l'acidification du milieu. La partie rouge correspond aux points utilisés pour la linéarisation. **B)** Linéarisation de la cinétique. L'équation de la régression linéaire des points rouges est indiquée sur le graphe et permet de déterminer les constantes enzymatiques, ici pour exemple la courbe donne un K_m de 0,96 μM et un V_{max} de 0,05 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$.

L'essai avec le rouge crésol ne permet pas le calcul des constantes enzymatiques dans des conditions de cinétique lente car le pH n'est pas assez stable au cours du temps, produisant une déviation de la ligne de base au cours de l'expérience.

2) L'étude enzymatique par quantification du PPI

Pour les mutants de la dUTPase dont l'activité est plus faible, une autre approche a donc été mise en œuvre. Le kit EnzChek Pyrophosphate Assay (Molecular Probes) a été utilisé pour quantifier le pyrophosphate inorganique libéré lors de l'hydrolyse du dUTP. La quantification se fait de manière indirecte, basé sur la méthode décrite par Webb (Webb 1992), utilisant plusieurs réactions successives (Figure 29). La pyrophosphatase inorganique catalyse la conversion du PPI généré par la dUTPase en deux molécules de Pi (Figure 29, A & B). En présence du Pi ainsi produit, le substrat MESG (2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine riboside) est converti en ribose-1-phosphate et 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine par l'enzyme purine nucléoside phosphorylase (PNP) (Figure 29 C), induisant un changement du pic d'absorption maximal de 330 à 360 nm. La réaction est donc suivie par mesure de l'absorbance à 355 nm,

cette longueur d'onde étant la plus proche de 360 nm qu'il était possible d'obtenir avec les filtres disponibles.

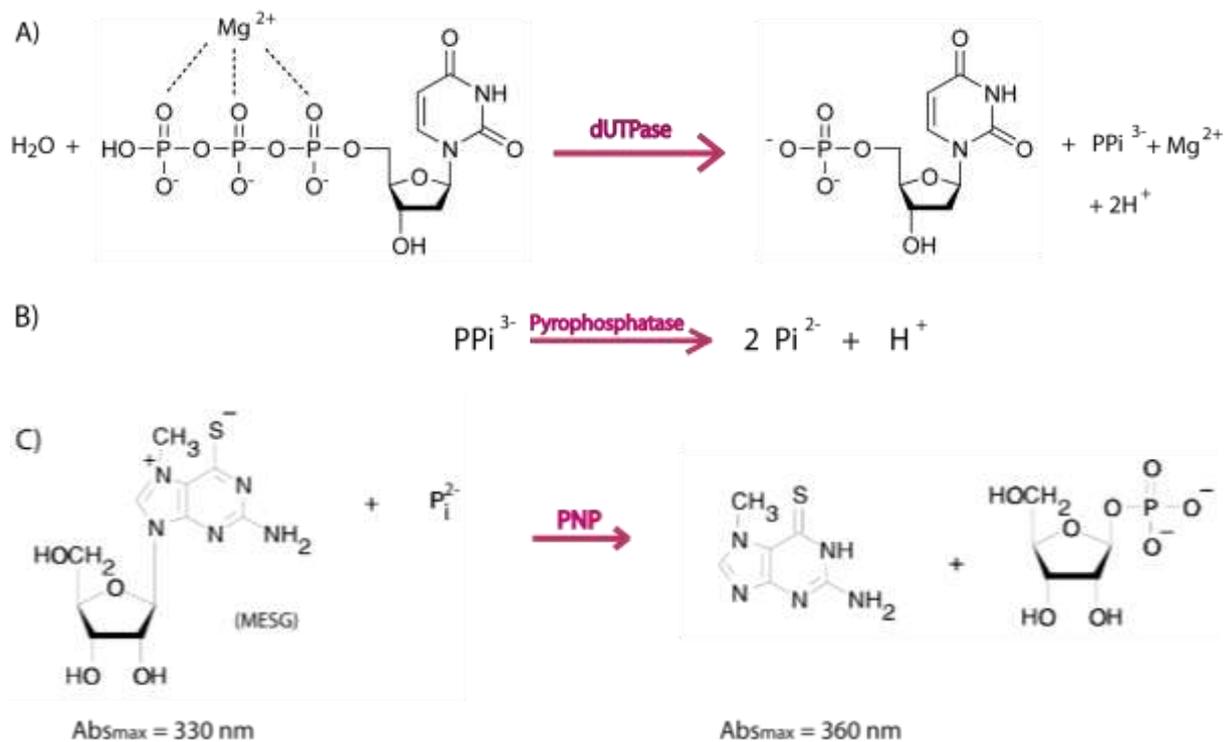


Figure 29 : Schéma illustrant les 3 réactions enzymatiques successives permettant la mesure de l'activité de la dUTPase. A) L'hydrolyse du dUTP en dUMP par la dUTPase, **B)** Hydrolyse du PPi produit précédemment en deux molécules de Pi par la phosphorylase présente dans le kit, **C)** Conversion du MESG et Pi par la PNP (purine nucléoside phosphorylase) en un produit dont l'apparition sera suivie par mesure d'absorbance à 355 nm.

Les conditions expérimentales ont été définies afin que la cinétique de la réaction secondaire ne soit pas limitante par rapport à l'hydrolyse du dUTP. Les quantités de dUTPase et dUTP mises en œuvre pour l'essai étaient déterminées de sorte que l'hydrolyse du dUTP soit 10 fois moins rapide que la conversion du MESG par le PNP dans les conditions préconisées par le Kit. L'essai est réalisé dans des volumes de 250 μ L en plaques 96 puits (Greiner), l'évolution de l'absorbance au cours du temps est mesurée grâce à un lecteur de plaque iEMS Reader MF de Thermo Labsystems (Figure 30 A). Pour chaque mutant, les mesures ont été effectuées avec plusieurs concentrations de dUTP, permettant de calculer la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en dUTP. Cet essai a été utilisé pour déterminer l'activité des

mutants dUTPase D131S, D131E, D131N, R268A, F273A et le double mutant G78D/D131S. Les constantes enzymatiques de ces mutants ont été déterminées graphiquement par la linéarisation de Lineweaver-Burke où l'on trace la droite représentant l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration en substrat A : ($1/v = f(1/[A])$). L'ordonnée à l'origine est la valeur de $1/V_{\max}$, et le point d'intersection de la droite avec celle des abscisses correspond à $-1/K_m$ (Figure 30 B). Pour la protéine sauvage (WT), les constantes catalytiques ne pouvaient être déterminées car le K_m de la dUTPase WT était largement inférieur aux concentrations de substrat utilisées, les pentes des courbes étaient identiques pour différentes concentrations de substrat.

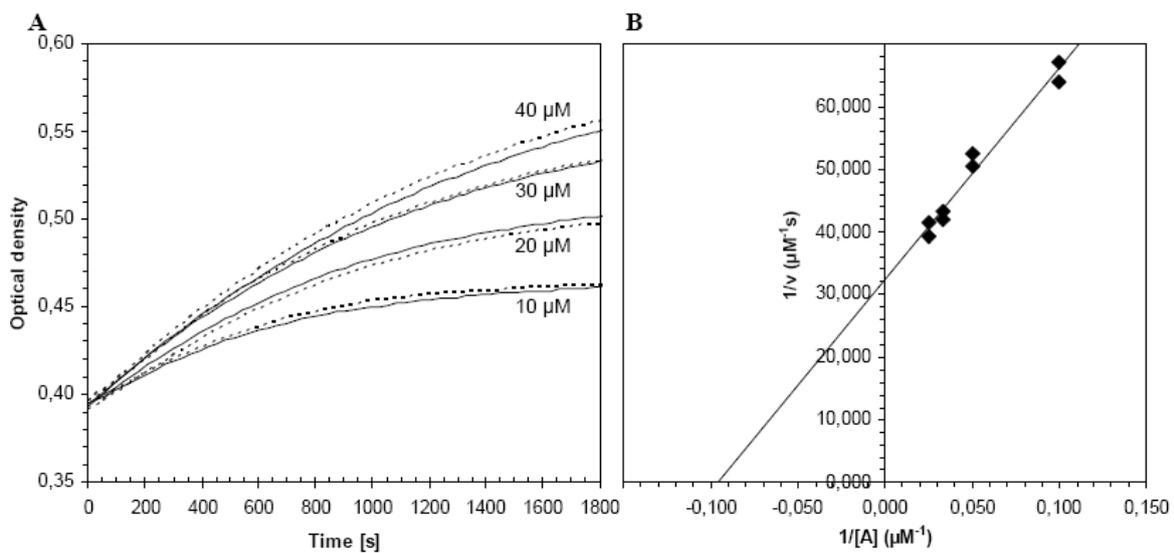


Figure 30 : Etude enzymatique avec le kit EnzChek. A) Graphe représentant l'absorbance à 355 nm en fonction du temps, avec différentes concentrations de substrat. B) Linéarisation de la cinétique selon la méthode de Lineweaver-Burke.

II. La résonance plasmonique de surface (SPR)

1) Le principe général

Il s'agit d'une technologie permettant d'étudier en temps réel l'interaction entre une molécule sans modifications ou marquage, avec une molécule immobilisée. Cette technique utilise le phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR) qui survient lorsqu'une lumière polarisée traverse un prisme et est projetée sur une couche conductrice (de l'or) à l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents (Figure 31). Le prisme constitue le

dispositif de couplage de l'onde incidente avec l'onde de surface (plasmon de surface). D'un côté de cette couche d'or se trouve le tampon, de l'autre une lame de verre ou un prisme. Une onde évanescente est ainsi générée lorsque la lumière touche le verre et que les électrons libres de la surface entrent en résonance avec les photons du rayon incident. La lumière réfléchie subit alors une baisse d'intensité à un angle donné appelé angle de résonance, qui est enregistré par l'appareil de mesure. Le signal est mesuré en Unités de résonance, RU, avec 1000 RU équivalant à une déviation de $0,1^\circ$ de l'angle de résonance. L'angle est sensible aux changements d'indice de réfraction de l'autre côté de la couche d'or, dus par exemple à la liaison d'analytes au ligand.

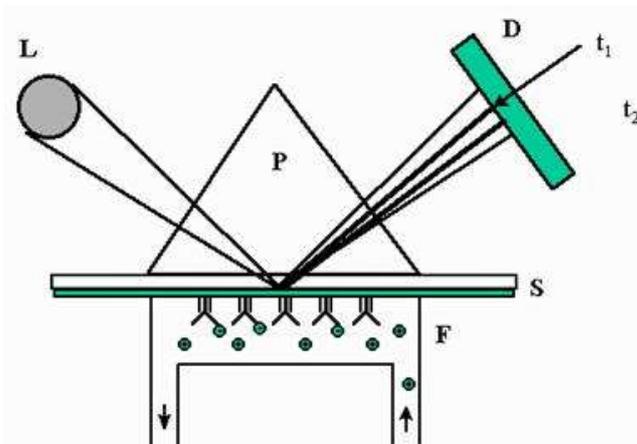


Figure 31 : Principe de la résonance plasmonique de surface. L : source de lumière polarisée, P : le prisme, D : détecteur –matrice de photodiodes-, S : la surface d'or et la couche de dextran, F : la cellule avec les analytes dans un flux de tampon. t_1 et t_2 représentent la différence d'angle de résonance de la lumière réfléchie sur le détecteur à deux temps différents, avant et après liaison de l'analyte au ligand. (Schéma de “The Astbury Centre for Structural Molecular Biology, University of Leeds”, adapté de Nature reviews 2002)

Généralement, pour l'étude d'interactions protéiques, une couche de Dextran recouvrant l'or permet la fixation de l'une des molécules d'intérêt (le ligand). D'autres types de matrice (dextrans modifiés) permettant la fixation des protéines peuvent également être utilisés, comme par exemple celles fixant les étiquettes Histidine des protéines recombinantes. L'analyse est effectuée avec un flux continu de tampon à la surface du senseur. L'échantillon contenant l'analyte est injecté à la surface, et les interactions produisent une variation de signal. Lorsque les interactions atteignent l'équilibre, le signal reste constant et diminue de

nouveau lorsque du tampon sans ligand est injecté et que les complexes se dissocient. Pour ces études, il est essentiel que le tampon contenant l'analyte soit identique au tampon seul, car l'angle de résonance varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu, et de faibles changements de tampon peuvent induire des variations de signal sans qu'il n'y ait d'interaction.

Dans le cadre de notre étude, l'essai fut effectué sur la dUTPase WT et le mutant G257 immobilisés sur le support en présence du substrat dUTP ou de l'analogue α,β -imido dUTP avec ou sans magnésium. Ceci était une application poussée de la technique le dUTP ayant une masse de 460 Da était à la limite de détection du Biacore T100. Nous avons utilisé une puce CM5 (GE Healthcare) recouverte d'une couche de dextran carboxyméthylé attaché de manière covalente à la surface d'or. Les ligands (ici la dUTPase) sont couplés au dextran via des groupements amine, thiol ou aldéhyde. Les groupements carboxyméthyles du dextran sont activés par un mélange EDC-NHS (1-ethyl-3-(diméthylaminopropyl)-carbodiimide et N-hydroxysuccinimide) pour former des esters succinimide pouvant lier les groupements cités précédemment (Figure 32). Après passage du ligand sur le support actif pour permettre sa fixation, les sites non-occupés sont inactivés par un mélange éthanolamine HCl.

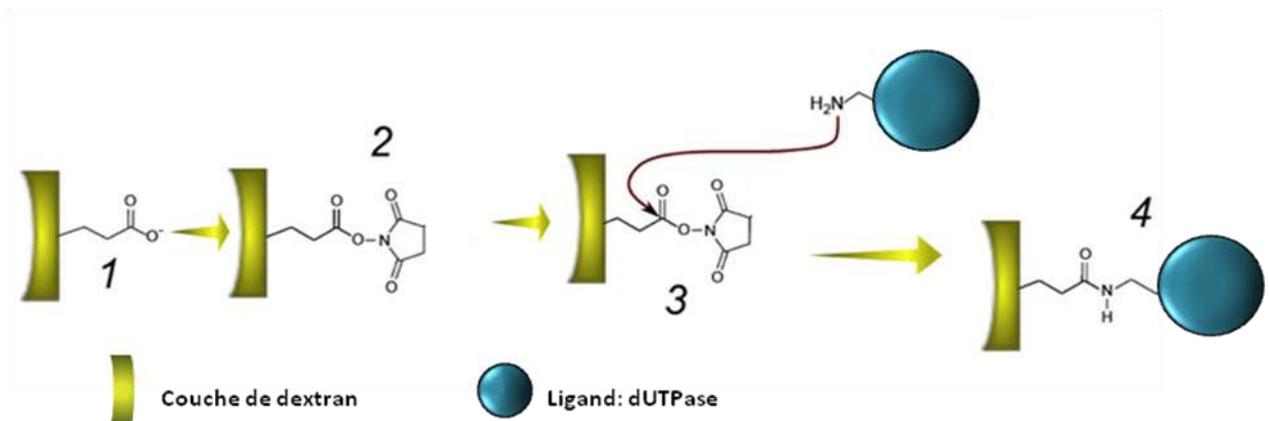
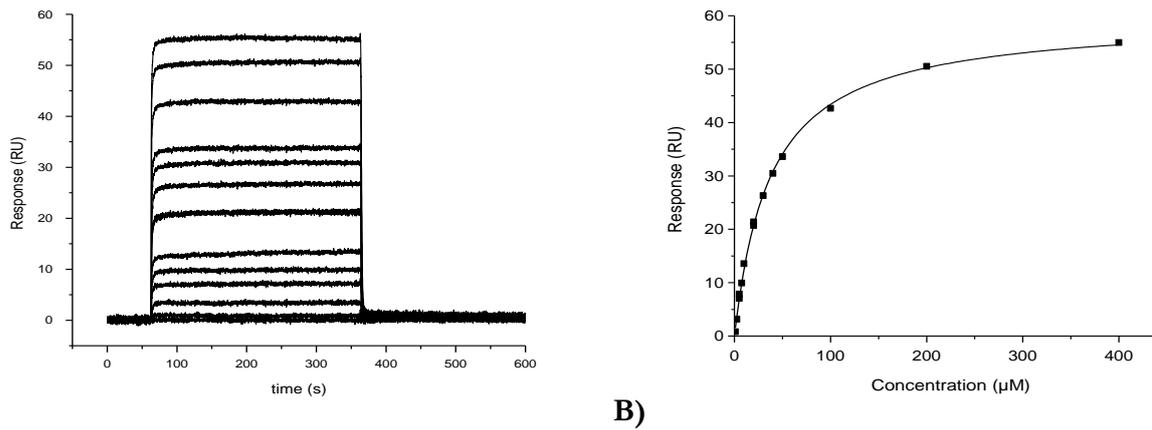


Figure 32 : Principe de l'activation des dextrans carboxyméthylés par le mélange EDC/NHS. Les groupements carboxyle (1) sont activés par l'EDC/NHS créant une surface avec des ester fonctionnels (2) qui pourront réagir avec les amines de la protéine à immobiliser (3) formant une liaison covalente entre la protéine et la surface (4). Adapté de Martin Latterich 2008 Protein science.

Les résultats sont obtenus sous forme de sensorgram représentant la variation du signal pour les différentes concentrations d'analytes utilisées (Figure 33). Ces courbes permettent de déterminer si oui ou non deux molécules interagissent, l'affinité et les vitesses d'association ou

de dissociation. L'analyse des courbes représentant l'intensité du signal à l'équilibre en fonction de la concentration par le logiciel BIAcore T100 evaluation software permet de déterminer la constante de dissociation K_D . Dans le cas des mesures obtenues ici pour la dUTPase WT et le mutant G257, les vitesses d'association et de dissociation k_{on} et k_{off} ne peuvent être déterminées, car trop rapides, ce qui n'est pas surprenant dans le cadre d'études sur de petites molécules comme le dUTP.



A) Exemple de **sensorgram** avec **différentes concentrations d'analyte** (Données brutes). Chaque courbe correspond au signal enregistré en présence d'une concentration d'analyte. **B)** Exemple de **courbe après traitement permettant de calculer les constantes d'affinité** (chaque point est donné par une courbe du sensorgram).

Article :

« The flexible motif V of Epstein-Barr virus deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase is essential for catalysis. »

Résumé:

Bien que la dUTPase d'EBV soit monomérique, elle possède un fort degré de similarité avec les dUTPases trimériques beaucoup plus fréquentes. Dans les deux cas, le site actif est composé de V motifs conservés. L'étude structurale et fonctionnelle de mutants de la dUTPase d'EBV, basés sur la structure de la protéine native ont fourni des informations sur le mécanisme fonctionnel de l'enzyme. Un premier mutant nous a permis de conclure que le pont disulfure observé entre les résidus Cys4 et 246 ne jouait aucun rôle dans l'activité enzymatique. Les alignements de séquence ont révélé deux groupes de dUTPase, basé sur la position dans la séquence d'un résidu acide aspartique conservé, proche du site actif. Des simples mutants de ce résidu dans la dUTPase d'EBV avaient une activité catalytique fortement réduite qui pouvait être partiellement restaurée avec une seconde mutation rendant l'enzyme virale plus ressemblante aux enzymes du second groupe. La délétion du motif C-terminal flexible inhibe complètement l'activité enzymatique, ce mutant cristallise en présence de dUTP-Mg²⁺ non hydrolysé dans le site actif. L'étude plus approfondie du motif V par des mutations ponctuelles a mis en évidence le rôle essentiel du résidu phénylalanine 273 se plaquant au dessus du site actif. Le magnésium semble jouer un rôle au niveau de la liaison avec le substrat, le K_m en l'absence de Mg²⁺ étant réduit sans qu'il n'y ait d'effet sur le k_{cat}.

The Flexible Motif V of Epstein-Barr Virus Deoxyuridine 5'-Triphosphate Pyrophosphatase Is Essential for Catalysis[§]

Received for publication, May 11, 2009, and in revised form, June 9, 2009. Published, JBC Papers in Press, July 7, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.019315

Lucy Freeman^{†1}, Marlyse Buisson^{‡§}, Nicolas Tarbouriech[‡], Angéline Van der Heyden[¶], Pierre Labbé[¶], and Wim P. Burmeister^{†||2}

From the [†]Unit of Virus Host Cell Interactions UMI3265 UJF-EMBL-CNRS and the [¶]Département de Chimie Moléculaire, UMR UJF-CNRS 5250, University of Grenoble, F-38042 Grenoble Cedex 9, France, the [§]Laboratoire de Virologie, Hôpital Michallon, F-38043 Grenoble, France, and the ^{||}Institut Universitaire de France, F-75005 Paris, France

Deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatases (dUTPases) are ubiquitous enzymes essential for hydrolysis of dUTP, thus preventing its incorporation into DNA. Although Epstein-Barr virus (EBV) dUTPase is monomeric, it has a high degree of similarity with the more frequent trimeric form of the enzyme. In both cases, the active site is composed of five conserved sequence motifs. Structural and functional studies of mutants based on the structure of EBV dUTPase gave new insight into the mechanism of the enzyme. A first mutant allowed us to exclude a role in enzymatic activity for the disulfide bridge involving the beginning of the disordered C terminus. Sequence alignments revealed two groups of dUTPases, based on the position in sequence of a conserved aspartic acid residue close to the active site. Single mutants of this residue in EBV dUTPase showed a highly impaired catalytic activity, which could be partially restored by a second mutation, making EBV dUTPase more similar to the second group of enzymes. Deletion of the flexible C-terminal tail carrying motif V resulted in a protein completely devoid of enzymatic activity, crystallizing with unhydrolyzed Mg²⁺-dUTP complex in the active site. Point mutations inside motif V highlighted the essential role of lid residue Phe²⁷³. Magnesium appears to play a role mainly in substrate binding, since in absence of Mg²⁺, the *K_m* of the enzyme is reduced, whereas the *k_{cat}* is less affected.

Epstein-Barr virus, a human γ -herpesvirus, is the causative agent of infectious mononucleosis and establishes a life-long persistent infection in over 90% of the world's population. EBV³ is implicated in a number of cancers, such as Burkitt's lymphoma, undifferentiated nasopharyngeal carcinoma, or Hodgkin disease. The large DNA genome of this virus codes for about 86 proteins implicated in a large num-

ber of functions related to viral latency or the lytic cycle, during which the virus replicates.

One protein of the lytic cycle is deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase, a ubiquitous enzyme catalyzing the cleavage of dUTP into dUMP and pyrophosphate (PP_i). This enzyme not only provides the precursor for the formation of dTMP by thymidylate synthase, but it also has a crucial role in maintaining a low dUTP/dTTP ratio in the cell in order to limit the incorporation of deoxyuridylate into DNA by DNA polymerases. Based on their oligomerization state, dUTPases can be divided into three families.

The first family of dUTPases contains homodimeric enzymes with the prototype structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase (1).

dUTPases of the second and largest family form homotrimers. Their structure is unrelated to dimeric dUTPases. Trimeric dUTPases are found in most eukaryotes, in prokaryotes, in some DNA viruses, such as poxvirus, and in a number of retroviruses. Several x-ray structures of dUTPases of this family are available: *Escherichia coli* (2), *Homo sapiens* (3), equine infectious anemia virus (4), feline immunodeficiency virus (5), Mason-Pfizer monkey virus (6), *Mycobacterium tuberculosis* (7), *Plasmodium falciparum* (8), *Arabidopsis thaliana* (9), and vaccinia virus (10). The active site is formed by five conserved motifs that are distributed over the entire sequence (11) (Fig. 1A). Each subunit of the trimer contributes to the formation of each of the three active sites (2). Whereas the first four motifs are well ordered, motif V is most often disordered and is only observed in some structures after inhibitor binding such as in the feline immunodeficiency virus dUTPase structure (Protein Data Bank entry 1f7r) (12) and the human dUTPase structure (Protein Data Bank entry 1q5h) (3), both in complex with dUDP. Recently, several structures showing motif V and α,β -imido-dUTP in a conformation close to the situation during catalysis became available: one of the human enzyme (Protein Data Bank entry 3ehw) (13) and one from *M. tuberculosis* (Protein Data Bank entry 2py4) (14). Together with kinetic information about the human enzyme (15), a model of enzymatic action became available: (i) rapid, probably diffusion-limited binding of the substrate; (ii) a substrate-induced structural change required for the formation of the catalytically competent conformation; (iii) the rate-limiting hydrolysis step; and (iv) a rapid release of the reaction products PP_i and dUMP. Hydrolysis occurs through a nucleophilic in-line attack on the α -phosphate by a water molecule activated by an aspartic acid residue (16).

The atomic coordinates and structure factors (codes 2we0, 2we1, 2we2, and 2we3) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. 1.

¹ Supported by the Région Rhone-Alpes via the "Cluster 10 Infectiologie."

² To whom correspondence should be addressed: UVHCI UMI3265 UJF-EMBL-CNRS, BP 181, F-38042 Grenoble Cedex 9, France. Fax: 33-476-20-94-00; E-mail: wpb@embl.fr.

³ The abbreviations used are: EBV, Epstein-Barr virus; SPR, surface plasmon resonance; WT, wild type; Bicine, *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine; DTT, dithiothreitol.

The third family contains monomeric dUTPases encoded by avian and mammalian herpesviruses, which include important human pathogens, such as Epstein-Barr virus and herpes simplex virus. They have limited sequence homology to the trimeric enzymes; the five motifs forming the active site are present but reshuffled and spread out over a single polypeptide that is twice as long as the sequence of the subunit in trimeric enzymes. Working on the enzyme from EBV, we reported the first crystal structures of a monomeric dUTPase determined in complex with the product dUMP or the non-hydrolyzable substrate analogue α,β -imido-dUTP (17) (Fig. 1B). Like most dUTPase structures, those of the EBV enzyme showed four of the five conserved sequence motifs (Fig. 1A), with motif V invisible due to its flexibility, and revealed an active site that is extremely similar to those of trimeric dUTPases. EBV dUTPase furthermore exhibited similar kinetic parameters (17, 18). This therefore implies that the conclusions of studies of the enzymatic mechanism for trimeric dUTPases are also valid for the EBV enzyme and *vice versa*.

In the previously published EBV dUTPase structures (17), the N and C termini of the ordered structure were linked by a disulfide bridge between Cys⁴ and Cys²⁴⁶. We therefore wished to check the influence of this bridge on activity and its possible regulatory role by studying mutant C4S.

EBV dUTPase structures (17) revealed that residues 114–133 linking the two domains of monomeric dUTPase and containing part of motif I show different structures in the α,β -imido-dUTP-bound form (Fig. 1B) and in the dUMP-bound form (Fig. 1C). This leads indirectly to a non-productive conformation of catalytic residue Asp⁷⁶ of motif III (Fig. 1B). Motif I is always well ordered in trimeric dUTPases. We hypothesized first that the clustering of negative charges of two aspartic acid residues (catalytic residues Asp⁷⁶ and Asp¹³¹ of the linker region) and the γ -phosphate of the inhibitor leads to destabilization of this part of the structure. When dUTPase structures showing motif V in a productive conformation became available (13, 14), they showed an interaction of the residue corresponding to Asp¹³¹ with the conserved arginine residue of motif V. On the other hand, Asp¹³¹ is only partially conserved in sequence alignments. These revealed two classes of dUTPases, the first containing EBV dUTPase with a conserved aspartic acid residue in a position corresponding to Asp¹³¹ and the second group containing human and *E. coli* enzymes with a conserved aspartic acid residue at the position corresponding to residue 78 in EBV (Fig. 1A). We decided to study three single mutants of Asp¹³¹ (D131S, D131N, and D131E) along with a double mutant (D131S/G78D), making the EBV enzyme more similar to the second group.

Finally, we report the structure of a dUTPase mutant with motif V deleted (ΔV), constructed in order to facilitate binding studies and crystallographic studies in view of potential antiviral drug design. This mutant showed the presence of intact Mg²⁺-dUTP in its active site, posing the question of why this mutant is completely inactive although most of the catalytic machinery is in place. In order to understand the precise mechanism of action of motif V, we decided to study two conserved residues of motif V, Arg²⁶⁸ and Phe²⁷³, since it has been shown

that they interact with the bound substrate analogue α,β -imido-dUTP (13, 14).

Since binding of an Mg²⁺-substrate complex appeared possible without catalysis, we wanted to further characterize the role of Mg²⁺. Previous studies carried out on *E. coli* dUTPase (16, 19, 20) indicated an important role of Mg²⁺ for catalytic activity, by promoting enzyme-substrate complex stabilization (21). Various dUTPase structures in the presence of α,β -imido-dUTP show the metal ion coordinating all three phosphate groups.

MATERIALS AND METHODS

Site-directed Mutagenesis—Mutagenesis was carried out according to the manufacturer's instructions, using the QuikChange II kit (Stratagene) on EBV wild type (WT) dUTPase coding sequence cloned into pPROEx Htb plasmid (17). Proteins were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) strain and purified on Ni²⁺-nitrilotriacetic acid resin, as described previously (17). ΔV mutant is a 257-residue construct with the last 22 C-terminal residues removed.

Crystallography—Screening for crystallization conditions was carried out with a PixSys4200 Cartesian robot (high-throughput crystallization laboratory at EMBL Grenoble) in 100 + 100-nl drops. Hits were reproduced manually in 1 + 1- μ l drops. Protein solutions (about 1.5 mg ml⁻¹) used for crystallization trials contained 10 mM dUTP in 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM imidazole, and 20 mM Hepes, pH 7.5. Mutants D131S/G78D and D131N were crystallized using as precipitant 0.3 M ammonium sulfate, 25% polyethylene glycol 3350, 0.1 M Hepes, pH 7; C4S was crystallized using 150 mM malic acid, pH 7.5, 25% PEG 3350. The ΔV mutant was crystallized using 0.1 M Tris, pH 8.5, 20% polyethylene glycol 3350, 200 mM Li₂SO₄.

Single crystals were harvested from the drop, dipped into paraffin oil from the panjelly kit (Jena Biosciences), and frozen directly at 100 K in a nitrogen gas stream (Oxford Cryosystems). Diffraction data (Table 1) were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France). Data were integrated using MOSFLM (22) and further processed using the CCP4 package through ccp4i (23). Structures were solved by molecular replacement using MOLREP (24). Structures were refined with REFMAC (25), and models were built using COOT (26). Illustrations were made with PyMol (27).

Reduction of the Disulfide Bridge—Reducing conditions were obtained by adding 3 mM DTT to the protein in buffer for 1 h at room temperature. 1 h prior to gel electrophoresis, free thiol groups were blocked with 10 mM *N*-ethylmaleimide. Loading buffer did not contain β -mercaptoethanol for non-reducing conditions; otherwise it contained 10 mM β -mercaptoethanol.

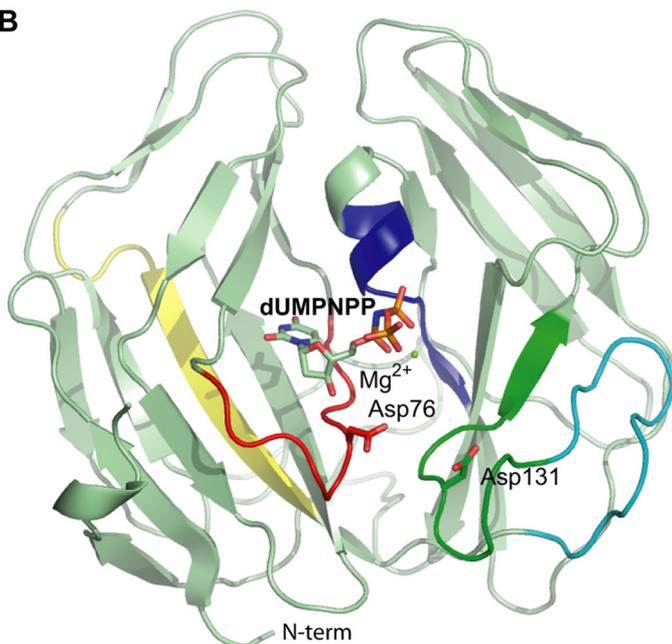
dUTPase Activity Assay—The pH drop due to proton release during dUTP hydrolysis was followed using cresol red as a pH indicator by monitoring absorbance at 573 nm. The reaction was carried out at 25 °C at pH 7.8 in quartz cells (Hellma), 1-cm path, using a Varian Cary 50 Bio spectrophotometer. The mixture contained 25 μ M dUTP, 25 μ M cresol red, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM Bicine-NaOH, pH 7.8. The reaction was initiated by adding dUTPase (in 5 mM Hepes, pH 7.5, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) to a final concentration of 31 nM. Kinetic values for K_m and k_{cat} were determined by linearization of the

Essential Role of Motif V of EBV dUTPase

A

	1	19	77
Human	MQLRFARLSEHATAPTRG SARAAGYD LYSAYD--YTIIPMEKAVVKTDIQIALPSG----		
<i>E. coli</i>	MKKIDVKILDPRVGKEFPLPTYA TS GSAGLDRACLNDAVELAPGDTTLVPTGLAHIADPS----		
Vaccinia	MFVKETNRAKSPT RS PGAAGYDLYSAYD--YTIIPGERQLIKTDISMSMPKF----		
<i>A. Thaliana</i>	GSHMACVNEPSPKQLKDRNGIHGDSSPFFKVKLSEKAVIP TRG SPLSAGYDLSAVD--SKVPARGKALIPDLSIAVPEG----		
MPMV	-----KRVGEPAPGPETS LS WGSQ LCSS QKQPI SKL TRAT PS SAGL DL CS T SHT-VLTPEMGPQALSTGIYGPLPPN----		
<i>C. glutamat.</i>	MTDLAAIKIVRLDKELPLPKRAHRG D AGVDLHATTD--AVIAPHGREIVGTGIAIALPLG----		
<i>P. falcip.</i>	MHLKIVCLSDEVREMYKNHKT H HEG D SGLDLFIVKD--EVLKPKSTTFVKLGIKAIALQYKSNNY		
FIV	MIIEGDGILDKRSE D AGYD LL AAKE--IHLLPGEVKVIPTGVKMLMPKG----		
EIAV	MLAYQGTQ I KEK R DE D AGFDLCVPYD--IMIPVSDTKIIPDVKIQVPPN----		
<i>M. tubercul.</i>	MS--TTLAIVRLDPGLPLPSRAHDG D AGVDLYSAED--VELAPGRRALVRTGVAVAVPFG----		
EBV Nterm	1	24	56
EBV Cterm	1	114	163
	MEACPHIRYAFQNDKLLQASVGRRLTLVNKTT--ILLRPMKTTTVDLGLYARPPEG----		
		131	163
		Motif I	
	78	104	141
Human	-----CYGRVAPRSGLAAKHF--IDVGAG V IDE D YRGNVGVVLFNFGKEK-FEVK K GD R IA Q LI C ERIFYPE----		
<i>E. coli</i>	-----LAAMMLPRSGLGHKHGI V LGNL V GLID S DYQ Q LMISVWNRGQDS-FTIQ P GERIA Q MI F VPV V QAE----		
Vaccinia	-----CYGRIAPRSGLSLKG--IDIGGG V IDE D YRGNIGVILINNGKCT-FNVNTGDR I A Q LI Y QRI Y YPE----		
<i>A. Thaliana</i>	-----TYARIAPRSGLAWKHS--IDVGAG V IDA D YRGPVGVILFNHSDAD-FEVK F GD R IA Q LI I EKI V TPD----		
MPMV	-----TFGLILGRSSITMKG--LQVY P GV I DN D Y T GEIKIMAKAVNNIV--TVSQGN R IA Q LI L PL I ETD----		
<i>C. glutamat.</i>	-----TVGLVHPRSGLAAREGLSIVN A P T IDA D Y R GEIKVCLINLDPEKPIMITRGDR I A Q LV I Q K VELVD----		
<i>P. falcip.</i>	YKCEKSENKKKDDDKSNIVNTS F LL F PRSSIS K T P LR-LANS I GLIDAGYR G E I AAALDNTSDQE-YHI K KN D KL V Q L VS F T G E P LS----		
FIV	-----YWGLI I G K SS I G S KG--LDVLGG V IDE G YR G E I GVIMIN V SRKS-ITLMER Q K I A Q LI I L P CK H ES----		
EIAV	-----SPGW V T G K S MA K Q G --LL I NG I I D E G Y T GE I Q V I C TN I G K SN-I K LE G Q K F A Q L I L Q H HS N S----		
<i>M. tubercul.</i>	-----MVGLVHPRSGLATRVGLSIVNS P GT I DAGYR G E I KVALINLDPA A PI V LR H RGDR I A Q LL V Q R VEL V E----		
EBV Nterm	57	83	123
EBV Cterm	56	76	113
	-----HGLMLWG S TR S RP V T-----SH V GI I D P GY T GE L R L I L Q N Q R RY N -STLR P SEL K I H L A A F RY A T----		
	164	226	
	-----HR P T I F G R S GL A M Q G--IL V K P CR W RR G GV D SL T N F S D Q T -V F L N K Y RR F C Q L V Y L H K H L T S F Y		
	Motif II		Motif III
	142	153	164
Human	-----I E EV Q AL D D-----T R EG S GG F ST G KN		
<i>E. coli</i>	-----F N L V ED F DA-----T D RG E GG F GH S GR Q		
Vaccinia	-----L E EV Q SL D S-----T N RG D Q Q F G ST G LR		
<i>A. Thaliana</i>	-----V V EV D DL D E-----T V RG D GG F ST G V		
MPMV	-----N K V Q Q P Y-----R G Q G S F GS S DI Y		
<i>C. glutamat.</i>	-----F E EV E EL D D-----T V RG D Q G Y G ST G K T A		
<i>P. falcip.</i>	-----F E L V EEL D E-----T S RG E GG F GS T S N N K Y		
FIV	-----L E Q G K V MD-----S E RG D NG Y GS T GV F		
EIAV	-----R Q P W DE N K I -----S Q RG D K G F G ST G V F		
<i>M. tubercul.</i>	-----L V EV S S F DE A GL-----A S T S RG D GG H SS G GH A SL		
EBV Nterm	124	140	154
EBV Cterm	124	140	154
	SP H S D AG V LG P RS L FR W AS C T F EE V PS L AM G DS L SE A LE G R O GR G F G SS G O		
	Motif V		

B



C

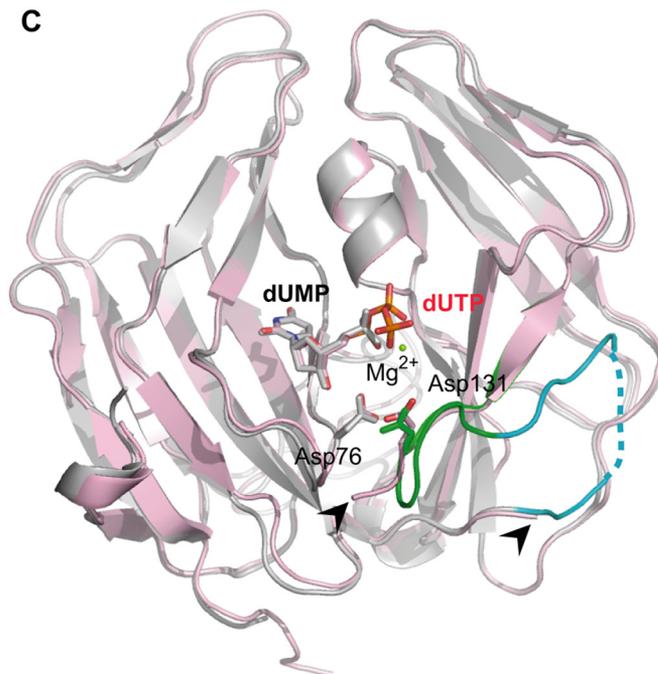


TABLE 1
Data collection and refinement statistics

Mutant	ΔV dUTP	ΔV dUMP	D131N	D131S/G78D	C4S
Protein Data Bank entry	2we3		2we1	2we2	2we0
Data collection statistics					
ESRF beamline	ID14_eh4	ID23_eh2	ID23_eh1	ID23_eh1	ID23_eh2
Space group	I4	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			
Cell parameters <i>a/b/c</i> (Å) ^a	103.2/103.2/47.7	54.6/56.5/80.5	55.6/56.9/81.1	55.7/57.0/81.2	56.0/56.8/81.4
Resolution (Å)	51.6-2.0	46.6-1.45	46.6-1.8	45.9-1.5	46.3-2.0
Completeness (%)	99.5 (99.9) ^b	100 (99.8)	98.1 (99.9)	99.3 (99.7)	99.7 (99.3)
Multiplicity	3.8 (3.8)	4.1 (4.1)	3.5 (3.4)	3.8 (3.9)	6.9 (6.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	7.2 (1.7)	4.4 (1.7)	6.6 (2.2)	8.4 (4.5)	5.0 (2.2)
<i>R</i> _{sym}	0.064 (0.431)	0.083 (0.371)	0.083 (0.348)	0.048 (0.166)	0.105 (0.339)
Refinement					
Atomic B model	Isotropic	Anisotropic	Isotropic	Anisotropic	Isotropic
No. of reflections	16194	44150	22791	39571	16536
<i>R</i> _{cryst}	0.212 (0.275)	0.193 (0.215)	0.196 (0.244)	0.195 (0.213)	0.189 (0.242)
<i>R</i> _{free}	0.272 (0.333)	0.221 (0.253)	0.247 (0.318)	0.224 (0.252)	0.249 (0.366)
r.m.s. deviations from ideal bond lengths (Å)	0.015	0.008	0.016	0.009	0.017
r.m.s. deviations from ideal bond angles (degrees)	1.7	1.2	1.6	1.3	1.7
Ramachandran plot ^c most favorable/additional/generously allowed/disallowed (%)	89.9/9.5/0.5/0	93.2/6.8/0/0	91.1/8.9/0/0	93.8/5.2/1.0/0	94.1/5.4/0.5/0
Model					
Modeled residues	240	248	245	248	247
dUMP		1	1	1	1
Mg ²⁺ -dUTP	1				
Water molecules	85	258	225	299	173
SO ₄ ²⁻	2	1	3	1	1
Malic acid					1

^a At 100 K.^b Values for the highest resolution bin are given in parentheses.^c From PROCHECK (35).

progress curve using the integrated Michaelis-Menten equation (19).

Less active mutants were studied using the EnzChek pyrophosphate assay kit (Invitrogen), allowing photometric detection of PP_i released during dUTP hydrolysis. It consists of a cleavage of PP_i to phosphate by pyrophosphatase and a detection of inorganic phosphate by the conversion of 2-amino-6-mercapto-7-methylpurineribonucleoside to ribose 1-phosphate and 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine with an absorption maximum at 360 nm by purine ribonucleoside phosphorylase. Reactions were carried out at 25 °C in 96-well plates in volumes of 250 μl with variable dUTP and protein concentrations. The buffer contained 50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM NaN₃. Absorbance was continuously monitored at 355 nm using a Thermo Labsystems iEMS Reader MF plate reader. Enzyme concentrations were chosen so that the initial velocity of the reaction with the dUTP substrate was at least 10 times slower than the initial velocity of the chromogenic reaction using the same concentration of a PP_i standard. Kinetic constants were determined using Lineweaver-Burk plots (supplemental Fig. 1). WT dUTPase concentrations were determined using an $\epsilon_{280} = 30,160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Mg²⁺-free Activity Assay—To assess the importance of Mg²⁺ for dUTPase activity, the “cresol red” assay was carried out after removing Mg²⁺. WT protein solution and reaction mixture without cresol red (25 μM dUTP, 150 mM KCl, 0.5 mM Bicine-NaOH, pH 7.8) were passed onto a column containing 1 ml of Chelex 100 resin (Sigma) to eliminate metal cations. 25 μM cresol red was then added, and the assay was performed as described above. The remaining Mg²⁺ in the assay was quantified after dilution by flame atomic absorption spectrometry (PerkinElmer Life Sciences) at the Grenoble University Hospital. Samples and standards were prepared in a solution of 1 g/liter lanthanum oxide, and concentrations were obtained using external calibration. The Mg²⁺ concentration in the Chelex-treated assay was below the detection limit of 0.08 μM. The absence of a lasting effect of Mg²⁺ depletion was checked by the addition of 1 mM Mg²⁺ to the mixture after Chelex treatment. Kinetic constants were the same as without the treatment (data not shown).

Surface Plasmon Resonance Experiment—Surface plasmon resonance (SPR) measurements were performed with a BIAcore T100 (Biacore AB) operated with BIAcore T100 evaluation Software 1.1. All measurements were performed at 25 °C, at

FIGURE 1. EBV dUTPase sequence and structure. *A*, sequence alignment of different dUTPases with known structures and the one from *C. glutamicum*. Residue numbers are given above the sequence for the human enzyme and below the sequences for the mycobacterial and EBV enzymes. The linker region is highlighted with cyan letters. The five conserved motifs are highlighted. Key residues of motif V are printed in red. A pink background highlights residues of motif V where side chain hydroxyl and main chain amide contact γ -phosphate in the crystal structure (13, 14). Green background, main chain amide interaction with β - and γ -phosphate; residues that have been deleted in the ΔV mutant are underlined. The conserved residues interacting with the motif V arginine of human-like dUTPases are printed in blue; those interacting with the motif V arginine of mycobacterium-like dUTPases are shown in magenta. *B*, structure of EBV dUTPase in complex with α,β -imido-dUTP and Mg²⁺ (Protein Data Bank entry 2bt1). The catalytic residue Asp⁷⁶ is shown together with Asp¹³¹ next to it. The four visible sequence motifs of the active site are colored according to Fig. 1*A*, and the loop connecting the two domains (residues 114–125) is colored in cyan. The bound α,β -imido-dUTP molecule is shown as sticks and colored according to atom types. *C*, the ΔV structure (pink) in complex with dUTP (sticks, atom colors) and Mg²⁺. The disordered part of the connecting loop is located between the two arrows. Superposed is the dUMP-bound WT dUTPase structure (Protein Data Bank entry 2bsy; gray, connecting loop in cyan, motif I in green, disordered part dotted).

Essential Role of Motif V of EBV dUTPase

10 $\mu\text{l}/\text{min}$ using a running buffer composed of 20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM MgCl_2 . The carboxymethylated dextran layer of a CM5 sensor chip (Biacore AB) was activated by a 7-min pulse of a 1:1 mixture of freshly prepared 50 mM *N*-hydroxysuccinimide and 200 mM *N*-ethyl-*N'*-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide. Recombinant human CSF1 (colony-stimulating factor-1), produced according to a modified protocol (28), and streptavidin (Sigma) in 10 mM acetate buffer, pH 4, WT dUTPase, and truncated C-terminal mutant V in 20 mM Hepes, pH 7.5, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 were bound to the activated surfaces during several pulses. Remaining *N*-hydroxysuccinimide ester groups were blocked by a 7-min injection of 1.0 M ethanolamine hydrochloride, pH 8.5. CSF1- and streptavidin-modified surfaces were used as reference for the WT dUTPase (7000 resonance units)- and for the ΔV mutant (8000 resonance units)-modified surfaces, respectively. Curves obtained on the reference surface are deduced from the curves recorded on the recognition surfaces, allowing elimination of refractive index changes due to buffer effects. Substrate dUTP and inhibitor α,β -imido-dUTP diluted in running buffer were injected at concentrations ranging from 1 to 1000 μM . No regeneration procedure was required. The absence of mass transport effects was checked on each surface by separately running one injection of α,β -imido-dUTP (5 μM) for 120 s at different flow rates ranging from 10 to 70 $\mu\text{l}/\text{min}$. It is possible to overlay the obtained curves, confirming the kinetic control of the experiments (not shown). K_D values are obtained by fitting the steady-state response *versus* the concentration according to a 1:1 interaction model using BIAcore T100 evaluation software version 1.1.

RESULTS

Role of the Disulfide Bridge—The presence in solution of the disulfide bridge between residues 4 and 246 could be verified by SDS-PAGE under non-reducing conditions in the presence of the blocking agent *N*-ethylmaleimide compared with a C4S mutant (Fig. 2) or with the WT protein under reducing conditions. The disulfide-linked form migrates faster than the reduced protein and represents the major fraction of dUTPase. Incubation of dUTPase under reducing conditions followed by the same analysis on non-reducing PAGE showed an increase of the reduced form in solution, although most of the protein remains oxidized. The enzymatic activity of the native enzyme, the one partially reduced with DTT, and the C4S mutant were virtually identical (Table 2) excluding a regulatory role of the disulfide bridge. The structure of the C4S mutant was almost identical to that of WT dUTPase with dUMP. The remaining disulfide bridge partner Cys²⁴⁶ stayed in place; only Ser⁴ became disordered, and Pro⁵ adopted a different conformation.

Stabilization of the Linker Region—We speculated earlier (17) that the disorder of the loop containing motif I in the α,β -imido-dUTP-bound structure might be due to a clustering of negative charges contributed by Asp⁷⁶, Asp¹³¹, and the γ -phosphate group of α,β -imido-dUTP (Fig. 1B) observed so far only in the EBV dUTPase structure. Site-directed mutagenesis of the apparently EBV-specific residue Asp¹³¹ to serine, the residue present in the *E. coli* enzyme, or to asparagine or glutamic acid led to a large loss in catalytic activity (Table 2). This activity was undetectable in the

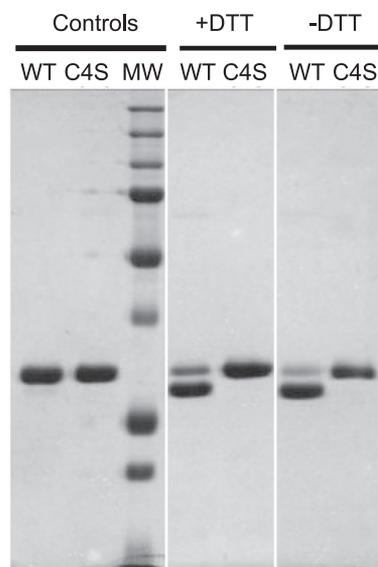


FIGURE 2. Analysis of the disulfide bridge. SDS-PAGE of WT dUTPase and C4S mutant under reducing (Controls) and non-reducing conditions as described under "Materials and Methods." MW, molecular weight markers.

TABLE 2
Enzymatic activity assays

	Assay	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
		μM	s^{-1}	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
WT (1 mM Mg^{2+})	Cresol red	0.8 ± 0.2^a	1.4 ± 0.1	1.8×10^6
	Enzcheck	$\ll 5^b$	1.2 ± 0.2	
Without Mg^{2+} (<0.08 μM)	Cresol red	6.0 ± 0.9	1.2 ± 0.2	0.2×10^6
WT with DTT	Cresol red	0.71 ± 0.05	1.6 ± 0.1	2.3×10^6
C4S	Cresol red	0.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.8×10^6
R268A	Enzcheck	8 ± 4	0.06 ± 0.01	0.008×10^6
F273A	Enzcheck	NM ^c	NM	NM
D131S	Enzcheck	5.2 ± 0.5	0.04 ± 0.01	0.008×10^6
D131E	Enzcheck	NM	NM	NM
D131N	Enzcheck	7 ± 2	0.04 ± 0.01	0.006×10^6
D131S/G78D	Enzcheck	9 ± 2	0.18 ± 0.02	0.02×10^6

^a Errors are based on 2–5 independent determinations of the kinetic constants and a minimal error of 10%.

^b The minimum concentrations (5 μM) of dUTP used in the test did not allow us to determine a value of K_m for the WT enzyme, confirming that the K_m is $\ll 5 \mu\text{M}$.

^c NM, not measurable.

cresol red assay and could only be measured in the more sensitive EnzChek-based assay. With the EnzChek assay, WT k_{cat} could be estimated as 1.2 s^{-1} , allowing the values determined with this assay to be validated, although the K_m was too low to be determined, since substrate concentrations had to be above 5 μM . Mutants D131S and D131N showed a k_{cat} of 0.04 s^{-1} and K_m value of 5 or 7 μM , respectively, whereas activity of the D131E mutant remained undetectable. A double mutation D131S/G78D, which will be discussed below, showed some recovery of enzymatic activity, with a 5-fold increase of its k_{cat} to 0.18 s^{-1} compared with the single mutants and a doubled K_m .

Crystallization of these mutants in the presence of dUTP was attempted using a robotic screen of 576 crystallization conditions. Only for mutant D131N and the double mutant D131S/G78D was it possible to obtain crystals that turned out to be isomorphous, with the WT crystals containing dUMP. Structural changes concern only the mutated residues (Fig. 3) and the degree of disorder of the flexible region 114–133, which varies between structures (not shown).

Structure of the Deletion Mutant of Motif V—Using the same conditions as for the WT enzyme in the presence of dUTP, after 2

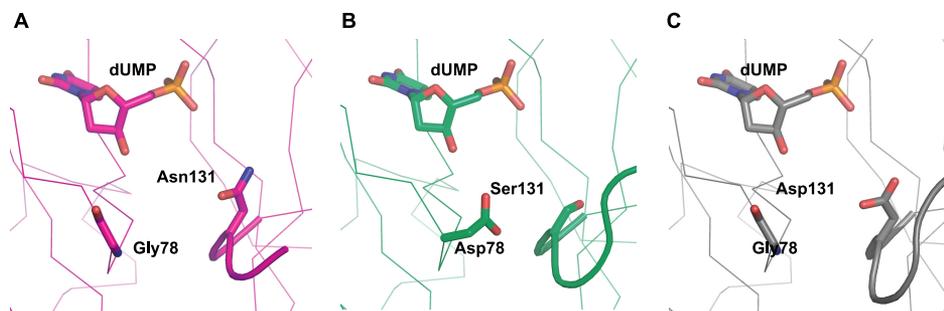


FIGURE 3. Mutant structures of EBV dUTPase in complex with dUMP around residue 131. Mutant D131N (A), double mutant D131S/G78D (B), and WT dUTPase (C) are shown in the same orientation.

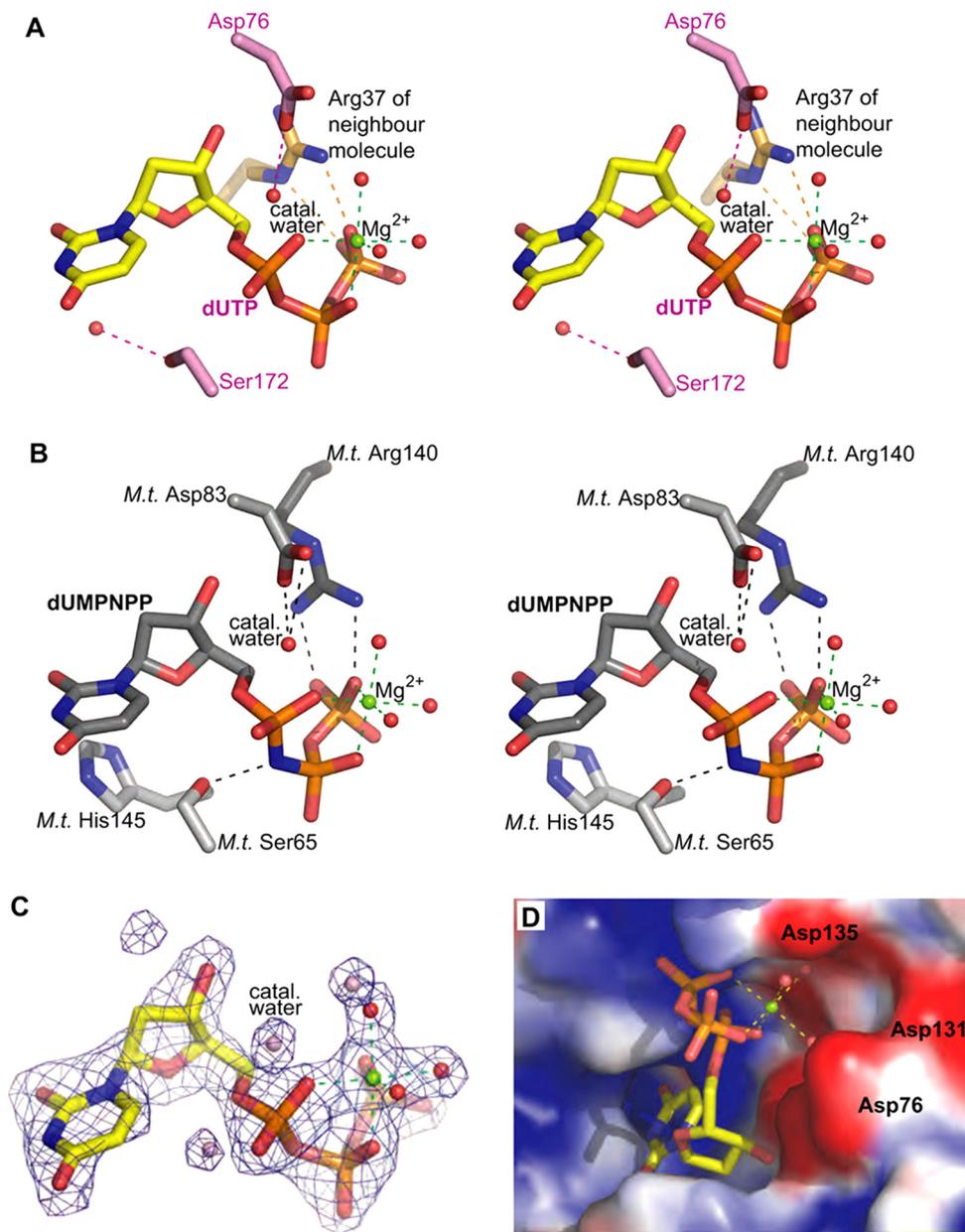


FIGURE 4. Structure of the active site with bound ligands. A, stereoview of dUMP, Mg^{2+} , and its coordinating (green lines) water molecules bound to the active site of EBV dUTPase ΔV mutant (pink). The arginine residue of a neighbor symmetry mate (Arg^{37}) is shown in orange. B, *M. tuberculosis* dUTPase structure with bound α,β -imido-dUMP and the arginine and the histidine lid residues of motif V (Protein Data Bank entry 2py4) (14). Important hydrogen bonds and salt bridges are shown in the color of their partner molecule. C, $F_o - F_c$ electron density contoured at 2.5σ level. dUMP, Mg^{2+} , and water molecules have been left out of the structure factor calculation. D, structure of the EBV dUTPase ΔV mutant Mg^{2+} -dUMP complex. The accessible surface is shown colored according to the electrostatic potential of the protein (from negative (red) to positive (blue)) calculated with apbs (34).

days, crystallization trials of ΔV mutant yielded crystals belonging to tetragonal space group I4 (Table 1) containing unhydrolyzed dUTP in the active site. After 2–3 weeks, orthorhombic dUTPase crystals appeared and were isomorphous with the WT-dUMP complex crystals described previously (17). These crystals diffracted X-rays to 1.5 Å resolution and showed a bound dUMP molecule in the active site, obviously arising from slow spontaneous or enzymatic hydrolysis of dUTP during the 2–3-week period needed for crystallization and a protein structure virtually identical to the one of the WT protein-dUMP complex (not shown). The tetragonal crystals diffracted X-rays to 2 Å resolution and showed a bound Mg^{2+} -dUMP complex (Fig. 4, A, C, and D) and a largely disordered linker region (residues 114–133), where residues 115–128 are invisible (Fig. 1C). Still, the catalytic residue Asp^{76} is correctly in place to interact with a water molecule, which is supposed to carry out the nucleophilic attack on the α -phosphate (16) (Fig. 4A). The Mg^{2+} ion is coordinated in a tridentate way by the three phosphate groups and three additional water molecules, leading to an octahedral coordination. The coordinating water molecules are hydrogen-bonded to Asp^{135} of motif I, to the catalytic Asp^{76} of motif III, and to the three phosphate groups, whereas Asp^{131} contributes to the negative charge of the environment (Fig. 4D). An arginine residue from a symmetry-related molecule forms a salt bridge with the γ -phosphate (Fig. 4A). The hydroxyl group of Ser^{172} is turned away from the substrate and hydrogen-bonds to a water molecule (Fig. 4A) in the same way as observed in complexes with α,β -imido-dUMP, as illustrated in Fig. 4B.

Kinetics and Surface Plasmon Resonance Binding Assays in the Presence or Absence of Mg^{2+} —Interaction of dUTPase with substrate

Essential Role of Motif V of EBV dUTPase

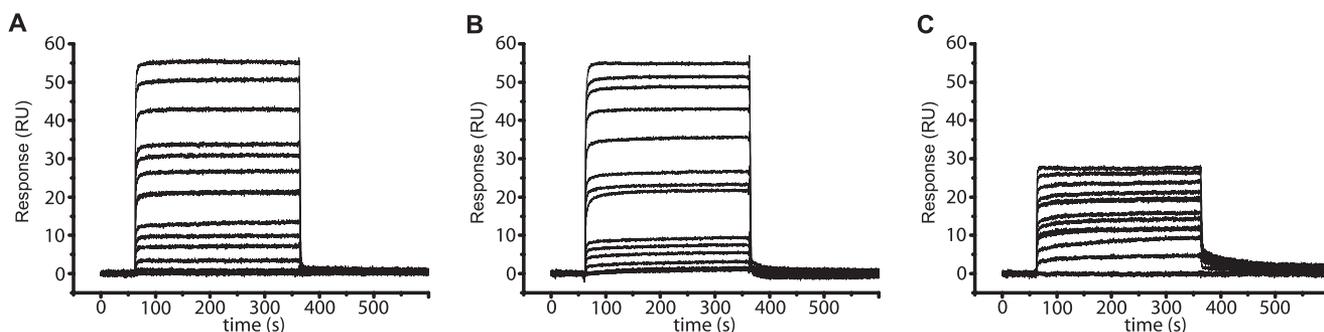


FIGURE 5. **Surface plasmon resonance sensorgrams.** A, interaction of ΔV mutant with varying concentrations of α,β -imido-dUTP, from 0 μM (bottom curve) to 400 μM (upper curve). B, ΔV mutant with varying concentrations of dUTP, from 0 μM (bottom curve) to 1000 μM (upper curve). C, WT with varying concentrations of α,β -imido-dUTP, from 0 μM (bottom curve) to 200 μM (upper curve).

TABLE 3
Binding affinities determined with surface plasmon resonance

dUTPase on chip	Ligand	K_D
WT	α,β -Imido-dUTP (1 mM Mg^{2+})	7 μM
	α,β -Imido-dUTP without Mg^{2+}	NM ^a
ΔV mutant	dUTP (1 mM Mg^{2+})	37 μM
	dUTP without Mg^{2+}	NM
	α,β -Imido-dUTP (1 mM Mg^{2+})	62 μM
	α,β -Imido-dUTP without Mg^{2+}	NM

^a NM, not measurable.

dUTP or analogue α,β -imido-dUTP in the presence or absence of Mg^{2+} was further studied by SPR analysis using ΔV mutant or WT dUTPase. The signal recorded for binding of dUTP or α,β -imido-dUTP onto ΔV mutant allowed fitting of the data and determination of K_D values of 37 and 62 μM , respectively, in the presence of Mg^{2+} (Fig. 5, A and B, and Table 3). Using α,β -imido-dUTP and the WT enzyme (Fig. 5C), we obtained a value of 7 μM . The dissociation constant of dUTP (37 μM) determined by SPR for the ΔV mutant is 50 times increased compared with the K_m of the wild type enzyme (0.7 μM); an increase from 7 to 62 μM is observed for α,β -imido-dUTP. As shown in Fig. 5, binding and release of dUTP and α,β -imido-dUTP were very rapid, making determination of k_{on} and k_{off} values impossible in these conditions. In the absence of Mg^{2+} , the signal is of insufficient quality to obtain interpretable data (below 10 resonance units) even at high concentrations of ligand (up to 5 mM) (data not shown).

We determined enzyme kinetics of the WT enzyme in the absence of Mg^{2+} . Whereas $K_m = 0.8 \mu\text{M}$ and $k_{\text{cat}} = 1.4 \text{ s}^{-1}$ for the WT enzyme in the presence of magnesium, these values are 6.0 μM and 1.2 s^{-1} , respectively, in its absence in the cresol red assay based on proton release during the reaction. The absence of magnesium affects thus almost exclusively the K_m by a 7.5-fold increase and has only a small effect on the k_{cat} .

Site-directed mutagenesis of the two key residues in motif V, with Arg²⁶⁸ or Phe²⁷³ changed to alanine, led to a non-detectable enzymatic activity when the phenylalanine was replaced, even using the more sensitive EnzChek-based assay. Catalytic efficiency of mutant R268A was largely affected, being reduced by a factor of 300. The mutation had a much lower effect on binding, with a 10-fold increase of K_m to 8 μM .

DISCUSSION

Role of the Disulfide Bridge—All of the different EBV dUTPase crystal structures determined so far show the presence of a disulfide bridge involving cysteines 4 and 246. Since the second residue is close to the disordered part of the structure carrying essential motif V, we wanted to verify that there is no regulatory role of this unexpected disulfide bridge. The difference in mobility in non-reducing PAGE (Fig. 2) of the disulfide-linked and the reduced form allowed us to confirm that the link is already largely present in solution and only to a small degree influenced by a reduction with DTT. The kinetic parameters in the presence of DTT (Table 2) changed insignificantly, but only a small fraction of the reduced form could be obtained by reduction with DTT. We constructed mutant C4S, which would correspond to the situation of a reduced disulfide bridge. Upon mutation of Cys⁴ to serine, this residue actually becomes disordered in the structure. The kinetic parameters of the C4S mutant were similar to those of the WT enzyme (Table 2), indicating that there is no regulatory role of the disulfide bridge but that it is more likely an artifact obtained under the rather oxidizing conditions of protein preparation.

Stabilization of the Linker Region—Mutants of Asp¹³¹ were designed in order to destroy a cluster of negative charges formed by Asp⁷⁶, Asp¹³¹, and the γ -phosphate in the EBV dUTPase active site, since we suspected that it was responsible for the disordering of the active site residues in the α,β -imido-dUTP-EBV dUTPase structure. The mutation of Asp¹³¹ to serine, the corresponding residue in the *E. coli* structure, resulted in a much reduced enzymatic activity. This loss of activity has been confirmed with the more conservative mutants D131N and D131E (Table 2).

An initial comparison of the structure with that of feline immunodeficiency virus dUTPase (12) suggested a possible interaction of Asp¹³¹ with the conserved arginine residue in the RGXXGFG sequence of motif V (Fig. 1A), which was confirmed by the structure of *M. tuberculosis* dUTPase in the presence of α,β -imido-dUTP (14) (Fig. 6A). The loss of this interaction could explain the drastic effect of a substitution of Asp¹³¹, which could play a central role in the ordering of motif V. This idea is in agreement with the mutations to serine and asparagine having a smaller effect than the change to glutamic acid, which conserves the charge but would lead to a steric hindrance excluding Arg²⁶⁸ from its position between the γ -phosphate and the acidic residue.

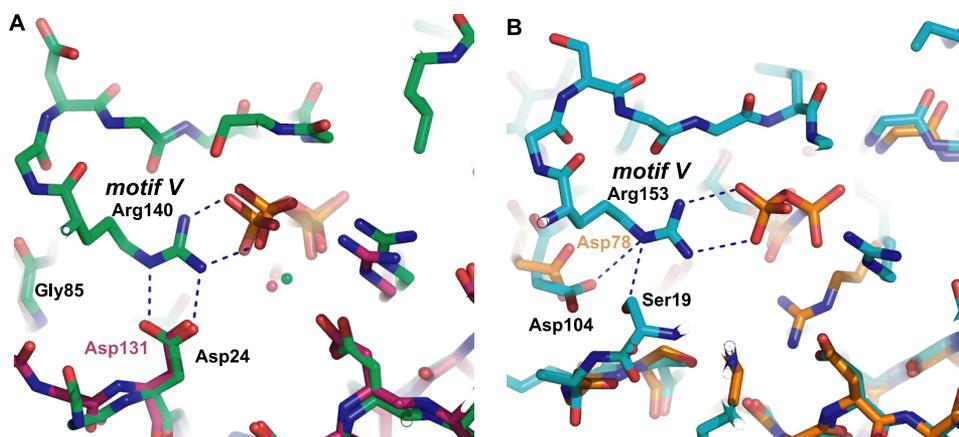


FIGURE 6. Structure around the conserved arginine of motif V. A, the *M. tuberculosis* dUTPase (green; Protein Data Bank entry 2py4) (14) structure and the salt bridges formed by Arg¹⁴⁰. The partner aspartic acid residue is shown. The EBV ΔV -dUTP complex structure is shown superposed in pink together with the corresponding residue, Asp¹³¹. B, the human dUTPase (Protein Data Bank entry 3ehw (13), cyan) together with the superposed EBV double mutant D131S/G78D structure (in orange). Salt bridges and hydrogen bonds involving Arg¹⁵³ are shown.

The interaction of equivalents of Asp¹³¹ with the arginine residue of motif V is the only ionic interaction between motif V and the rest of the protein. The interactions of motif V mainly involve the bound substrate and some hydrogen bonds with residues of the body of the enzyme. Despite this apparently essential role, it appears that Asp¹³¹ is not conserved (Fig. 1A), for example, in the human or *E. coli* enzymes. Inspection of human dUTPase structures that show motif V points to a possible salt bridge between the arginine residue and Asp⁸¹ with a distance between 3.5 and 3.8 Å in the α,β -imido-dUTP-bound structure (Protein Data Bank entry 3ehw) (13) or 3.0 Å in the dUDP-bound enzyme (Protein Data Bank entry 1q5h) (3). In addition, there is a hydrogen bond with the hydroxyl group of Ser¹⁹.

From the sequence alignment (Fig. 1A), it became obvious that in the sequences that do not conserve the equivalent of EBV Asp¹³¹, the aspartic residue equivalent to human Asp⁸¹ is conserved, along with the hydroxyl group of the serine or threonine in position 19. The only exceptions are the sequences of a number of *Corynebacterium* species, such as *Corynebacterium glutamicum*, which show the presence of both aspartic acid residues, the one corresponding to the conserved residue of EBV, and the one corresponding to human dUTPase. Therefore, two solutions become obvious for the interaction with the arginine of motif V, either a bidentate salt bridge with an equivalent of EBV Asp¹³¹ as in the prototype structure of *M. tuberculosis* dUTPase (Fig. 6A) or a weak salt bridge with Asp⁸¹ as in the prototype structure of human dUTPase combined with a hydrogen bond with the hydroxyl group of residue 19 (Fig. 6B). This defines two groups of dUTPases. A first group containing EBV dUTPase is formed by the monomeric enzymes from herpesviruses and the trimeric dUTPases from lentiviruses, *P. falciparum*, and some bacteria, such as mycobacteria, corynebacteria, and clostridia. A second group contains the majority of trimeric dUTPases, in particular most eukaryotic ones and, for example, the enzymes from poxviruses and *E. coli*. *Corynebacterium* often contain both aspartic acid residues (Fig. 1A).

The large reduction of activity in the D131S mutant prompted us to construct a double mutant of the EBV enzyme in order to make it more *E. coli*-like. An aspartic acid residue is

placed at position 78 in EBV numbering, replacing the glycine residue normally present at this position (Fig. 1C), whereas Asp¹³¹ is mutated to serine, the residue present in the *E. coli* enzyme. A comparison of *E. coli* dUTPase belonging to the second family with the EBV enzyme showed that there is no structural equivalent at the position of Ser¹⁹ and that thus we would only be able to obtain a partial effect. Indeed, when comparing the double mutant with the D131S simple mutant, we observed an approximately 5-fold increase of k_{cat} , whereas the K_m changed by a factor of 2 (Table 2). This showed the importance of the partner aspartic acid residues of the

arginine residue of motif V, and as expected, the recovery of activity was only partial, since one of the interactions could not be restored.

Role of Motif V—The ΔV mutant allowed us to obtain the first structure of an Mg²⁺-dUTP substrate productively bound to a dUTPase containing no mutations other than the deletion of motif V. dUTP binds in the same gauche conformation as in the α,β -imido-dUTP complex (17) (Fig. 4A), thus confirming the value of this compound as a model for substrate binding. The same binding mode is observed in a number of dUTPase structures (Protein Data Bank entries 1s1x, 1sjn (7), 1rn8, 1syl (16), 2py4 (14), and 3ehw (13)) and is generally believed to correspond to the catalytically competent form. Previous structures containing dUTP lacked magnesium and showed different dUTP conformations (Protein Data Bank entries 1f7q (12) and 1sm8 and 1smc (7)), which were essentially *trans* (29) or carried a mutation of the catalytic aspartic acid residue (16).

The inactivity of the ΔV mutant during the 2-day co-crystallization period allowed the observation of the substrate in the active site and was even more surprising, since apparently most elements necessary for catalysis were in place (Fig. 4A): (i) a productive conformation of the dUTP molecule, (ii) the Mg²⁺ ion, and (iii) an arginine residue contributed by a crystal contact mimicking the conserved arginine of motif V. This arginine residue in the tetragonal crystal form and the position of the conserved arginine of motif V in the *M. tuberculosis* dUTPase structure (14) are shown in Fig. 4, A and B. The hydrogen bonding pattern is similar, although the orientation of the guanidinium group is different. These observations question the role of magnesium in catalysis, which was investigated further as discussed below along with the role of the arginine residue in the polarization of the substrate's phosphate groups. This prompted us to assess the relative importance of the two principal residues of motif V, Arg²⁶⁸ and Phe²⁷³, by site-directed mutagenesis. Surprisingly, the R268A mutant still had a significant activity similar to the mutants of residue Asp¹³¹ interacting with Arg²⁶⁸ (Table 2), whereas the mutation affecting lid residue Phe²⁷³ led to an activity below the detection limit.

Essential Role of Motif V of EBV dUTPase

In most structures of trimeric dUTPases, as in the monomeric one of EBV, motif V is disordered. The recent structures of the human or *M. tuberculosis* enzyme in complex with α,β -imido-dUTP (13, 14) (Protein Data Bank entries 3ehw and 2py4) give a view onto this part of the enzyme and show best the interactions of motif V with the substrate analogue (Fig. 6, A and B) and its role in catalysis. In other structures, only parts of motif V are visible, and/or an inhibitor is bound with its phosphate groups in a non-productive conformation that does not allow us to analyze all of the interactions of motif V. The structures by Varga *et al.* show that the phosphate groups of α,β -imido-dUTP interact with hydroxyl groups of conserved serine residues and amide nitrogen atoms of the backbone of motif V adjacent to the lid residue (Fig. 1A). The conserved arginine residue also interacts with the γ -phosphate (Fig. 6). Varga *et al.* (13) could show that the folding of motif V onto the bound analogue α,β -imido-dUTP leads to a decrease of the distance (2.8 Å) of the catalytic water molecule needed for nucleophilic attack from the α -phosphorus atom compared with an active site with a disordered motif V, where this distance is 3.2 Å. In the EBV dUTPase, the distance between the phosphorus and the catalytic water molecule is 3.5 Å in the dUTP- ΔV dUTPase complex, the same as in the EBV wild type dUTPase-dUMP complex. The EBV dUTPase structure with bound α,β -imido-dUTP showed a partially disorganized active site with the absence of the catalytic water molecule due to a large movement of the activating residue Asp⁷⁶ (17) (Fig. 1B). Based on the results of Varga *et al.* (13), folding of motif V with the numerous interactions of its backbone atoms with the phosphate groups leads to an intimate contact of the substrate's α -phosphorus atom with the catalytic water molecule. The relatively large distance of the catalytic water molecule from the α -phosphorus atom explains the stability of the substrate in our ΔV mutant. When the lid residue Phe²⁷³ covers the active site and the rest of motif V becomes ordered, expulsion of the solvent from the active site results in a change in the dielectric constant and electrostatics, probably promoting catalysis. Another consequence of binding of the hydrophobic lid residue is the displacement of the water molecule normally hydrogen-bonded to Ser¹⁷² (Fig. 4A). This probably reorients Ser¹⁷² toward an interaction with the bridging oxygen atom between the α - and β -phosphate groups in the same way as it interacts with α,β -imido-dUTP (Fig. 4B). A mutation of the corresponding residue in the *E. coli* enzyme to alanine led to a 3-order of magnitude reduction in the catalytic rate, whereas binding of the substrate was enhanced by a factor of 30 (30). The enhanced substrate binding is most easily explained by a binding site for the lid residue, which has been rendered more hydrophobic due to the loss of the hydroxyl group binding to the water molecule in the absence of the lid residue. This would enhance the contribution of motif V to binding, which is discussed below. The reduction of the catalytic rate points to a second role of the hydroxyl group with a direct involvement in catalysis, probably through the interaction with the bridging oxygen atom. The hydroxyl group is likely to either stabilize the charge of this atom or to donate a proton. The complete inactivity of the F273A mutant of EBV dUTPase supports these ideas.

Despite the flexible character of motif V, it appears to contribute to substrate affinity. When motif V is deleted, the dissociation constant of dUTP increases 50 times, and the one of α,β -imido-dUTP increases 10 times, an effect which has to be taken into account in approaches of structure-based drug design. It is likely that the interaction of motif V with the substrate largely takes place via the phenylalanine lid residue interacting with the uracil ring and the ribose, thus explaining the reduced affinity of the ΔV mutant for the substrate. One difference in the binding of the two compounds is that in the α,β -imido-dUTP complex, the bridging atom between α - and β -phosphate groups ($-\text{NH}_2^-$) interacts with Ser¹⁷², a conserved residue within motif II, whereas no hydrogen bond was formed by the corresponding oxygen atom in the substrate. This would suggest rather better binding of α,β -imido-dUTP, but preferred conformations of the phosphate groups in solution may be different for the two compounds, resulting in a lower population of the active gauche conformation for α,β -imido-dUTP in solution.

Interestingly, the disorganization of the active site observed for EBV dUTPase α,β -imido-dUTP complex (Fig. 1B) was not observed for the dUTP- ΔV complex despite the similar position of the two ligand molecules (Fig. 1C). This may point to a globally reduced stability of this region in EBV dUTPase and an influence of crystal contacts on the structure, since the α,β -imido-dUTP-WT complex crystals belong to a different space group than those of the dUMP-bound form or of the ΔV -dUTP complex.

Role of the Magnesium Ion in Catalysis—The observation of an Mg^{2+} -dUTP complex in the active site of the ΔV mutant raised the question of the importance of the magnesium ion for catalysis. It turned out that the enzymatic activity depends little on the presence of Mg^{2+} ions, since the rate constant k_{cat} (Table 2) decreases insignificantly, whereas the K_m increases 10-fold at an Mg^{2+} concentration ($<0.08 \mu\text{M}$ from atomic absorption spectrometry) well below the apparent dissociation constant of an Mg^{2+} -dUTPase/dUTP complex (21). The effect of an Mg^{2+} depletion in an EDTA-buffered system was studied first by Larsson *et al.* (19) for *E. coli* dUTPase. The authors found a 100-fold reduction in the binding affinity of dUTP in the absence of Mg^{2+} (K_m increasing from 0.2 to 16 μM), confirmed by Palmén *et al.* (30). In a later study, a 3-fold reduction of k_{cat} was observed, combined with an increase of K_m by 1 order of magnitude (from 0.6 to 9 μM) (21). Quesada-Soriano *et al.* (31) studied *P. falciparum* dUTPase and observed that the K_m increased from 1.9 μM in the presence of Mg^{2+} to 22 μM without the metal ion. k_{cat} was also affected, falling from 13 to 0.2 s^{-1} without Mg^{2+} . Concerning the K_m , our results are similar; still, the effect on k_{cat} is much smaller in our study. This may be a distinction of the EBV enzyme, which generally shows a lower k_{cat} than other dUTPases. SPR showed a large difference between responses with and without magnesium as well for the ΔV mutant and dUTP as for the WT and α,β -imido-dUTP, confirming that Mg^{2+} plays an important role in substrate binding.

In the EBV enzyme, rigidification of the triphosphate group and polarization of the phosphate groups by magnesium coordination are obviously not essential for catalysis. Binding of a preexisting Mg^{2+} -dUTP complex (32) from solution is proba-

bly entropically more favorable and leads to tighter electrostatic interactions of the phosphate groups (Fig. 4D). As a consequence, substrate binding is increased, and in turn, as the catalytic step is rate-limiting (15), the K_m drops.

Conclusions—The current study helped to gain a clearer vision of the common mode of catalytic action of trimeric and monomeric dUTPases. The relevance of the evolution from trimeric to monomeric dUTPase with its concomitant increase of the required coding space still remains unexplained. A regulatory role of the disulfide bridge in the EBV enzyme could be rejected. There may also be non-enzymatic roles of EBV dUTPase; e.g. a recent study (33) describes an up-regulation of proinflammatory cytokine secretion due to activation of NF- κ B through interaction of extracellular dUTPase with TLR-2 (Toll-like receptor 2).

Although monomeric EBV dUTPase has a different subunit organization from trimeric dUTPases, there is no evidence for differences in the catalytic mechanism. Depending on the position of the aspartic acid residue interacting with the arginine residue of motif V, monomeric and trimeric dUTPases can be classified into two families. In the absence of motif V, all elements needed for catalysis appear to be in place, but the substrate remains stably bound to the enzyme. Consequently, motif V and in particular the phenylalanine lid residue appear to be absolutely essential for catalysis. The magnesium ion appears to play a minor role in catalysis. Polarization effects due to Mg²⁺-binding and electrostatic interactions with β - and γ -phosphate groups contribute surprisingly little.

Together with previous results, our findings contribute to an overall picture of catalysis by dUTPases. A mold formed by the rigid part of the molecule comprising motifs I–IV seizes dUTP and discriminates against similar molecules, such as UTP or dCTP. A transient event folds the C-terminal motif V over the active site, leading to a tighter binding of the substrate, as indicated by the contribution of motif V and particularly the lid residue to binding. This event is very rapid, since it apparently could not be resolved in the kinetic study of Tóth and co-workers (15). At the same time, the hydroxyl group of the conserved serine of motif II changes its position to interact with the oxygen atom bridging α - and β - phosphate groups and assists in catalysis, as proposed by Palmén and co-workers (30). The conformational change pushes the substrate farther down into the active site to an intimate contact with the catalytic water molecule, leading to substrate hydrolysis, as suggested previously (13, 15). Finally, the products are released rapidly (15).

Acknowledgments—We are grateful to Josiane Arnaud and Alain Favier (Department of Integrated Biology, University Hospital Grenoble) for atomic absorption analysis. We acknowledge the NanoBio program for the facilities of the Surface Characterization Platform.

REFERENCES

- Harkiolaki, M., Dodson, E. J., Bernier-Villamor, V., Turkenburg, J. P., González-Pacanowska, D., and Wilson, K. S. (2004) *Structure* **12**, 41–53
- Cedergren-Zeppezauer, E. S., Larsson, G., Nyman, P. O., Dauter, Z., and Wilson, K. S. (1992) *Nature* **355**, 740–743
- Mol, C. D., Harris, J. M., McIntosh, E. M., and Tainer, J. A. (1996) *Structure* **4**, 1077–1092

- Dauter, Z., Persson, R., Rosengren, A. M., Nyman, P. O., Wilson, K. S., and Cedergren-Zeppezauer, E. S. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 655–673
- Prasad, G. S., Stura, E. A., McRee, D. E., Laco, G. S., Hasselkus-Light, C., Elder, J. H., and Stout, C. D. (1996) *Protein Sci.* **5**, 2429–2437
- Németh-Pongrácz, V., Barabás, O., Fuxreiter, M., Simon, I., Pichová, I., Rumlová, M., Zábranská, H., Svergun, D., Petoukhov, M., Harmat, V., Klement, E., Hunyadi-Gulyás, E., Medzihradzsky, K. F., Kónya, E., and Vértessy, B. G. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, 495–505
- Chan, S., Segelke, B., Lakin, T., Krupka, H., Cho, U. S., Kim, M. Y., So, M., Kim, C. Y., Naranjo, C. M., Rogers, Y. C., Park, M. S., Waldo, G. S., Pashkov, I., Cascio, D., Perry, J. L., and Sawaya, M. R. (2004) *J. Mol. Biol.* **341**, 503–517
- Whittingham, J. L., Leal, I., Nguyen, C., Kasinathan, G., Bell, E., Jones, A. F., Berry, C., Benito, A., Turkenburg, J. P., Dodson, E. J., Ruiz Perez, L. M., Wilkinson, A. J., Johansson, N. G., Brun, R., Gilbert, I. H., Gonzalez Pacanowska, D., and Wilson, K. S. (2005) *Structure* **13**, 329–338
- Bajaj, M., and Moriyama, H. (2007) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 409–411
- Samal, A., Schormann, N., Cook, W. J., DeLucas, L. J., and Chattopadhyay, D. (2007) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**, 571–580
- McGeoch, D. J. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 4105–4110
- Prasad, G. S., Stura, E. A., Elder, J. H., and Stout, C. D. (2000) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**, 1100–1109
- Varga, B., Barabás, O., Kovári, J., Tóth, J., Hunyadi-Gulyás, E., Klement, E., Medzihradzsky, K. F., Tölgyesi, F., Fidy, J., and Vértessy, B. G. (2007) *FEBS Lett.* **581**, 4783–4788
- Varga, B., Barabás, O., Takács, E., Nagy, N., Nagy, P., and Vértessy, B. G. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 8–13
- Tóth, J., Varga, B., Kovács, M., Málnási-Csizmadia, A., and Vértessy, B. G. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 33572–33582
- Barabás, O., Pongrácz, V., Kovári, J., Wilmanns, M., and Vértessy, B. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 42907–42915
- Tarbouriech, N., Buisson, M., Seigneurin, J. M., Cusack, S., and Burmeister, W. P. (2005) *Structure* **13**, 1299–1310
- Bergman, A. C., Nyman, P. O., and Larsson, G. (1998) *FEBS Lett.* **441**, 327–330
- Larsson, G., Nyman, P. O., and Kvassman, J. O. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24010–24016
- Vértessy, B. G., Larsson, G., Persson, T., Bergman, A. C., Persson, R., and Nyman, P. O. (1998) *FEBS Lett.* **421**, 83–88
- Mustafi, D., Bekesi, A., Vértessy, B. G., and Makinen, M. W. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5670–5675
- Leslie, A. W. G. (1992) *Int. CCP4/ESF-EACMB Newsletter Protein Crystallogr.* **26**
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., and Dodson, E. (2003) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1131–1137
- Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022–1025
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- DeLano, W. L. (2002) *The Pymol Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, LLC, San Carlos, CA
- Halenbeck, R., Kawasaki, E., Wrin, J., and Kothe, K. (1989) *Bio-Technologie* **7**, 710–715
- Kovári, J., Barabás, O., Varga, B., Békési, A., Tölgyesi, F., Fidy, J., Nagy, J., and Vértessy, B. G. (2008) *Proteins* **71**, 308–319
- Palmén, L. G., Becker, K., Bülow, L., and Kvassman, J. O. (2008) *Biochemistry* **47**, 7863–7874
- Quesada-Soriano, I., Leal, I., Casas-Solvas, J. M., Vargas-Berenguel, A., Barón, C., Ruiz-Pérez, L. M., González-Pacanowska, D., and García-Fuentes, L. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 1347–1355
- Huang, S. L., and Tsai, M. D. (1982) *Biochemistry* **21**, 951–959
- Ariza, M. E., Glaser, R., Kaumaya, P. T., Jones, C., and Williams, M. V. (2009) *J. Immunol.* **182**, 851–859
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10037–10041
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291

Discussion & Perspectives

Nos travaux sur la dUTPase d'EBV ont permis d'étudier en détail le mécanisme catalytique de cette enzyme. La ressemblance avec les dUTPases trimériques avait déjà été évoquée lors d'études des séquences (McGeoch 1990). Les similitudes structurales entre ces deux familles de dUTPases ont été mises en évidence avec l'étude de la dUTPase WT d'EBV (Tarbouriech *et al.* 2005). Les mutants de la dUTPase d'EBV étudiés ici ont révélé que l'enzyme monomérique fonctionnait selon un mécanisme catalytique proche de celui des trimériques.

Une particularité de l'enzyme d'EBV était un pont disulfure reliant les extrémités N et C-terminales. Les mesures effectuées en conditions réductrices en présence de DTT ou sur un mutant dépourvu de pont disulfure ont permis de conclure que le pont disulfure ne jouait pas de rôle dans la régulation de l'activité ou la structure de l'enzyme. La présence de ce pont serait plutôt un artéfact lié aux conditions oxydantes utilisées lors de la purification.

Le résidu Asp₁₃₁ le site actif est conservé dans un nombre de dUTPases. Les mutations de ce résidu en sérine, glutamate ou asparagine inhibent de façon importante l'activité de la dUTPase. Il avait été montré que ce résidu interagissait avec l'arginine conservée du motif V (Chan *et al.* 2004). L'absence de cette interaction dans les mutants Asp₁₃₁ de la dUTPase EBV peut être à l'origine de la désorganisation du motif V. La déstabilisation du motif V engendre alors la perte d'activité catalytique. Les études de séquence ont révélé deux groupes de dUTPases : chez certains organismes ce résidu aspartate est situé dans le motif I (EBV), chez *E. coli* ou l'humain l'aspartate se trouve dans le motif III. Nous avons donc réalisé un double mutant, rendant l'enzyme d'EBV plus ressemblante à celle d'*E. coli*, plaçant un résidu aspartate dans le motif III à la place du motif I. Le double mutant présentait une activité catalytique supérieure à celle des simples mutants du résidu Asp₁₃₁. Cette seconde mutation a permis de rétablir une partie de l'activité de l'enzyme. En effet l'aspartate du motif III a permis de restaurer en partie l'interaction avec l'arginine du motif V. L'activité n'a pu être que partiellement restaurée car les enzymes humaine ou d'*E. coli* (présentant le résidu Asp conservé dans le motif III) possèdent un résidu sérine ou thréonine formant aussi une liaison avec l'arginine du motif V. Dans le double mutant de la dUTPase d'EBV, cette interaction n'a pu être reproduite, aucun équivalent de la sérine ou thréonine n'est présent dans la dUTPase d'EBV.

Les résultats obtenus après mutation d'Asp131 sont en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude de mutants du motif V. En effet, la mutation de l'arginine conservée du motif V provoque une chute de l'activité catalytique, avec des valeurs similaires à celles obtenues pour les simples mutants d'Asp131 en sérine ou asparagine. Le positionnement du motif V au dessus du site actif pourrait être largement réalisé grâce à l'interaction entre Arg268 et Asp131.

L'étude du motif V a mis en évidence son rôle essentiel dans la catalyse. Aucune activité n'est détectable par étude cinétique chez les mutants présentant une délétion de ce motif, ou une mutation du résidu phénylalanine conservé. La structure a révélé la présence de dUTP dans le site actif du mutant entièrement délété du motif V. Cette structure est à notre connaissance la première structure de dUTPase contenant le substrat intact dans le site actif sans que l'enzyme soit mutée au niveau du site actif. Contrairement à la structure de la protéine native en présence de l'analogue de substrat, ici la molécule d'eau catalytique est visible, mais trop éloignée de l' α -phosphate pour permettre l'hydrolyse. Le motif V est essentiel à l'activité. Lorsque ce motif se rabat sur le site actif, la phénylalanine conservée se positionne au dessus du substrat. Cette organisation du motif V entraîne le rapprochement du substrat à proximité de la molécule d'eau catalytique ce qui permet l'hydrolyse.

Nos études ont révélé que le magnésium visible dans la structure du mutant délété du motif V en présence de dUTP n'était pas essentiel à l'activité de l'enzyme. L'ion joue un rôle important dans l'affinité pour le substrat, mais un très faible rôle dans l'activité catalytique.

L'ensemble de nos travaux sur la dUTPase ont contribué à obtenir un mécanisme catalytique détaillé du fonctionnement de cette enzyme. L'enzyme d'EBV fonctionne selon le même mécanisme que les dUTPases trimériques largement étudiées, permettant d'établir un modèle de fonctionnement pour ces enzymes :

- Le substrat est lié dans le site actif, composé du corps rigide de la protéine (motifs I à IV).
- Le motif V flexible vient se rabattre sur le site actif, « emprisonnant » le substrat au fond du site actif.
- L'hydrolyse est réalisée par la molécule d'eau catalytique activée par le résidu aspartate (Asp76 chez EBV). Les produits sont ensuite libérés rapidement.

La dUTPase d'EBV ressemble d'un point de vue structural et fonctionnel à ses homologues trimériques. La ressemblance avec l'enzyme de l'hôte ne permet pas de cibler le site actif de la dUTPase d'EBV en vue d'une thérapie antivirale. En effet il serait difficile d'obtenir une spécificité pour l'enzyme virale sans inhiber l'enzyme humaine.

Il avait déjà été évoqué que cette dUTPase virale engendrait une dérégulation immunitaire chez l'hôte en induisant l'expression de cytokines après activation de la voie NFκB (Waldman *et al.* 2008). Les études menées par Ariza *et al.* révèlent que la dUTPase d'EBV est reconnue par le récepteur cellulaire TLR2, et que cette reconnaissance permet l'activation de la voie NFκB (Ariza *et al.* 2009). Afin de poursuivre les travaux effectués sur la dUTPase, la caractérisation de l'interaction entre la dUTPase d'EBV et le récepteur TLR2 est envisagée. Les études viseront à obtenir le complexe formé par ces deux protéines, l'étudier d'un point de vue biochimique, biophysique et structural. Les structures des deux partenaires seuls existent mais l'étude du complexe pourra révéler avec précision les résidus impliqués dans l'interaction. Cette étude pourra à terme permettre la recherche d'inhibiteurs de cette interaction en vue d'une thérapie visant à limiter l'effet de la dUTPase sur la réponse immunitaire et donc limiter l'infection virale.

Chapitre 3 : EB2 facteur d'export des ARNm viraux

Introduction

I. Le transport nucléaire

Dans la cellule eucaryote, tout mouvement de larges molécules (environ >30 kDa) du noyau vers le cytoplasme et *vice versa* passe par les NPC (nuclear pore complexes), un très large complexe protéique composé d'une trentaine de nucléoporines formant un canal dans la membrane nucléaire. Les petites molécules (les ions, la majorité des protéines de moins de 30 kDa) peuvent diffuser librement par le NPC, mais le transport des macromolécules nécessite un mécanisme actif. Les protéines nécessitant un transport par le NPC portent un signal de localisation nucléaire (NLS) et/ou d'export nucléaire (NES) qui sera reconnu par des facteurs d'import ou d'export spécifiques. Les karyophérines (importines ou exportines) servent de transporteur au niveau du NPC, et relâchent leur cargo sous l'activité de la GTPase Ran. Le facteur d'export CRM1 appartient à cette famille. L'ancrage de ces facteurs d'export au niveau du NPC est médié par des domaines riches en phénylalanine et glycine (répétitions FG) spécifiques portées par les nucléoprotéines. (Terry *et al.* 2007).

II. Le transport des ARNm

1) Le facteur d'export des ARNm : TAP

La série d'évènements complexes résultant en l'expression des gènes requiert une étape de transport nucléaire afin d'exporter les ARNm vers le cytoplasme pour permettre leur traduction. Les ARNm ne sont pas nus dans la cellule et sont en complexe avec un assemblage protéique formant les RNP ou ribonucléoprotéines. Le transport des ARNm implique le transport de ces RNP à travers le NPC. L'export de la majorité des ARNm est effectué par le facteur d'export TAP et non les karyophérines. L'interaction entre TAP et les nucléoporines passe par des répétitions FG différentes de celles nécessaires à l'export par les karyophérines (Terry and Wente 2007) mettant en évidence une spécificité et une sélectivité permettant une régulation des fonctions d'export. Il a été montré que l'absence de TAP provoque une forte accumulation d'ARNm au niveau du noyau (Gatfield and Izaurralde 2002), indiquant son importance dans l'export d'ARNm. Le facteur TAP présente un domaine de liaison aux nucléoporines dans son domaine C-terminal (Bachi *et al.* 2000). TAP se lie aussi au motif CTE (constitutive transport élément) des ARNm du rétrovirus MPMV de manière directe par son

domaine N-terminal (Gruter *et al.* 1998) (Braun *et al.* 1999). TAP fonctionne en hétérodimère avec p15, avec lequel il interagit par son domaine central (Katahira *et al.* 1999; Bachi *et al.* 2000). La structure du domaine de liaison de TAP à l'ARNm révèle une différence structurale avec les autres facteurs liant l'ARN (Ho *et al.* 2002). Les virus ont développé divers mécanismes pour permettre l'export de leurs ARNm, via des protéines adaptatrices comme la protéine Rev du VIH qui recrute CRM1 ou des éléments tels le CTE du MPMV permettant la liaison de TAP. La différence entre TAP et les autres facteurs d'export met en évidence sa spécificité pour l'export des ARNm du MPMV, qui a pu être générée par évolution des ARNm viraux pour s'adapter à la structure de TAP. En effet l'affinité de TAP pour les ARNm ne contenant pas de CTE est faible, nécessitant l'usage de protéines intermédiaires adressant l'ARNm à TAP. Chez les eucaryotes, d'autres protéines telles que Aly/REF (RNA Export Factor), impliquées dans l'export, jouent le rôle d'adaptateur recrutant le facteur TAP.

2) La maturation des ARNm est impliquée dans les fonctions d'export

Avant l'export vers le cytoplasme, les ARNm subissent plusieurs étapes de maturation : L'ajout de la coiffe en 5', l'épissage et la polyadénylation en 3' qui surviennent de manière cotranscriptionnelle. Chacune de ces modifications influence l'export de deux manières, tout d'abord parce que si l'ARNm n'est pas traité correctement il sera dégradé, et en second lieu parce que ces étapes sont des éléments déclencheurs pour le recrutement de facteurs d'export. Chez les eucaryotes supérieurs, 95 % des ARNm proviennent de gènes munis d'introns, qui sont épissés par un complexe protéique. L'étape d'export est étroitement liée au mécanisme d'épissage puisque le complexe d'épissage sert d'élément de recrutement du facteur TAP.

Il avait été montré il y a 20 ans que les ARNm issus de gènes avec introns étaient exprimés de façon beaucoup plus efficace qu'un gène sans intron (Chung and Perry 1989), sans pour autant lier les étapes d'épissage et d'export d'un point de vue biochimique. Le lien entre ces deux étapes fut mis en évidence avec la démonstration que les ARN épissés et non épissés sont exportés via des mécanismes différents, l'épissage des pré-ARNm permet de former un complexe spécifique de nucléoprotéine utilisé pour l'export (Luo and Reed 1999). En effet lors de l'épissage des transcrits pré-ARNm, des protéines spécifiques sont déposées au niveau des jonctions exon-exon, modifiant ainsi la composition des mRNP (Le Hir *et al.* 2000 b; Custodio *et al.* 2004). Ces complexes protéiques (EJC ou exon junction complex) déposés sur l'ARNm récemment épissé sont des protéines associées aux facteurs d'épissage (SRm160, DEK et

RNPS₁), et de transport (Y₁₄ et REF/Aly dont le rôle sera décrit plus loin) ainsi que l'ARN-hélicase UAP56 (Le Hir *et al.* 2000 a; Luo *et al.* 2001). Les protéines SR telles SRm160 sont des protéines riches en résidus sérine et arginine qui jouent des rôles essentiels dans l'épissage, et particulièrement la régulation de l'épissage alternatif (Long and Caceres 2009). REF/Aly est un facteur d'export associé au pre-ARNm lors de l'assemblage du complexe d'épissage, liant directement l'épissage au transport des ARNm (Zhou *et al.* 2000). REF correspond à la protéine chez les mammifères, Aly est le nom donné à la protéine chez la drosophile, la protéine orthologue chez la levure étant Yra1p. Avec les protéines du complexe THO (impliqué dans la transcription et la biogénèse des mRNP (Rougemaille *et al.* 2008)) REF/Aly et UAP56 appartiennent au complexe TREX, «transcription/export». TREX semble être recruté lors de la transcription, liant ainsi la transcription à l'export chez la levure, dont les gènes sont essentiellement dépourvus d'introns (Strasser *et al.* 2002), mais l'association de ces protéines survient au moment de l'épissage chez les métazoaires, rendant essentielle l'étape d'épissage pour un assemblage stable de l'EJC (Figure 34) pour revue, (Reed and Cheng 2005). En effet toutes les protéines du complexe TREX sont présentes dans le complexe d'épissage, suggérant que l'épissage et le transport sont étroitement liés (Zhou *et al.* 2002).

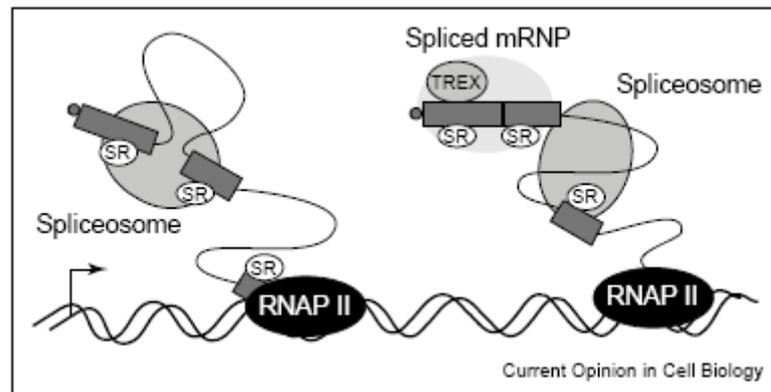


Figure 34 : (Reed and Cheng 2005) Recrutement du complexe TREX lors de l'épissage chez les métazoaires. Le recrutement complexe d'épissage (Spliceosome) a lieu lors de la transcription par l'ARN polymérase II (RNAPII) par interaction avec les protéines SR. Le complexe TREX est assemblé sur l'ARNm épissé.

L'épissage n'est pas toujours nécessaire à l'export, même si les gènes épissés semblent être exportés de manière plus efficace (Luo and Reed 1999). Chez les métazoaires il existe des gènes sans introns, exportés également via le facteur TAP (Erkmann *et al.* 2005). Il a également été montré que REF/Aly, UAP56 ainsi que des protéines du THO interagissent avec le complexe de liaison de la coiffe 5' de l'ARNm et que l'absence de cette coiffe diminue

l'efficacité de l'export des transcrits épissés (Cheng *et al.* 2006), illustrant que des processus autres que l'épissage entrent en jeu dans l'export. La longueur des ARNm issus de gènes sans introns semble également entrer en jeu dans la détermination de la voie d'export. Les ARNm très courts empruntent la voie des U snRNA (via la voie CRM1 avec des protéines adaptatrices, (Fornerod *et al.* 1997)), seuls les ARNm de plus de 300 nt étant capables de lier la protéine REF (Masuyama *et al.* 2004).

3) La protéine REF/Aly

Il a été montré que REF/Aly, une composante du complexe TREX augmente l'export des ARNm (Zhou *et al.* 2000). Le recrutement de REF sur l'ARN semble être effectué par UAP56 qui en complexe avec l'ATP a une affinité élevée pour l'ARN (Taniguchi and Ohno 2008). Des expériences effectuées chez la levure montrent que TAP interagit directement avec REF (Stutz *et al.* 2000) avec le même domaine de REF que le facteur UAP56, celui-ci pouvant être déplacé lors du recrutement de TAP sur le transcrit (Strasser and Hurt 2001). L'affinité de TAP pour l'ARN augmente en présence de REF et TAP interagit avec le complexe REF/ARNm. Lors de la liaison de TAP au complexe REF/ARN, l'ARNm est ensuite transféré sur TAP (Hautbergue *et al.* 2008). REF interagit aussi avec les ARNm de manière indépendante de l'épissage puisqu'il est également impliqué dans l'export des ARNm issus de gènes sans introns (Masuyama *et al.* 2004).

Le modèle d'export des ARNm est donc que les protéines d'export sont recrutées sur l'ARNm lors de l'épissage, et associées au complexe EJC présent aux jonctions entre les exons. Ceci permet alors la translocation à travers le pore nucléaire via une interaction entre TAP et les nucléoporines. Contrairement aux ARNm cellulaires, la majorité des ARNm viraux sont dépourvus d'intron, leur export dépend donc d'un mécanisme indépendant du processus d'épissage. Chez EBV, seuls les gènes codant pour des protéines exprimées lors de l'état latent ou les facteurs très précoces possèdent des introns. Les introns permettent l'expression de ces facteurs par le mécanisme cellulaire.

III. L'export des ARNm viraux : un mécanisme différent des ARNm cellulaires

Pour compenser l'effet des introns sur l'expression des gènes, les virus utilisent différents mécanismes pour stimuler l'expression des transcrits sans introns. Les herpesvirus

ont développé des mécanismes d'adaptation mettant en jeu des protéines membres de la famille ICP27. ICP27 de HSV1 est la protéine fondatrice de ce groupe, la plus largement étudiée et des homologues fonctionnels sont retrouvés chez les autres herpesvirus : EB2 chez EBV (Figure 35), UL69 chez le CMV ou ORF57 chez KSHV. Ces protéines ne présentent pas toutes une forte identité de séquence, mais possèdent quelques domaines conservés et remplissent la même fonction au sein de la cellule.

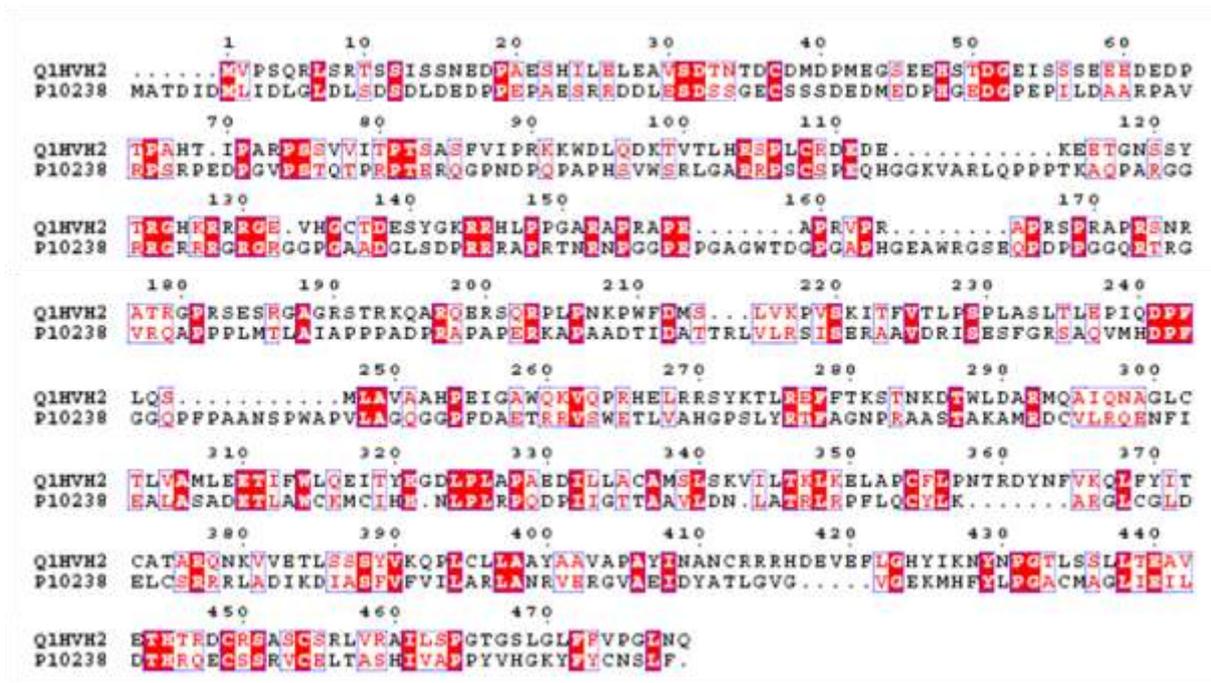


Figure 35 : Alignement entre EB2 (code Expsy QIHVH2) et ICP27 de HSV (code Expsy P10238). Ces Deux protéines possèdent 21% d'identité de séquence.

La protéine EB2 d'EBV, également appelée SM, Mta ou BMLF1, est une protéine précoce du cycle lytique. Elle est produite par épissage des gènes BMLF1 et BSLF2 à partir du promoteur pM, résultant en une protéine de 479 résidus. L'activation de ce promoteur est induite par la protéine très précoce EB1/ZEBRA via un site AP-1 situé 73 paires de bases en amont du promoteur (Urier *et al.* 1989), et par le facteur R (Buisson *et al.* 1989).

1) Les propriétés fonctionnelles d'EB2

EB2 est une protéine essentielle au virus et a un effet important sur l'expression de protéines virales et cellulaires. La délétion du gène codant pour EB2 produit des virus capables

d'infecter les cellules épithéliales, d'y établir une infection latente, d'immortaliser des lymphocytes B, mais sont incapables de produire des virions infectieux lors de l'induction de la réplication lytique (Gruffat *et al.* 2002). Les protéines correspondantes chez HSV et KSHV sont également essentielles pour la production virale (Sacks *et al.* 1985), (Han and Swaminathan 2006). La perte de fonctionnalité en l'absence d'EB2 ne peut être totalement complétée par les protéines homologues UL69 du CMV et ICP27 de HSV1 (Gruffat *et al.* 2002), (Batisse *et al.* 2005). La complémentation de la délétion d'ICP27 dans un mutant HSV par EB2 est également inefficace (Boyer *et al.* 2002). Ces protéines ont donc des mécanismes de fonctionnement différents, et n'ont pas le même effet sur l'expression des protéines (Ricci *et al.* 2009).

Des études ont montré qu'EB2 était capable d'interagir avec elle-même, probablement via un domaine situé du côté C-terminal (Silver-Key *et al.* 1998), cette interaction étant potentiellement à l'origine d'oligomérisations qui peuvent être importantes pour la fonction d'EB2.

i) EB2 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme

Les signaux de localisation et export nucléaires NLS et NES permettent d'effectuer le cheminement entre le noyau et le cytoplasme. Des domaines comportant ces séquences ont été identifiés sur la séquence d'EB2 (Figure 36). Il a été montré qu'EB2 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme (Semmes *et al.* 1998). Il avait été supposé que le transport d'EB2 était effectuée par la voie CRM1 (Boyle *et al.* 1999) grâce à une région riche en leucine (LRR) (Figure 36) retrouvée également dans les protéines Rev ou ICP27 comprise entre les résidus 218 et 236 constituant un NES (Chen *et al.* 2001). Ces résultats sont controversés car il semblerait que la localisation cellulaire d'EB2 ne soit pas dépendante de CRM1, l'inhibition de la voie CRM1 n'ayant pas d'effet inhibiteur sur les mouvements d'EB2 (Farjot *et al.* 2000). La délétion de ce motif inhibait l'activité d'EB2 sur l'export des ARN (Boyle *et al.* 1999) mais la mutation ponctuelle de résidus leucine n'avait pas d'effet sur la localisation d'EB2 (Farjot *et al.* 2000), ou au plus diminuait légèrement sa capacité à faire la navette entre les deux compartiments (Chen *et al.* 2001) contrairement à l'effet de mutations similaires observé sur Rev, alors incapable de transiter entre noyau et cytoplasme. Plus récemment des études ont révélé que cette séquence LRR n'était pas un NES, mais permettait la liaison à la protéine cellulaire REF (Hiriart *et al.* 2003 b). Cette même étude montre qu'EB2 possède un NES fonctionnant de manière indépendante de la voie CRM1 situé du côté N-terminal de la protéine entre les résidus 60 et 140, ainsi que deux séquences NLS indépendantes (Hiriart *et al.* 2003 b). Le transfert de cette

séquence à une protéine hétérologue confère à cette dernière la capacité à transiter entre les deux compartiments (Hiriart *et al.* 2003 b). La délétion de la partie N-terminale d'EB2 inhibe sa localisation cytoplasmique, alors que le domaine N-terminal d'EB2 exprimé seul conserve ses propriétés de navette (Juillard *et al.* 2009). Cependant un second NES existe au sein des résidus 1-60 de la protéine car la délétion du domaine 60-140 seul n'inhibe pas le transfert vers le cytoplasme (Juillard *et al.* 2009).

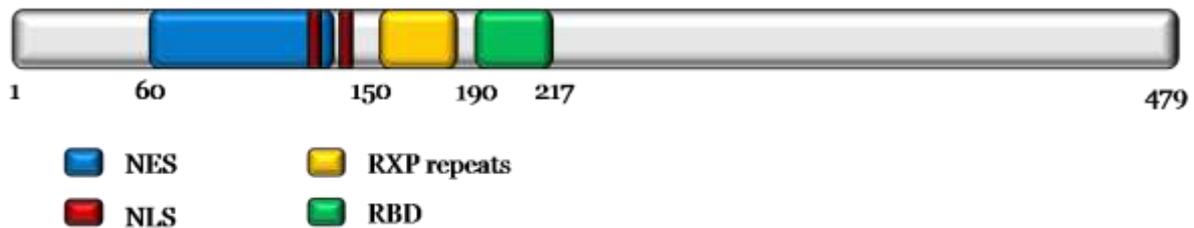


Figure 36 : Organisation des domaines fonctionnels d'EB2. NES : signal d'export nucléaire, NLS : signal de localisation nucléaire, RXP : répétitions Arginine Proline, RBD : RNA Binding Domain.

ii) EB2 agit au niveau post-transcriptionnel

Les premières études fonctionnelles sur EB2 ont suggéré que celle-ci était un facteur de transcription nucléaire, peut-être impliqué dans l'activation de la phase lytique, car capable de promouvoir l'expression du gène rapporteur codant pour l'enzyme chloramphénicol acétyl transférase (CAT), issue d'un gène sans intron placé sous le contrôle de différents promoteurs. En effet il avait été montré que dans certaines cellules (BJAB) EB1/Zebra et EB2 devaient être présents pour permettre l'expression de la CAT (Chevallier-Greco *et al.* 1986), et que EB2 activait l'expression de gènes sous le contrôle de promoteurs précoces d'andénovirus et SV40 (simian virus) (Lieberman *et al.* 1986; Wong and Levine 1986) ainsi que de promoteurs d'EBV et HSV (Lieberman *et al.* 1986). Les études suivantes ont révélé qu'EB2 n'agissait pas au niveau transcriptionnel sur l'expression des gènes en agissant sur différents promoteurs, mais au niveau posttranscriptionnel et que cette activité était dépendante du gène, permettant l'expression de la CAT et non de la β -globine (Buisson *et al.* 1989). Cette activité sur l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel est exercée au niveau de la maturation et du transport des ARNm, EB2 étant nécessaire à l'accumulation cytoplasmique des transcrits BALF2, BALF5, BSLF1, et BBLF4 (Semmes *et al.* 1998). EB2 a un effet répresseur sur l'expression de gènes avec introns, augmente la stabilité et induit l'accumulation cytoplasmique de gènes rapporteurs cibles, sans avoir d'effet direct sur l'activation de la transcription (Ruvolo *et al.* 1998). Il a ensuite été montré qu'EB2 induisait l'accumulation cytoplasmique de transcrits

ARNm non épissés surtout lorsque ceux-ci avaient une faible capacité à recruter le complexe d'épissage, suggérant un effet d'EB2 directement sur l'épissage et/ou le transport des ARNm (Buisson *et al.* 1999). L'étude sur l'activité d'EB2 sur les gènes EBV révèle une répression de l'expression de BZLF1 (codant pour EB1), gène épissé, et un effet positif sur l'expression de BMRF1, gène précoce non-épissé (Ruvolo *et al.* 1998). Ce rôle répresseur sur l'expression de gènes avec introns avait déjà été mis en évidence pour ICP27 qui a un rôle inhibiteur sur l'expression de protéines cellulaires (Hardy and Sandri-Goldin 1994). EB2 est nécessaire à la production de virions infectieux (Gruffat *et al.* 2002), car cette protéine permet l'export nucléaire des ARNm d'un grand nombre de protéines virales tardives, impliquées dans la maturation et l'assemblage de la capsid, tel que gp350 (Batisse *et al.* 2005). Cependant toutes les protéines tardives ne dépendent pas de l'expression d'EB2, comme l'ARNm codant pour gp220, qui est une forme épissée de l'ARN codant pour gp350 (Batisse *et al.* 2005). La présence d'EB2 a un effet stimulateur sur la traduction de certains ARNm d'EBV sans introns, et lorsqu'un intron est rajouté, l'export de ces transcrits est accru et l'action d'EB2 est abolie (Ricci *et al.* 2009).

On peut ainsi dire qu'EB2 est un régulateur post-transcriptionnel de l'expression des gènes cellulaires et viraux.

iii) EB2 lie directement l'ARN

Il avait été montré qu'EB2 était capable de se lier directement à différentes sondes ARN contenant l'ORF de BMLF1, indiquant qu'EB2 était certainement capable de réguler sa propre expression. Cette même étude permit de localiser le domaine d'interaction entre les résidus 125 et 204 de la protéine, contenant une région riche en arginine (Semmes *et al.* 1998). En effet les protéines connues pour lier l'ARN effectuent cette liaison grâce à des domaines riches en arginine, contenues dans des séquences peptidiques dont la conformation permet la reconnaissance de motifs nucléotidiques spécifiques (Patel 1999). Le domaine d'EB2 compris entre les résidus 152 et 182 contient de 8 répétitions arginine-proline (RXP) (Figures 35 & 36), pouvant être impliquées dans la liaison de l'ARN. Ces observations furent confirmées par des expériences d'immunoprécipitation, montrant que ce domaine d'EB2 était capable de lier différents ARNm *in vitro*, mais cette interaction est très controversée. L'absence de ce domaine n'inhibe pas les fonctions d'EB2 dans l'accumulation cytoplasmique des ARNm (Buisson *et al.* 1999) ni sa localisation nucléaire, et la liaison à l'ARN dépendait de dégradations de la protéine, exposant le domaine RXP du côté C-terminal, ce qui permet alors la liaison à

l'ARN (Ruvolo *et al.* 2001). La délétion de la séquence RXP n'inhibe pas la liaison à l'ARN (Hiriart *et al.* 2003 a).

La localisation d'une autre région de liaison à l'ARN (RBD, RNA binding domain) a été affinée au niveau des résidus 190-223, qui contiennent une séquence TRKQAR riche en résidus basiques comme l'arginine ou la lysine (Hiriart *et al.* 2003 a). Des motifs similaires ont été observés dans certaines protéines telles que Tat et Rev d'HIV, qui lient toutes les deux l'ARN. Ce domaine seul est capable de lier l'ARN sans spécificité de séquence, et sa délétion au sein de la séquence d'EB2 inhibe la liaison à l'ARN, l'activité d'EB2 sur l'export des ARNm ainsi que la capacité à produire des virions infectieux.

2) Les partenaires d'EB2

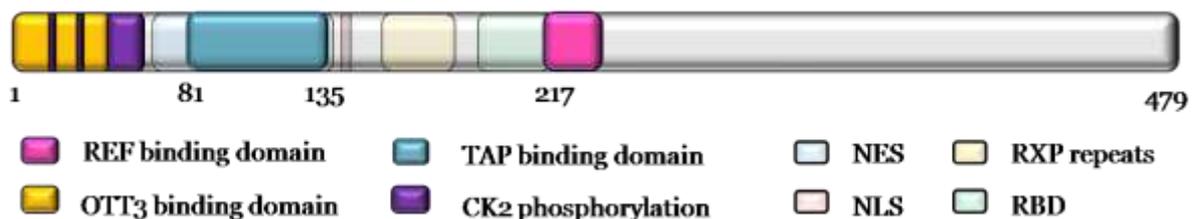


Figure 37 : Domaines d'EB2 impliqués dans la liaison aux partenaires ainsi que les sites phosphorylés par la CK2. Les domaines fonctionnels sont visibles en pâle. Le domaine de liaison à REF est une région riche en leucine.

i) REF

Comme ses homologues ICP27 (HSV) et ORF57 (KSHV), EB2 est capable de former un complexe avec le facteur cellulaire REF (Chen *et al.* 2002; Hiriart *et al.* 2003 b; Malik *et al.* 2004), REF étant le premier partenaire cellulaire identifié pour EB2. La liaison entre ces deux protéines passe via le domaine LRR d'EB2 (Figure 37) et RGG de REF. Cette interaction est essentielle à la fonction d'export des ARNm ainsi qu'à la production de virions infectieux (Hiriart *et al.* 2003 b). L'interaction est sensible à la RNase lors d'études *in vivo* (après immunoprécipitation sur des extraits de cellules transfectées par EB2) (Hiriart *et al.* 2003 b) ceci permet de supposer que la protéine possède des conformations différentes, du aux modifications post-

traductionnelles absentes lors des études *in vitro*. Il a été montré que la présence de REF n'était pas indispensable à l'export des ARNm viraux par ICP27 (Johnson *et al.* 2009). Aucune interaction n'a été mise en évidence entre REF et la protéine UL69 du CMV, cependant celle-ci se lie à l'hélicase UAP56 (une autre protéine du complexe TREX) (Lischka *et al.* 2006). UL69 ne fonctionne pas selon le même mécanisme qu'EB2 car chez le CMV l'export des ARNm n'est pas réalisé par une interaction directe entre le facteur viral et l'ARNm (Toth *et al.* 2006). La structure du domaine de liaison à l'ARN de la protéine REF murine a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et présente un repliement caractéristique de RBD (Perez-Alvarado *et al.* 2003) (Figure 38).

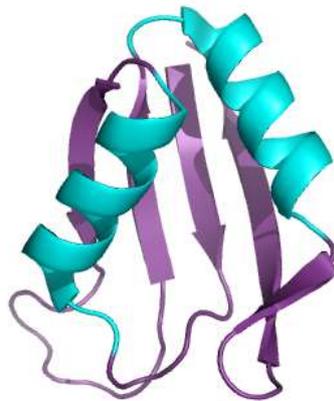


Figure 38 : Structure RMN du domaine RBD de REF ((Perez-Alvarado *et al.* 2003), code PDB 1NO8)

ii) TAP

L'étude mettant en évidence l'interaction d'EB2 avec REF indiquait qu'EB2 totale co-immunoprécipitait également avec la protéine TAP (Hiriart *et al.* 2003). Cette interaction, comme celle entre REF et EB2 était sensible à la RNase et non-abolie par la délétion de la région de liaison d'EB2 à REF. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre EB2 et TAP ne passe pas par l'interaction TAP/REF mais par l'ARN (Hiriart *et al.* 2003 b). L'interaction entre EB2 et TAP passe en grande partie par des arginines contenues dans le domaine N-terminal d'EB2 (entre les résidus 81 et 135) contenant également le NES (Figure 37), et la surexpression de ce domaine entre en compétition avec EB2 totale, inhibant ainsi l'export d'ARN non épissés via la protéine TAP (Juillard *et al.* 2009). Cette interaction est sensible au traitement à la RNase *in vivo*. La fixation artificielle d'ARN non-épissé au domaine d'interaction avec TAP d'EB2 permet leur export (Juillard *et al.* 2009) cette interaction directe semblant donc être essentielle

pour l'export correct des ARNm viraux. Les premières études montrèrent que le C-terminal d'EB2 pouvait se lier à TAP, le modèle de recrutement est donc le suivant : TAP pourrait tout d'abord être recruté sur les RNP associés à EB2 via REF, et transférés ensuite sur l'ARN, TAP établissant une interaction avec le N-terminal d'EB2 dans un deuxième temps, après un changement éventuel de conformation (Juillard *et al.* 2009).

iii) Les protéines spen et Sp110

Grace à la méthode du double hybride, les protéines spen (split end proteins) ont été identifiées comme partenaires d'EB2. Ces protéines possèdent un domaine SPOC (Spen ortholog C-terminal) en leur extrémité c-terminale ainsi que des motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM) en N-terminal. Les protéines spen jouent un rôle dans la répression de la transcription passant par des interactions protéiques passant par le domaine SPOC conservé (Ariyoshi and Schwabe 2003) (Figure 39).

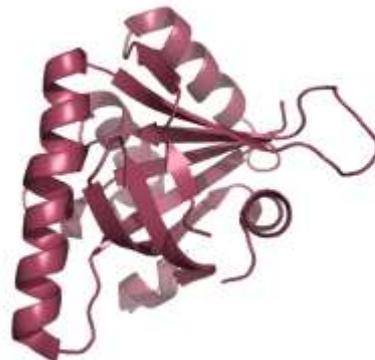


Figure 39 : Structure cristallographique du domaine SPOC de la protéine Sharp ((Ariyoshi and Schwabe 2003); code PDB 1OW1)

OTT1 et SHARP, des régulateurs transcriptionnels sont des membres de cette famille de protéines et co-purifient avec le complexe d'épissage, suggérant qu'ils pourraient réguler l'épissage (Zhou *et al.* 2002). OTT1, SHARP et OTT3, un autre membre de la famille spen interagissent avec EB2, cette interaction passant via leur domaine SPOC et le C-terminal d'EB2 dans le cas de SHARP et OTT1. Seule OTT3 interagit du côté N-terminal avec les 40 premiers résidus (Hiriart *et al.* 2005). OTT3 inhibe l'accumulation cytoplasmique d'ARNm issus d'épissage alternatif, en inhibant ce type d'épissage ou en le ciblant pour une dégradation par l'exosome. Ainsi EB2 pourrait séquestrer OTT3 et permettre l'export d'ARN issus d'épissage

non-constitutifs (Hiriart *et al.* 2005). Ces interactions d'EB2 avec les membres de la famille Spen jouent certainement un rôle dans la biologie d'EBV, qui reste à être élucidé.

Cette même technique a mis en évidence Sp110b, un variant d'épissage de la protéine Sp110, comme partenaire d'EB2 (Nicewonger *et al.* 2004). Les protéines Sp sont des composantes des corps nucléaires, exprimées essentiellement dans les leucocytes. Sp110b semble avoir un effet activateur sur EB2, en augmentant l'expression de gènes rapporteurs ainsi que la stabilité des ARNm. D'autre part l'expression de Sp110b est observée lors de la réplication lytique d'EBV, et semble être induite par EB2 (Nicewonger *et al.* 2004). Cette interaction a pu être adaptée par EBV au cours de l'évolution pour promouvoir la réplication virale en stimulant l'export des ARNm.

iv) CK2

EB2 est une phosphoprotéine (Wong and Levine 1989) qui est phosphorylée par la protéine kinase CK2 *in vitro* (Cook *et al.* 1994). La CK2 est composée de deux sous-unités, α et β formant un complexe hétérotétramérique stable avec deux sous-unités catalytiques α et deux sous-unités régulatrices β (Pinna 2002) (Figure 40).

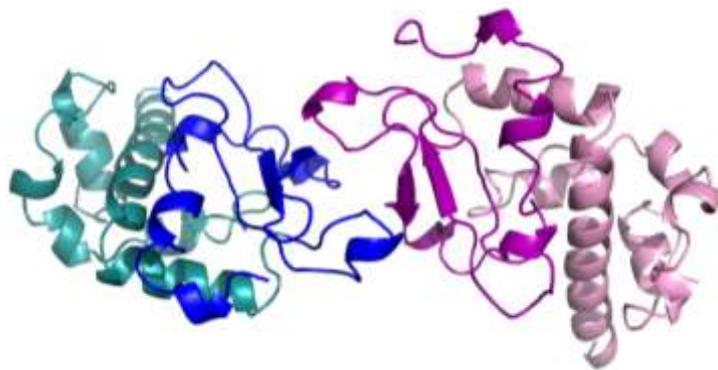


Figure 40 : Structure cristallographique du dimère de la sous-unité β de la CK2 ((Chantalat *et al.* 1999) ; code pdb 1QF8). Les deux sous-unités β sont teintées bleu et rose, les domaines en couleurs plus foncé représentent les zones de dimérisation.

Une étude plus récente révèle que la CK2 phosphoryle EB2 à plusieurs sites tous localisés au sein des 80 résidus N-terminaux (figure 37), et que la mutation de sérines phosphorylées inhibait partiellement l'accumulation cytoplasmique de certains ARNm viraux (Medina-Palazon *et al.* 2007).

La protéine ICP27 de HSV interagit avec et est phosphorylée par la CK2, l'interaction ayant lieu entre la sous-unité β et la partie C-terminale d'ICP27, la présence du domaine N-terminal ayant pour effet d'augmenter l'affinité de la liaison (Wadd *et al.* 1999). ORF57 interagit également avec CK2, la phosphorylation par le CK2 ayant vraisemblablement un effet sur l'interaction entre la protéine et certaines RNP (Malik and Clements 2004). Les domaines d'interaction entre EB2 et la CK2 ont été localisés, les deux sous-unités séparées α et β interagissent avec le côté N-terminal d'EB2, tout comme l'holoenzyme tétramérique (Medina-Palazon *et al.* 2007). Comme pour ICP27, la sous-unité β seule interagit avec le C-terminal d'EB2, α ayant une affinité plus faible pour ce domaine. Lors de l'incubation l'hétérotetramère avec le domaine C-terminal, seulement une faible proportion de la sous-unité α est retenue, révélant la possibilité qu'EB2 pourrait dissocier les deux sous-unités de la CK2 lors de son interaction avec l'unité β (Medina-Palazon *et al.* 2007).

IV. Les objectifs du travail de thèse

La protéine EB2 a un rôle essentiel dans le cycle lytique du virus d'Epstein-Barr, et est l'objet de nombreuses études menées par des équipes s'intéressant à ce virus. Une étude biochimique, biophysique et structurale sur cette protéine pourrait ainsi compléter les nombreuses études fonctionnelles réalisées au cours des vingt dernières années. Les objectifs du travail mené au cours de ma thèse étaient la caractérisation structurale de la protéine EB2 ainsi que l'étude des complexes décrits précédemment. L'étude fut menée en collaboration avec l'équipe d'Evelyne Manet à l'ENS Lyon, sur trois axes : La production et purification de constructions stables C-terminales de la protéine EB2, l'étude biochimique et biophysique de ces constructions ainsi que des essais de cristallisation. Nous avons également cherché à caractériser les interactions entre la protéine EB2 avec les partenaires cellulaires REF et la sous-unité de la CK2, interagissant toutes les deux avec la partie C-terminale d'EB2.

Par l'optimisation des méthodes de purification, des quantités importantes de la construction C-terminale de la protéine EB2 ont pu être obtenues par expression en *E. coli*. Une construction plus courte a également été purifiée, mais des cristaux n'ont pu être obtenus pour aucune de ces deux constructions. Les études biochimiques et biophysiques de ces constructions ont soulevé des questions quant à une multimérisation éventuelle de la construction C-terminale d'EB2. L'étude des complexes EB2-REF et EB2-CK2 β n'a pas mis en évidence de complexe stable en solution, mais seuls ces résultats ne permettent pas de tirer de conclusion définitive, et nécessitent des études complémentaires.

Matériels et Méthodes

I. L'étude bioinformatique préalable

Plusieurs logiciels sont utilisés pour analyser la séquence des protéines qui seront étudiés pour obtenir des informations structurales ou biochimiques.

1) Repliement

La prédiction des régions désordonnées est effectuée avec le logiciel Foldindex (Prilusky *et al.* 2005) du Weizmann Institute (<http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>) qui donne une indication de la probabilité qu'à la protéine a être repliée, grâce à un calcul basé sur un algorithme proposé par Uversky *et al.* (Uversky *et al.* 2000). Cette information sur le repliement de la protéine a pu être utilisée pour cibler les domaines qui seront étudiés par la suite, car un domaine mal replié et peu structuré s'avèrera beaucoup plus difficile à étudier.

2) Paramètres physico-chimiques

L'analyse de la séquence protéique est effectuée sur internet avec le logiciel Protparam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) afin de déterminer les paramètres théoriques tels que la masse moléculaire attendue, la composition en acides aminés, le pI ou le coefficient d'extinction molaire. Ces informations sont essentielles pour mettre au point certaines purifications ou calculer la concentration de la protéine. (Gasteiger and Hoogland 2005)

3) Structures secondaires

PSIPRED (Jones 1999) également disponible en ligne (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>), fut également utilisé pour effectuer une prédiction de structures secondaires sur EB2-Cter. Il est ainsi possible d'estimer la composition en hélices et feuillets ainsi que leur position.

4) Homologues

La recherche de protéines homologues à EB2 est effectuée grâce au programme BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), et les séquences sont alignées selon les paramètres d'un BLOSUM 62.

5) Codons rares

L'analyse de la séquence nucléotidique pour identifier la présence de codons rares dans *E. coli* est réalisée avec le logiciel Rare Ccdon Calculator (RaCC) de UCLA sur le site web <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC>.

II. Les constructions utilisées

Plusieurs constructions d'EB2 ont été utilisées pour étudier cette protéine, et sont détaillées dans le tableau 3 ci-dessous.

Nom de la construction EB2	Construction (en # de résidu)	Vecteur d'expression & Etiquette			
		pET-TEV	pPRO Ex HTb	pGEX-5X2	pET28
		6 His N-ter ✂	6 His N-ter ✂	GST N-ter ✂	6 His C-ter
Δ_{103}	104-479	✓	✓	✗	✗
Δ_{200}	201-479	✓	✓	✗	✗
Δ_{218}	219-479	✓	✓	✗	✗
EB2-Cter *	185-479	✗	✗	✓	✓
EB2-Short	219-479	✗	✗	✗	✓

Tableau 3 : Différentes constructions d'EB2 utilisées pour les tests d'expression.

✓ Constructions clonées, ✗ constructions non clonées, ✂ Signifie que l'étiquette est clivable par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) (constructions en pET-TEV ou pPROEx) ou le facteur Xa (construction en pGEX-5X2). *Les deux constructions d'EB2-Cter proviennent de l'ENS Lyon (Equipe d'Evelyne Manet). Les deux cases jaunes représentent les constructions purifiées et utilisées pour les études biochimiques et biophysiques.

Δ_{103} , Δ_{200} et Δ_{218} ont été clonés après amplification par PCR des fragments d'intérêt avec le kit High Fidelity Expand PCR System (Roche) à partir de l'ADN de la souche B95-8 d'EBV (produite au laboratoire de virologie du CHU de Grenoble). La ligation est effectuée avec le Rapid ligation kit (Roche) selon les instructions du fournisseur, les 3 séquences sont insérées dans les deux vecteurs pET TEV et pPROEx. Des bactéries compétentes *E. coli* XL1 (Stratagene) sont transformées avec 1,5 μ L de produit de ligation, étalées sur boîte contenant du LB agar supplémenté des antibiotiques adéquats et incubées sur la nuit à 37°C. 5 mL de milieu LB sont inoculés avec les colonies obtenues et cultivés sur la nuit afin d'effectuer l'extraction d'ADN plasmidique avec le Kit Miniprep (Qiagen). Après vérification par séquençage (service d'Eurofins MWG Operon), les clones adéquats sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes utilisées pour l'expression. Les constructions EB2-Cter (en fusion His et GST) proviennent d'Evelyne Manet, ENS Lyon. La construction EB2-Short fut obtenue par

mutagénèse par PCR sur la construction EB2-Cter contenue dans le vecteur pET28. Des oligonucléotides phosphorylés en 5' s'hybridant de part et d'autre de la séquence à déléter permettent d'amplifier la totalité du plasmide sans la partie que l'on souhaite retirer. Le produit de la PCR est incubé en présence de l'enzyme Dpn1 (Stratagène), qui digère l'ADN parental méthylé. La suite du clonage est effectuée comme décrit précédemment.

Les constructions de la protéine REF ont été fournies par l'ENS Lyon, la construction utilisée pour les pull-down est REF1-II, un variant d'épissage de la protéine REF murine. REF1-II est cloné dans le plasmide pGEX-CS et porte donc une étiquette GST N-terminale clivable avec la protéase TEV.

III. L'expression en système bactérien des protéines EB2 et REF

Les différentes constructions ont été exprimées en système bactérien, avec différentes souches d'*Escherichia coli*. Les tests d'expression pour Δ_{103} , Δ_{200} et Δ_{218} ont été effectués dans les souches *E. coli* BL21 pLysS et Origami, induites avec 0,25 mM IPTG à plusieurs températures (16, 25, 30 et 37°C). Les cultures furent ensuite effectuées dans ces mêmes conditions pour produire les protéines pour les purifications.

Les premiers essais pour l'expression d'EB2-Cter furent réalisés avec la souche *E. coli* BL21 pLysS puis dans la souche BL21 Rosetta. Les conditions d'expression optimales ont été obtenues en milieu LB inoculé au 1/100 avec une préculture d'*E. coli* BL21 Rosetta incubée à 37°C sous agitation sur la nuit. L'induction de l'expression est effectuée en phase de croissance exponentielle, lorsque la culture arrive à une DO \approx 0,6, avec 0,25 mM IPTG à 30°C pendant 2h-2h30. REF fut exprimée de la même manière. Les cultures sont centrifugées à 6000 rpm (rotor JLA 8.1000, Beckman) à 4°C pendant 20 min afin de récupérer le culot bactérien qui peut ensuite être conservé à -80°C.

IV. Purification de protéines en conditions natives

1) Purification d'EB2-Cter et EB2-Short (fusion His-tag)

Le culot bactérien est repris dans du tampon de lyse Tris 20mM pH 7,9, NaCl 500 mM, Imidazole 20mM (10mL pour 1 g de pâte cellulaire) complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases « Complete » (Roche), ou 0,1 mM PMSF. Les cellules sont lysées par sonication à

280W avec un Sonicateur Labsonic® P (Sartorius) par 5 pulses d'une minute, puis centrifugées 30 min à 20000 rpm (rotor JA 25.50, Beckman) à 4°C.

L'extrait cellulaire est passé sur une colonne contenant 1 mL de résine Ni-NTA (QIAGEN) par gramme de culot bactérien, préalablement équilibrée dans du tampon de lyse (10x le volume colonne). La résine est ensuite lavée avec 10 volumes de tampon de lyse, puis 10 volumes de tampon de lavage Tris 20mM pH 7,9, 1M NaCl, 50 mM Imidazole pour EB2-Cter, ou 35 mM Imidazole pour EB2-Short. La protéine d'intérêt est alors éluée avec un tampon Hepes 20 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, 300 mM pour EB2-Short avec en plus 5 % glycérol pour EB2-Cter.

La protéine éluée est concentrée par centrifugation dans des concentrateurs Amicon (Millipore) et subit ensuite une deuxième étape de purification en chromatographie d'exclusion de taille. Celle-ci permet de séparer la fraction éventuellement agrégée, de changer de tampon ainsi que de contrôler la qualité de l'échantillon. Le tampon utilisé pour la chromatographie est composé de 20 mM HEPES pH 7, 250 mM NaCl. La colonne Superdex S75 (30 ou 120 mL)(GE Healthcare) est utilisée sur un système Biologic (Biorad).

2) Purification de la protéine REF-GST

Les culots bactériens sont repris dans un tampon PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) supplémenté de 0,1 mM PMSF ou le cocktail d'inhibiteurs de protéases « Complete » de Roche. Les cellules sont ensuite lysées par sonication et centrifugées comme décrit pour EB2. L'extrait cellulaire est incubé 30 min à 4°C sous agitation dans une colonne (Pierce) avec la résine GST (Jena bioscience) équilibrée dans du PBS. La fraction non fixée est éliminée, et la résine lavée avec du PBS contenant 1 M NaCl final (10x le volume de résine). Pour obtenir la protéine REF en fusion avec l'étiquette GST, l'élué est effectué avec un tampon Tris 20 mM pH 8, GSH 10 mM, 100 mM NaCl. Pour obtenir REF sans l'étiquette GST, 7 mL de tampon PBS contenant 100 µg de protéase TEV sont ajoutés sur la résine après le lavage et laissés à incuber sur la nuit. Ceci permet le clivage directement sur la colonne, l'étiquette GST sera retenue par la résine et la protéine REF sera présente en solution, évitant ainsi l'étape de purification supplémentaire nécessaire pour éliminer la GST clivée. Le volume non fixé à la colonne est ensuite passé sur 50 µL de résine NiNTA afin d'éliminer la protéase TEV qui porte une étiquette histidine.

EB2-Cter-GST est purifiée de la même manière que REF, l'étiquette GST est clivée par le facteur Xa après l'élué, mais cette construction n'est pas utilisée par la suite.

3) La copurification d'EB2-Cter-His et REF-GST

Dans le cadre des essais d'interaction entre EB2 et REF, les deux protéines sont copurifiées sur résine GST. Des quantités équivalentes de culots bactériens issus des productions séparées d'EB2-Cter et REF sont mélangées et resuspendues dans un tampon de lyse à faible concentration en sel (50 mM NaHPO₄ pH7, 100 mM NaCl et 100 μM PMSF). Les étapes de lyse, centrifugation et incubation sur la résine sont effectuées comme décrit pour les purifications d'affinité avec l'étiquette GST. Les lavages sont réalisés avec le tampon de lyse à 100 mM NaCl afin de maintenir une faible concentration de sel pour éviter de défaire l'éventuel complexe, et l'éluion est réalisée dans le tampon de lyse avec 10 mM glutathion réduit.

V. Purifications en conditions dénaturantes et renaturation des constructions Δ200 et Δ218 d'EB2

Les constructions Δ₂₀₀ et Δ₂₁₈ en fusion avec l'étiquette hexa histidine N-terminale ne s'exprimant pas de manière soluble, une purification en conditions dénaturantes suivie d'une renaturation ont été effectuées. La purification s'effectue de la même manière que citée précédemment, avec 8 M Urée dans tous les tampons.

Les essais de renaturation ont été effectués par dilution rapide de la protéine dans une gamme de 15 solutions de renaturation présentées dans le tableau 4 de la section résultats (Selon le protocole d'Athena ES Protein refolding applications manual). En effet plusieurs facteurs physicochimiques (force ionique, pH, l'état d'oxydation etc.) peuvent être impliqués dans le repliement d'une protéine. Des aliquots de 50 μL de protéine dénaturée à 1 mg/mL sont dilués 20 fois au goutte à goutte dans chacune de ces solutions, les 15 échantillons ainsi dilués sont laissés sur la nuit à 4°C sous agitation. Elles sont ensuite centrifugées à 13000 rpm afin de séparer la protéine précipitée de la partie soluble.

Des aliquots de 20 μL de la partie soluble sont déposés sur gel SDS-PAGE 12% afin de détecter les solutions permettant la resolubilisation de la protéine.

VI. Séquençage N-terminal

L'échantillon d'EB2-Cter (10 à 20 μg) est déposé sur gel Laemmli SDS-PAGE 15% polyacrylamide. Après migration d'1 heure à 150 V, le gel est incubé dans le tampon de transfert (10 mM CAPS, pH 11, méthanol 10%) pendant 10 min. L'échantillon est transféré pendant 1h30 à

50 V sur membrane PVDF Immobilon préalablement incubée dans du méthanol 100 % pendant 1 min puis dans le tampon de transfert pendant 20 min. Après le transfert, la membrane est rincée à l'eau puis au méthanol 100 % avant d'être colorée 10 min dans un bain de bleu de coomassie R-250 0,1 %, 40 % méthanol et 1 % acide acétique. La membrane est ensuite lavée par des bains successifs dans 50 % méthanol puis rincée à l'eau. Les bandes d'intérêt sont découpées et envoyées à l'IBS où le séquençage est réalisé avec un appareil Applied Biosystems 492 d'après la méthode développée par Pehr Edman dans les années 50, où le résidu N-terminal est modifié chimiquement et retiré du peptide. Ce résidu est identifié et quantifié par chromatographie. Cinq cycles sont effectués afin d'obtenir l'identité des 5 résidus N-terminaux permettant de déterminer la séquence et d'identifier la protéine contenue dans l'échantillon.

VII. Essais d'interaction

L'étude des interactions entre EB2 et ses partenaires cellulaires a été réalisée par précipitation d'affinité, ou « pull-down ». Les interactions sont étudiées en incubant une protéine munie de son étiquette avec la résine d'affinité appropriée ainsi que la protéine partenaire. Après plusieurs lavages de la résine, un tampon d'éluion est utilisé pour décrocher les protéines fixées. La deuxième protéine d'intérêt sera co-éluée de la résine avec sa protéine partenaire si l'interaction a bien lieu. Pour valider les résultats de ces expériences il est essentiel de réaliser les contrôles prouvant que la protéine dépourvue d'étiquette n'interagit pas avec la résine de manière directe et non-spécifique et que la coélution est bien due à une interaction protéine-protéine.

Les précipitations d'affinité ont été effectuées pour étudier l'interaction entre EB2-Cter ou EB2-short et la sous-unité β de la CK2, ainsi qu'entre EB2-cter et la protéine REF (totale ou la construction 14-163). La protéine CK2 β en fusion avec l'étiquette MBP a été produite et purifiée par l'équipe de Claude Cochet au CEA Grenoble.

Environ 50 à 100 μ g de chaque protéine sont incubées dans un tube 1,5 mL (Eppendorf) avec 50 μ L de résine NiNTA (QIAGEN) dans un tampon Tris 20mM, pH 7,5, NaCl 100 mM et DTT 1 mM. Après centrifugation (30 sec à 1000 rpm) le surnageant est récupéré et la résine est lavée avec 500 μ L d'un tampon identique contenant 20 mM Imidazole, puis un deuxième lavage est effectué avec 35 mM imidazole. Les protéines fixées sont éluées avec un tampon contenant 500 mM Imidazole. Pour les essais sur résine amylose (utilisée pour l'affinité avec l'étiquette

MBP, portée par la CK2 β), les lavages sont effectués avec du PBS et l'éluion avec 10 mM maltose.

Les échantillons d'éluion contenant les deux protéines sont concentrés et étudiés par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex-S200 de 30 mL (GE Healthcare) permettant de séparer les molécules jusqu'à 600 kDa.

VIII. Etudes biophysiques et biochimiques :

1) Thermofluor

Le Thermofluor permet de mesurer la stabilité thermique de la protéine grâce à un marqueur fluorescent. Le fluorophore utilisé (Sypro Orange, Invitrogen) est sensible au milieu environnant, et lorsqu'il est en solution aqueuse, son signal est atténué (phénomène de « quenching »). Une protéine repliée n'interagit pas avec le colorant. Quand la température augmente, la protéine se délie exposant ainsi le cœur hydrophobe de la protéine. Le marqueur se lie à ces régions exposées et la fluorescence augmente (Figure 41).

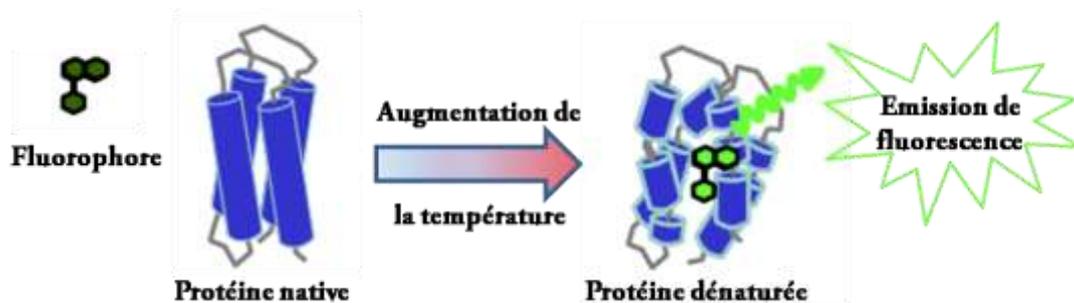


Figure 41: Schéma explicatif du principe du Thermofluor. Lors de l'augmentation de la température la protéine se dénature, exposant ainsi son cœur hydrophobe auquel le fluorophore peut alors se lier et émettre ainsi un signal fluorescent.

Les résultats sont obtenus sous forme de graphe représentant l'augmentation du signal émis par le marqueur en fonction de la température (Figure 42). On peut alors estimer d'après les courbes le T_m de la protéine, et étudier l'impact de différents tampons, ligands ou additifs sur la stabilité de la protéine. Après émission d'un signal maximum, le signal diminue car la fluorescence d'un fluorophore décroît avec la température.

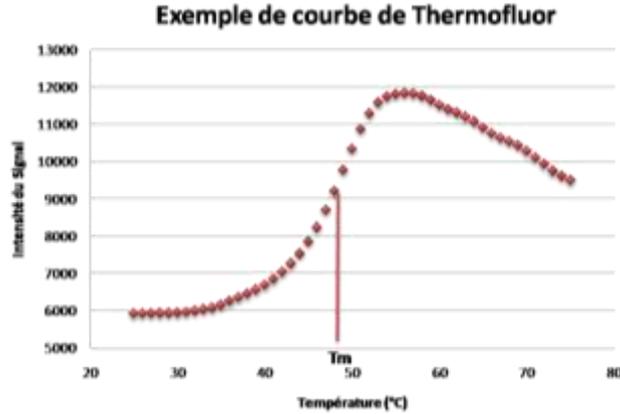


Figure 42 : Représentation graphique d'une mesure en Thermofluor. Le signal fluorescent augmente en fonction de la température qui induit le dépliement de la protéine. Le T_m est calculé graphiquement grâce au point d'inflexion de la courbe.

Ici l'essai est réalisé en plaque 96 puits (Stratagene) dans le but de cribler une gamme de 48 tampons de pH variant de 5,5 à 9 avec deux concentrations de sel différentes (100 et 500 mM NaCl) afin de déterminer les conditions optimales pour la purification d'EB2-Cter. Le Thermofluor fut réalisé par la plateforme haut débit de l'EMBL sur un appareil RTPCR (Mx3005P Q-PCR, Stratagene) avec 100 μ L d'échantillon d'EB2-Cter à une concentration de 85 μ M dans 300 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,8, Glycérol 5% (fraction d'éluion de la purification par affinité sur résine Ni-NTA), diluée 10 fois pour effectuer la mesure. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 470 et 570 nm.

2) DLS

La diffusion dynamique de lumière ou DLS est également connue sous le nom de diffusion quasi élastique de la lumière (QELS) ou spectroscopie à corrélation de photons (PCS). Elle permet d'étudier l'homogénéité d'une solution protéique et estimer la taille de la protéine d'intérêt. Cette technique utilise une source de lumière cohérente (laser) qui subit des interférences lors de sa diffusion par les molécules en solution. Un détecteur mesure l'intensité des ondes ainsi diffusée par les particules dans l'échantillon (Figure 43).

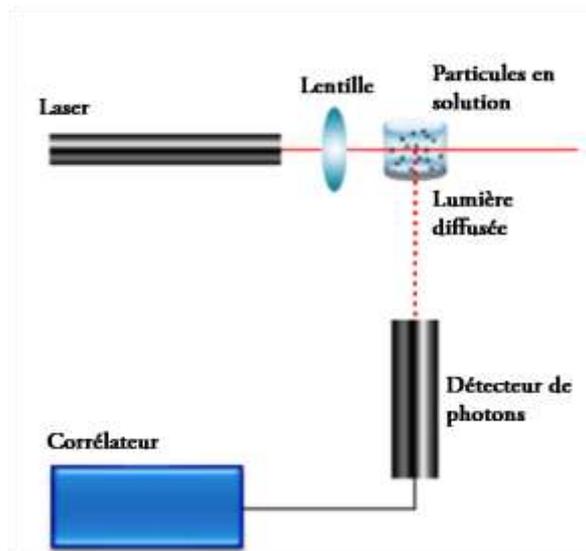


Figure 43 : Schéma de fonctionnement de la DLS (Schéma adapté du site web de Malvern)

Le mouvement Brownien des particules en solution fait varier cette intensité au cours du temps, et grâce à la fonction d'autocorrélation permet de mesurer un coefficient de diffusion. La relation entre la diffusion et la taille des particules est basée sur la théorie d'Einstein concernant le mouvement Brownien de particules sphériques. L'équation de Stokes-Einstein permet de déterminer le rayon hydrodynamique des particules observées et ensuite en assimilant la protéine à une sphère d'en déduire la masse moléculaire approximative de la protéine grâce à une calibration prédéfinie. Cependant les protéines ne sont pas toujours assimilables à des sphères, les protéines pouvant adopter des formes plus ou moins allongées ou non globulaires le rayon ainsi calculé peut différer de la taille réelle de la protéine et le calcul de la masse moléculaire reste approximatif. La mesure a été réalisée sur 25 à 45 μL d'échantillon protéique à une concentration de 0,5 à 1 mg/ml dans une cuve en quartz (Hellma) sur deux appareils, l'un Zetasizer (Malvern) et l'autre DynaPro (Protein Solutions, Wyatt Technology).

3) CD

Le dichroïsme circulaire (CD) mesure les différences d'absorption de la lumière polarisée circulaire gauche et droite. Ces différences résultent des asymétries structurales des protéines, qui vont absorber différemment les deux composantes. Le CD est donc particulièrement intéressant pour étudier le repliement d'une protéine et caractériser sa structure secondaire

globale. L'étude se fait par une mesure dans les UV lointains de 170 à 250 nm environ. Chaque type de structure secondaire (hélices α , feuilletts β , coudes ou structures aléatoires) résulte en un spectre caractéristique (Figure 44). La composition moyenne en hélices et feuilletts peut être déduite de la courbe. Le CD peut également être utilisé pour observer la dénaturation thermique de la protéine en étudiant l'évolution du signal en fonction de la température.

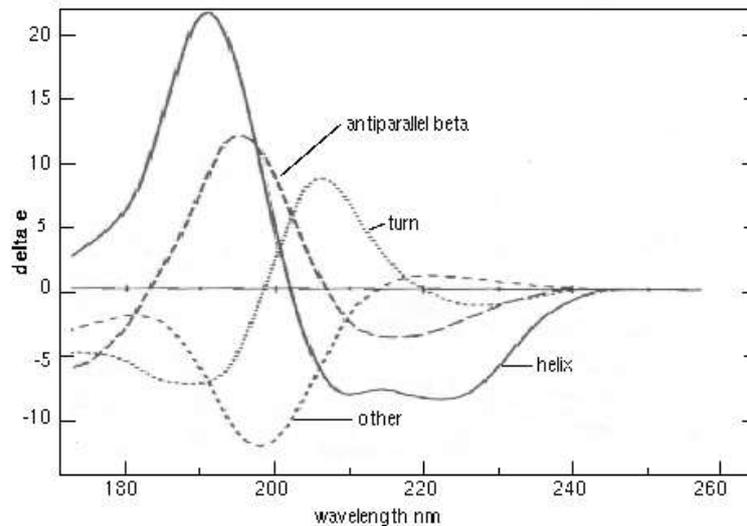


Figure 44 : Graphe des spectres correspondant aux différentes structures secondaires entre 250 et 170 nm. On voit que la courbe des hélices présente deux minima, l'un à 222 et l'autre à 208 nm, alors que les feuilletts ont un seul minimum à 218 nm et les structures aléatoires donnent peu de signal à des longueurs d'onde supérieures à 220 nm. (source: http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss-960531_21.html, adapté de (Brahms and Brahms 1980))

L'étude a été effectuée avec 200 μ L de protéine EB2-Cter ou EB2-Short à des concentrations respectives de 0,6 et 1 mg/ml après dialyse dans un tampon 50 mM NaPO₄ pH 7, 100 mM NaF avec une cuve en quartz d'1 mm de trajet optique (Hellma). La mesure est réalisée entre 250 et 200 nm avec un spectrophotomètre JASCO J-810 équipé d'un système de thermostation à effet Peltier et les données visualisées avec le logiciel Spectra Manager. Les spectres obtenus (en mdeg) sont convertis en ellipticité molaire par résidu ($[\Theta]$ en deg.cm².dmol⁻¹/résidu) grâce à l'équation suivante : $[\Theta] = 0.1 \cdot \text{SignalCD} / n \cdot C \cdot l$. (n est le nombre de résidus, C la concentration de la protéine en M⁻¹ et l la longueur du trajet optique de la cuve en cm). La valeur à 222 nm permet d'estimer la composition en hélices α car une ellipticité molaire de -35000 deg.cm².dmol⁻¹/résidu à cette longueur d'onde correspond à 100 % d'hélices α . Le pourcentage d'hélices se calcule donc ainsi : $\% \alpha = ([\Theta]_{222\text{nm}} / 35000) \cdot 100$. Différentes méthodes ont été utilisées pour analyser les courbes totales, afin de déterminer la composition en hélices

α , feuillets β , coudes ou structures aléatoires : K2D2 et K2D disponibles sur le web (http://www.ogic.ca/projects/k2d2/k2d2_set1.pl et <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>) et le « self consistent method » du logiciel DicroProt. L'utilisation de plusieurs programmes permet d'évaluer la validité des résultats obtenus car ils sont basés sur des algorithmes différents et ne fournissent donc pas tous les mêmes résultats.

4) SEC-MALLS-RI

Il s'agit d'une méthode permettant de déterminer la masse moléculaire d'une particule ainsi que son rayon hydrodynamique grâce à la combinaison de plusieurs techniques : la chromatographie d'exclusion de taille (SEC), la diffusion de lumière à plusieurs angles (MALLS) ainsi que la réfractométrie (RI) (Figure 45). L'homogénéité et la polydispersité des échantillons peuvent aussi être évaluées par cette technique. L'avantage réside également en l'utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille qui permet d'éliminer d'éventuels agrégats, et la possibilité de déterminer la masse molaire sans faire d'hypothèses sur la forme comme dans les cas de la DLS.

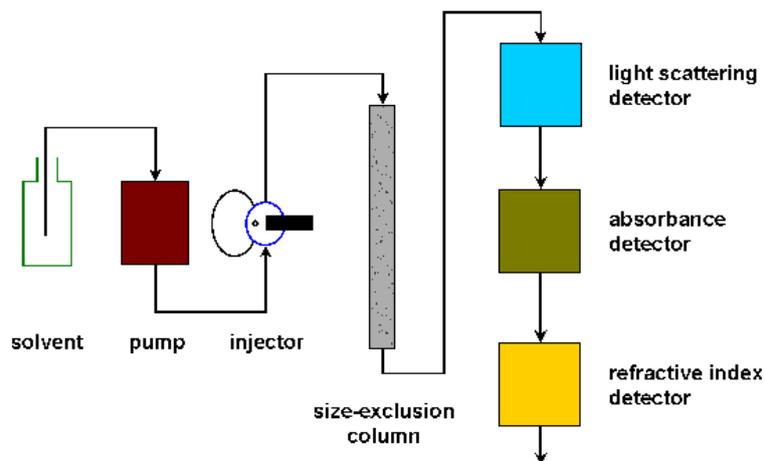


Figure 45 : Représentation schématique du dispositif SEC-MALLS-RI, illustrant le passage de l'échantillon dans la colonne d'exclusion de taille, puis par les détecteurs de diffusion de lumière, d'absorbance et de réfractométrie.

Un système HPLC avec une pompe permet d'injecter l'échantillon dans le système et assurer un flux de tampon. L'échantillon passe par une colonne d'exclusion de taille et à la sortie de la colonne, un détecteur DAWN-EOS (Wyatt technology) mesure la diffusion de la lumière à 18 angles et l'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre différentiel RI2000b (Schambeck). La concentration de la protéine est calculée par le changement de l'indice de

réfraction, l'intensité du signal diffusé correspond au produit de la concentration * masse molaire. Les données sont analysées avec le logiciel Astra V (Wyatt technology).

50 µL d'EB2-Short à 1,5 mg/ml ont été injectés sur une colonne Shodex (Protein Pak, Waters) et l'expérience fut réalisée dans un tampon 20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl.

IX. Essais de cristallogénèse

Le criblage de conditions prometteuses pour la cristallisation a été effectué sur EB2-Cter et EB2-short à des concentrations respectives de 4,7 mg/ml et 2,8 mg/ml dans un tampon Hepes 20 mM pH 7, 200 mM NaCl, avec et sans 10 mM DTT. 576 conditions (Crystal Screen I, II, Lite & PEG/Ion, IndexScreen, MembFac, Natrix, Quick Screen et Grid Screens Ammonium Sulfate, Sodium Malonate PEG 6K, PEG/LiCl & MPD, Hampton Research, ainsi que les screens « homemade » Sodium Formate et Mme) ont été criblées en gouttes assises de 100 + 100 nL dans des plaques 96 puits incubées à 20°C (Crystal Quick, Greiner) grâce au robot Cartesian PixSys 4200 (Genomic Solutions) de la plateforme de cristallisation haut débit de l'EMBL (Htx lab). Les conditions prometteuses ont été reproduites manuellement en gouttes suspendues 1 + 1 µL dans des plaques 24 puits (Hampton Research) contenant 1 mL de solution réservoir incubées à 20°C. Le robot RoboDesign Minstrel III permet de réaliser des photos des gouttes régulièrement sur une période de 3 mois permettant d'observer et comparer leur évolution au cours du temps.

Résultats

I. L'étude bioinformatique préalable

La prédiction de repliement effectuée sur la séquence d'EB2 (Figure 46) révèle clairement que la partie N-terminale de la protéine serait très peu structurée (en rouge), contrastant avec la moitié C-terminale qui présente un index de repliement positif (indiqué en vert). Cette prédiction a permis de cibler les domaines de la protéine les plus favorables en vue d'une étude structurale, car la cristallisation des régions désordonnées paraît aléatoire. Pour cette raison, les travaux ont porté sur différentes constructions de la région C-terminale.

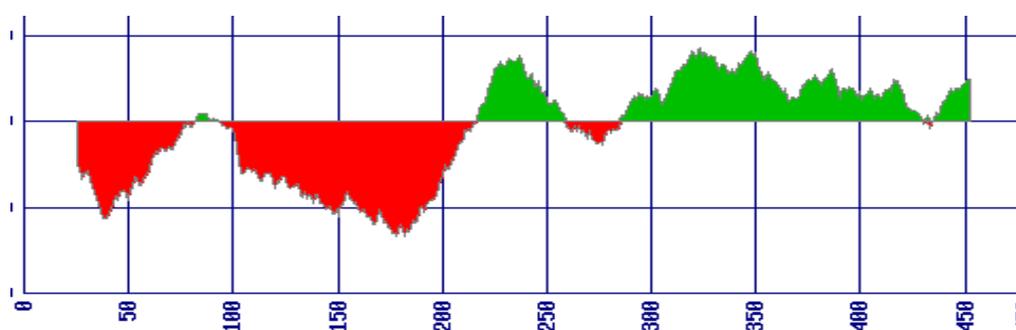


Figure 46 : Prédiction de repliement de la protéine EB2 par le logiciel FoldIndex de l'Institut Weizmann. Les domaines non structurés sont indiqués en rouge, les domaines structurés en vert.

La prédiction de structures secondaires également effectuée sur la séquence de la protéine EB2 avec le logiciel PSIPRED révèle que le domaine N-terminal contient peu de structures secondaires, en accord avec la prédiction de FoldIndex (Figure 47). Le domaine C-terminal présente essentiellement des hélices α (environ 52 %), et une très faible proportion de feuillets β (5 %), le reste comptant pour des structures aléatoires. En accord avec la prédiction de repliement, le domaine C-terminal semble être structuré et donc un projet d'étude intéressant. Les études effectuées au cours de ma thèse ont donc porté sur différentes constructions de la partie C-terminale d'EB2.

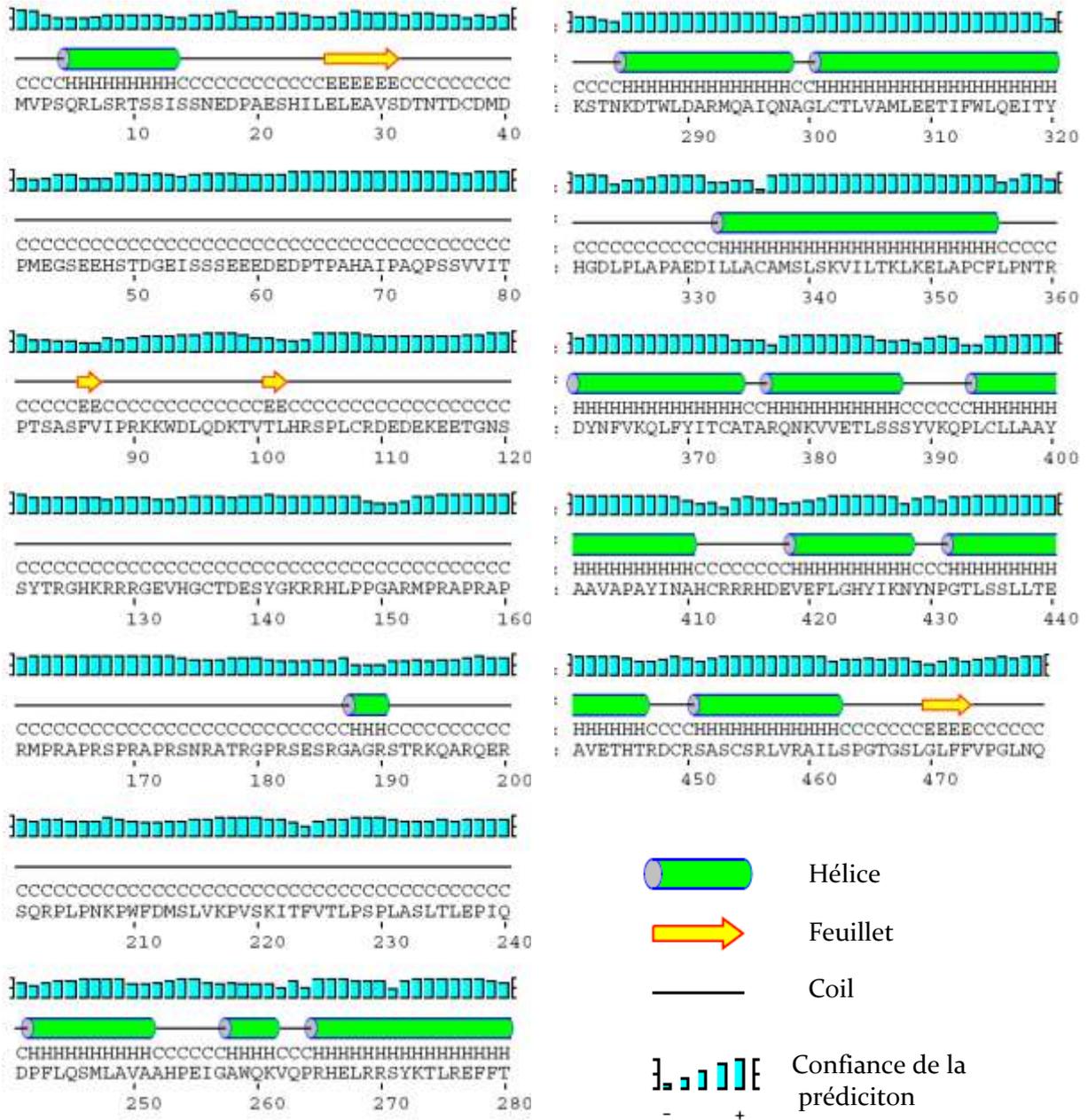


Figure 47 : Prédiction de structure secondaire de la protéine EB2 réalisée avec le logiciel PsiPred. Les cylindres verts représentent les hélices α , les flèches jaunes sont les feuillet β . Les barres bleues représentent l'indice de confiance de la prédiction.

II. Les constructions $\Delta 104$, $\Delta 201$ et $\Delta 219$ d'EB2

1) Essais d'expression en système bactérien

Les premiers essais de production d'EB2 ont porté sur plusieurs constructions C-terminales de la protéine EB2, résumées dans le tableau 3 du chapitre matériels et méthodes. Les essais d'expression ont révélé que la construction plus longue $\Delta 104$ n'était pas exprimée en système bactérien indépendamment des différentes conditions testées (température, souche bactérienne ou concentration d'IPTG). Les 2 autres constructions ($\Delta 201$ et $\Delta 219$) s'exprimaient de manière insoluble, formant des corps d'inclusion même lors d'induction douce à faible concentration d'IPTG et basse température.

2) La purification en conditions dénaturantes et renaturation

La purification en conditions dénaturantes en présence de 8 M Urée a permis d'obtenir des protéines pures pour les constructions $\Delta 201$ et $\Delta 219$ (Figure 48).

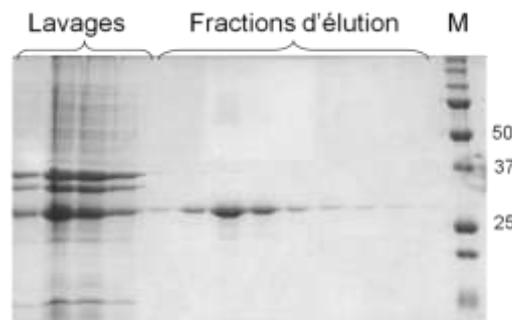


Figure 48 : Purification d'EB2 $\Delta 219$ en conditions dénaturantes 8M Urée. Gel SDS PAGE 15 % Acrylamide des fractions de lavage et d'élution de la résine NiNTA.

Les essais de renaturation avec la gamme de 15 solutions ont montré que seule la solution 11 (composition détaillée dans le tableau 4) a permis de resolubiliser la protéine $\Delta 219$ (Figure 49). Le même essai a été réalisé sur la construction $\Delta 201$, et 2 solutions permettent sa resolubilisation. Il s'agit des solutions 3 et 14. Les solutions 6 et 10 permettent de resolubiliser seulement une très faible quantité de la protéine. Malgré la forte proportion de cystéines (8) au sein de la séquence, les solutions contenant un mélange d'agents oxydants et réducteurs (GSH/GSSH) ne favorisent pas le repliement correct de la protéine $\Delta 219$. La forte concentration en triton X100 contenue dans la plupart des solutions efficaces ne rendent pas cette approche

très favorable pour poursuivre avec une étude structurale, car le triton forme des micelles qui sont difficiles à éliminer. D'autres méthodes ont été privilégiées afin de poursuivre l'étude portant sur EB2.

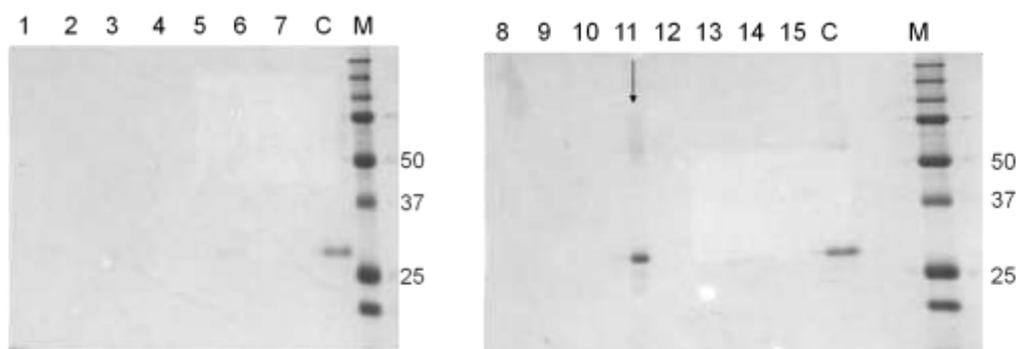


Figure 49 : Exemple d'essais de renaturation de la construction $\Delta 219$ avec les 15 solutions. Gel SDS PAGE 15 % des fractions solubles alicots de protéine diluée dans la solution de renaturation. Les puits 1 à 15 représentent les 15 solutions, le puits C est le contrôle avec le tampon de dénaturation, M le marqueur de poids moléculaire. La flèche piste 11 indique la solution efficace pour la resolubilisation.

Numéro de solution		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Composition (mM)																
MES pH6	50	+	+	+	+	+	+	+								
Tris pH8.5	50								+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	9,6	+	+	+					+	+	+	+				
NaCl	240				+	+	+	+					+	+	+	+
KCl	0,4	+	+	+					+	+	+	+				
KCl	10				+	+	+	+					+	+	+	+
MgCl ₂	2		+		+			+	+		+				+	+
CaCl ₂	2		+		+			+	+		+				+	+
Guanidine	750			+		+		+		+	+			+	+	
Arginine	500		+		+		+			+	+			+	+	
Triton X100 (0,50%)				+	+		+		+			+		+	+	
PEG 3350 (50%)			+	+			+	+	+	+			+		+	
EDTA	1			+		+	+			+		+	+	+		
Sucrose	400			+		+	+		+		+			+		
DTT	1	+		+		+		+		+		+		+		+
GSH (red)	1		+		+		+		+		+		+		+	
GSSH (ox)	0,1		+		+		+		+		+		+		+	

Tableau 4 : Composition des 15 solutions de renaturation utilisées pour la dilution rapide des constructions $\Delta 201$ et $\Delta 219$ purifiées en conditions dénaturantes. Les solutions ayant permis la resolubilisation d'une quantité importante de protéine sont encadrées en rouge.

III. L'optimisation des conditions d'expression et de purification d'EB2-Cter

Les premiers essais d'expression et de purification sur les constructions EB2-Cter en fusion Histidine ou GST (constructions de l'ENS Lyon) ont résulté en l'obtention d'une protéine très instable, peu pure et ayant tendance à précipiter dès l'élution de la résine d'affinité (Figure 50).

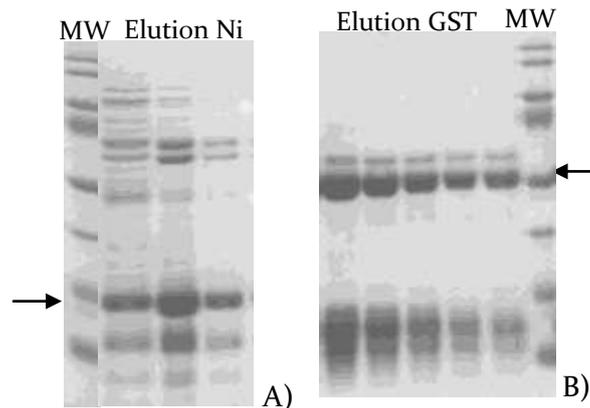


Figure 50 : Profils d'élution d'EB2-Cter exprimées en système bactérien avec la souche pLysS. A) EB2-Cter en fusion Histidine et B) EB2-Cter en fusion GST. Dans les deux cas les gels sont gels SDS PAGE 12% acrylamide, la flèche représente la protéine d'intérêt, et on voit beaucoup de bandes supplémentaires indiquant une contamination, une dégradation ou une troncation éventuelle lors de la traduction.

L'étude de la séquence nucléotidique grâce au serveur Rare Codon Calculator (RaCC) de UCLA (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC>) révéla une très forte quantité de codons rares en *E. coli* (13 codons rares codant pour des arginine, 6 pour des leucine, 3 pour des proline et 2 pour des isoleucine, répartis sur l'ensemble de la séquence). L'utilisation de la souche Rosetta qui possède les ARNt permettant la traduction des codons rares, ainsi que l'utilisation d'un tampon de lyse à haute concentration en sel (500 mM NaCl) ont résolu en grande partie les problèmes d'expression et de stabilité de la protéine. Ainsi l'on peut obtenir environ 3 mg d'EB2-Cter-His par gramme de culot bactérien utilisé pour la purification.

Seule la construction en fusion avec l'étiquette histidine a été étudiée par la suite car celle-ci semblait plus stable, même si la protéine éluée précipite après quelques heures et l'analyse sur gel SDS-PAGE révèle une la présence importante de bandes de poids moléculaire inférieur à celui de la protéine.

IV. Le séquençage N-terminal

Quelques heures après la purification d'EB2-Cter (munie d'une étiquette hexa-histidine N-terminale) plusieurs bandes sont visibles sur gel SDS-PAGE. Ces bandes supplémentaires s'intensifient au cours du temps, indiquant certainement une dégradation spontanée d'EB2-Cter. Les produits de cette dégradation ont été identifiés par séquençage N-terminal d'un échantillon laissé 1 mois à 4°C afin d'avoir des quantités importantes de protéine dégradée (Figure 51).

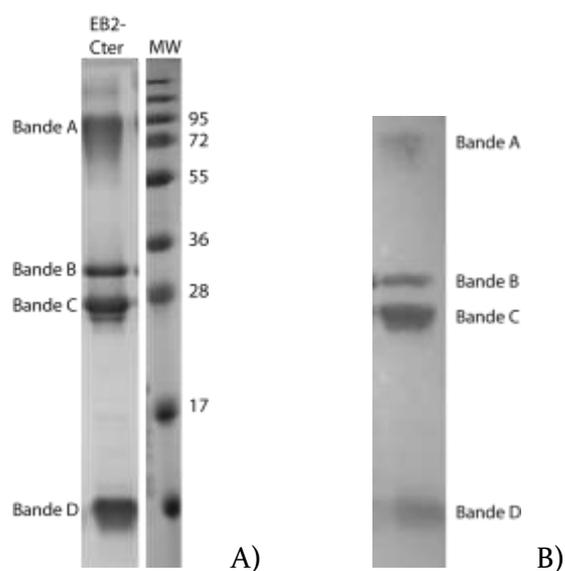


Figure 51 : A) Echantillon d'EB2-Cter dégradé après plusieurs semaines à 4°C sur Gel SDS PAGE 15 %. La bande B située entre 28 et 36 kDa correspond au poids moléculaire d'EB2-Cter non dégradée obtenue après la purification. **B) Transfert sur membrane de PVDF** de l'échantillon pour l'analyse des 4 bandes par séquençage N-terminal.

Les séquences obtenues par séquençage N-terminal sont : (illustrées dans la figure 52)

Bande A (située à environ 90 kDa) : Dans cette fraction, on retrouve deux séquences. Un peptide commence par ASMTG et correspond à EB2-Cter sans la méthionine N-terminale. Une faible proportion de la séquence SLVKP, correspondant à un fragment dégradé d'EB2-Cter (résidu 214 d'EB2) est aussi identifiée. Cette bande à haut poids moléculaire n'est donc pas un contaminant, et correspond essentiellement à EB2-Cter dépourvue de la méthionine N-terminale, et d'un fragment plus petit commençant au résidu 214. Ces protéines sont certainement partiellement agrégées et même lors de l'incubation à 95°C en présence de SDS et β -mercaptoéthanol avant le dépôt sur gel, les complexes ne sont pas dénaturés.

Bande B (située à 32 kDa) : La séquence retrouvée est ASMTG, la bande B à 32kDa correspond donc à EB2-Cter entière (dépourvue de la méthionine N-terminale).

Bande C (située à 27 kDa) : La séquence déterminée est SKITF correspondant à la séquence à partir du résidu 220 d'EB2 (il manque les 49 résidus N-terminaux de la construction EB2-Cter)

Bande D (située aux alentours de 10 kDa) : ASMTG, la séquence N-terminale d'EB2-Cter complète est également retrouvée dans cette bande à faible poids moléculaire qui correspond donc à une dégradation C-terminale ou une coupure protéasique.



Figure 52 : Séquence protéique de la construction EB2-Cter théorique, avec en italique les résidus issus du clonage (aux extrémités N et C terminales), en lettres colorées les résidus identifiés par séquençage N-terminal avec la bande correspondante encadrée au dessus. L'encadré violet représente la zone d'interaction avec l'ARN et le fond vert avec la protéine REF. La flèche noire représente le début de la construction EB2-Short utilisée ensuite (cette construction contient également les 14 résidus issus du clonage, en italique).

Les résultats de ce séquençage ont permis de cibler une nouvelle construction d'EB2, issue d'une dégradation N-terminale d'EB2-Cter au cours de la purification. Celle-ci est clonée dans le même vecteur qu'EB2-Cter avec une étiquette Histidine non clivable C-terminale. L'expression de ce fragment (nommé EB2-Short) de la même manière qu'EB2-Cter produit une protéine de 31,5 kDa (poids moléculaire théorique calculé avec ProtParam).

V. Etude de la protéine EB2-Cter en Thermofluor

Le criblage d'une gamme de 22 tampons par la méthode du Thermofluor a mis en évidence les conditions de tampon optimales pour la stabilité d'EB2-Cter. En effet on voit que le T_m varie de 39 à 49°C selon les conditions (Figure 53 et 54). La concentration en sel n'influe pas sur la stabilité de la protéine, car les valeurs de T_m obtenues pour chaque tampon à haut et bas sel sont très proches (Figure 53). EB2-Cter est plus stable dans des tampons à pH neutre situé entre 6,6 et 7,5.

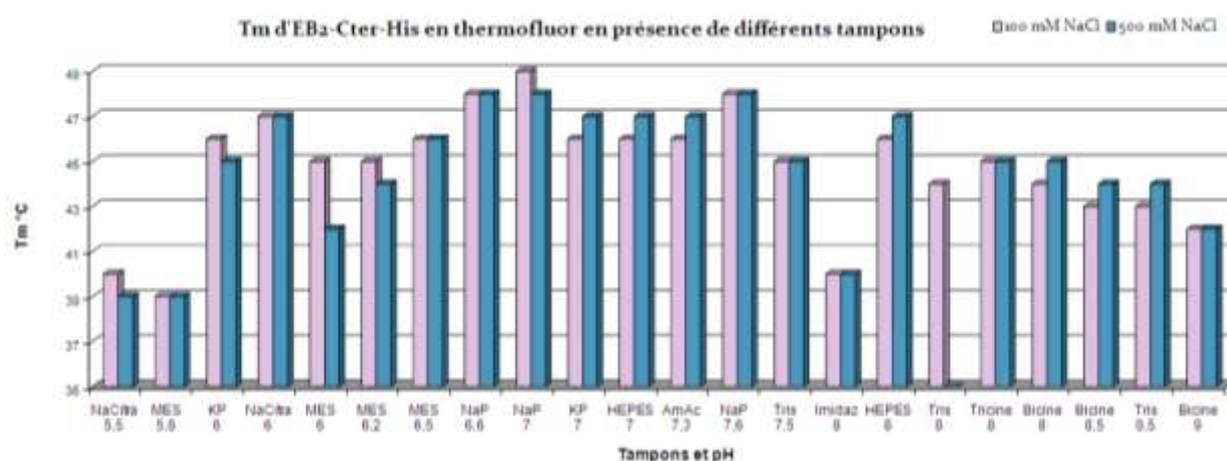


Figure 53 : Températures de fusion d'EB2-Cter dans les différentes conditions obtenues par Thermofluor. Le T_m est représenté par un histogramme en fonction du tampon utilisé en présence de 100 ou 500 mM NaCl.

En présence de tampon sodium phosphate pH 7, EB2-Cter présente la plus grande stabilité avec un T_m de 49°C (Figures 53 & 54). En présence d'imidazole pH 8 le T_m est très faible (40°C), il faut donc chercher à éliminer ce composé rapidement après l'éluion de la résine Ni-NTA. Pour des raisons pratiques, le tampon HEPES pH 7 ($T_m = 47^\circ\text{C}$) a été privilégié pour les purifications car lors d'études cristallographiques le tampon phosphate a tendance à former des cristaux en présence de cations, rendant difficile le criblage des conditions pour l'obtention de cristaux protéiques.

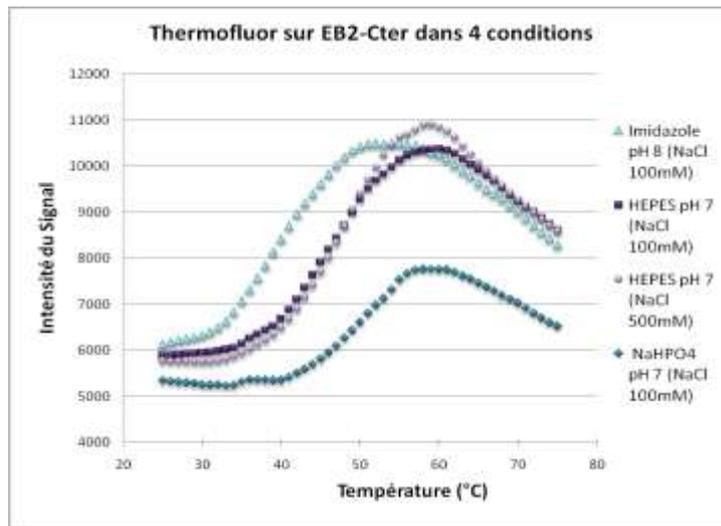


Figure 54 : Exemple de 4 courbes obtenues en Thermofluor. En présence d'imidazole le T_m est de 41°C contre 47°C pour le tampon Hepes pH 7 avec 100 ou 500 mM NaCl, et 49°C en présence de tampon sodium phosphate pH 7.

VI. Le contrôle qualité des purifications d'EB2-Cter et EB2-short

1) Les chromatographies d'exclusion de taille

Les chromatographies d'exclusion de taille montrent que les protéines EB2-Cter et EB2-Short sont pures et ne sont pas agrégées et sont collectées en sortie de colonne à des volumes respectifs de 58 et 71 mL (Figure 55 A et B), après le volume mort qui est d'environ 40 mL pour cette colonne de 120 mL. Pour EB2-Cter, le volume est plus faible que celui attendu pour une protéine de 35 kDa, et la différence de 13 mL avec le volume d'exclusion d'EB2-Short est plus important qu'attendu pour deux protéines de masses moléculaires respectives de 31 et 35 kDa. Les pics uniques montrent que les deux constructions sont pures, mais le profil d'EB2-Cter pose des questions quant à l'état d'oligomérisation ou d'agrégation éventuelle de la protéine. Les gels SDS-PAGE des fractions collectées après la chromatographie montrent que les protéines sont très pures, un contaminant de plus haut poids moléculaire a pu être éliminé de l'échantillon d'EB2-Short (Figure 55 B, fraction 33). Les protéines ne sont pas dégradées et migrent aux poids moléculaires attendus.

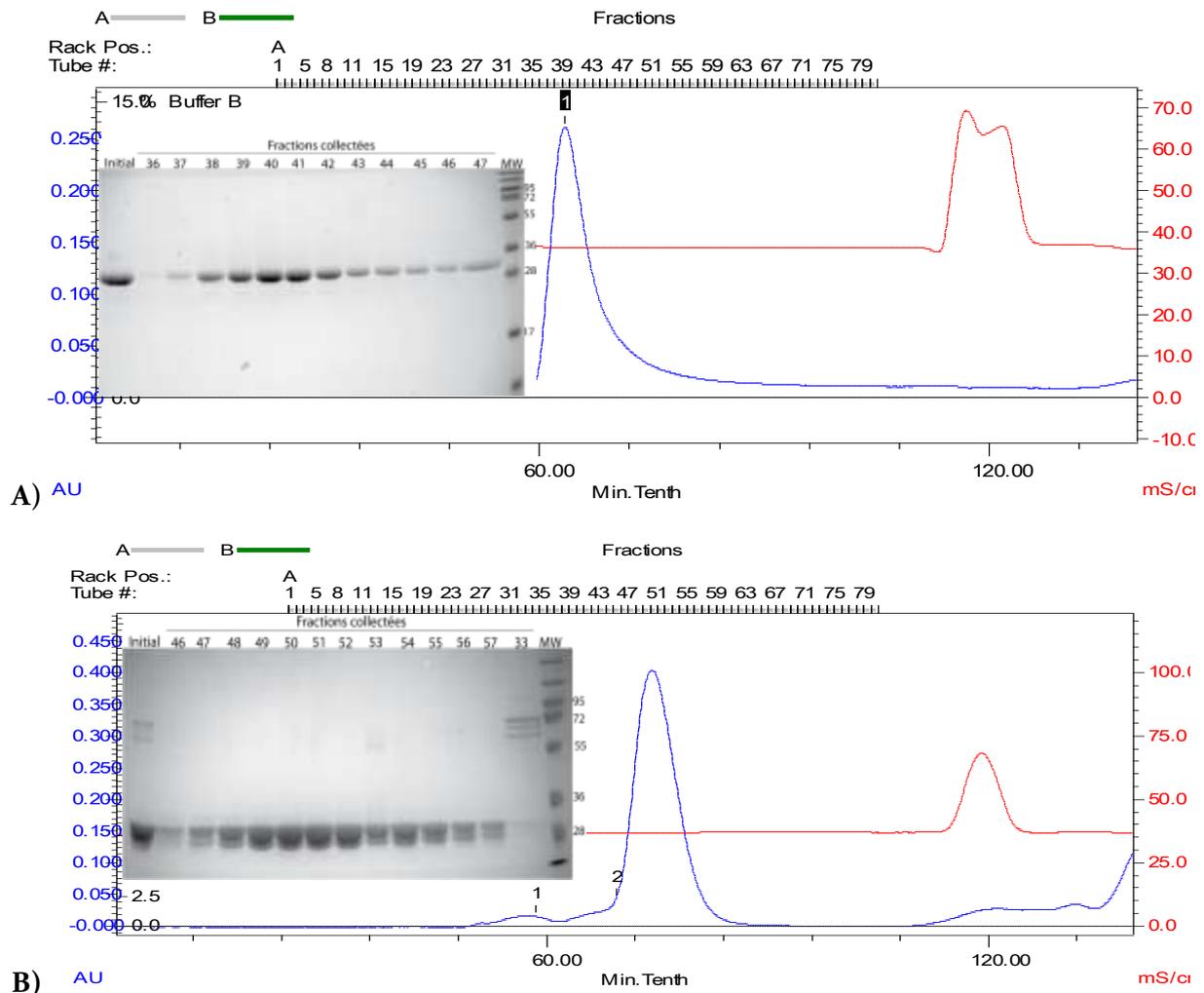


Figure 55 : Profils de chromatographie d'exclusion de taille sur S75 avec les gels SDS-PAGE de contrôle des fractions collectées. A) EB2-Cter et B) EB2-Short. La chromatographie est effectuée sur une colonne Superdex75 High load 120 mL dans un tampon Hepes 20 mM NaCl 250 mM pH 7 après injection de 5 mL d'échantillon obtenu après élution de la résine NiNTA, les gels sont des gels SDS-PAGE 15 et 12 % Acrylamide respectivement.

Afin d'être certains que la protéine EB2-Cter n'est pas agrégée car le volume d'élution est faible et proche du volume mort sur la colonne S75 qui ne peut séparer des protéines de masse supérieure à 75 kDa, une autre chromatographie d'exclusion de taille fut réalisée sur une colonne S200 permettant de séparer des molécules jusqu'à 600 kDa. Une calibration de la colonne a également été effectuée avec un échantillon contenant du bleu dextran sortant de la colonne dans le volume mort ainsi que la BSA (67 kDa), les deux profils ont été superposés pour une meilleure comparaison (Figure 56). Le premier pic de la courbe verte est le bleu dextran, le deuxième la BSA. Ici, il est bien clair qu'EB2 est élué de la colonne bien après le

volume mort, la protéine n'est donc pas agrégée. On constate que le volume d'éluion d'EB2-Cter est supérieur à celui de la BSA indiquant en théorie une masse moléculaire plus faible ce volume qui correspondrait plutôt à une protéine de 35 kDa, ou bien une forme différente de la protéine retardant son éluion de la colonne.

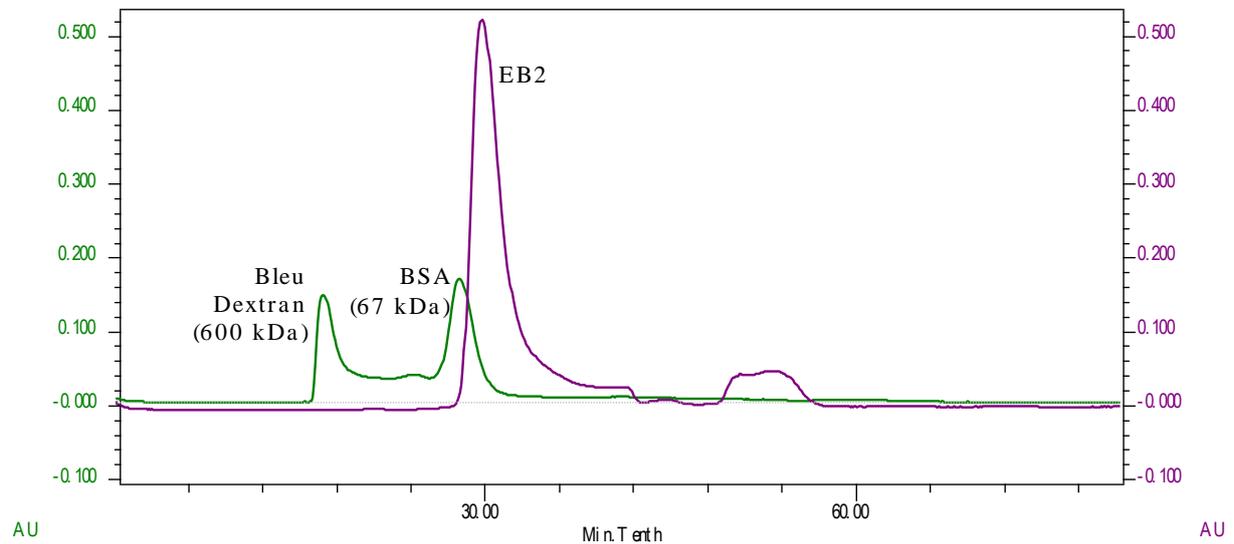


Figure 56 : Chromatographie d'exclusion de taille d'EB2-Cter sur S200. La courbe violette correspond à EB2-Cter, la courbe verte la calibration de la colonne avec du bleu Dextran et la BSA.

VII. La caractérisation biophysique des constructions Cter et Short d'EB2

1) CD d'EB2-Cter et EB2-Short

Grâce à la mesure en CD, le pourcentage d'hélices α peut être estimé pour chacune des deux constructions. Tout d'abord, la forme de la courbe permet de dire que les deux protéines contiennent des hélices α et sont structurées car on obtient un fort signal négatif à 222 nm (Figure 57). Dans les conditions expérimentales, les ellipticités obtenues à 222 nm sont de $-14248 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}/\text{résidu}$ pour EB2-Cter et $-12286 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}/\text{résidu}$ pour EB2-Short. Ces valeurs permettent d'estimer qu'EB2-Cter contient environ 40% d'hélices et EB2-Short 35%.

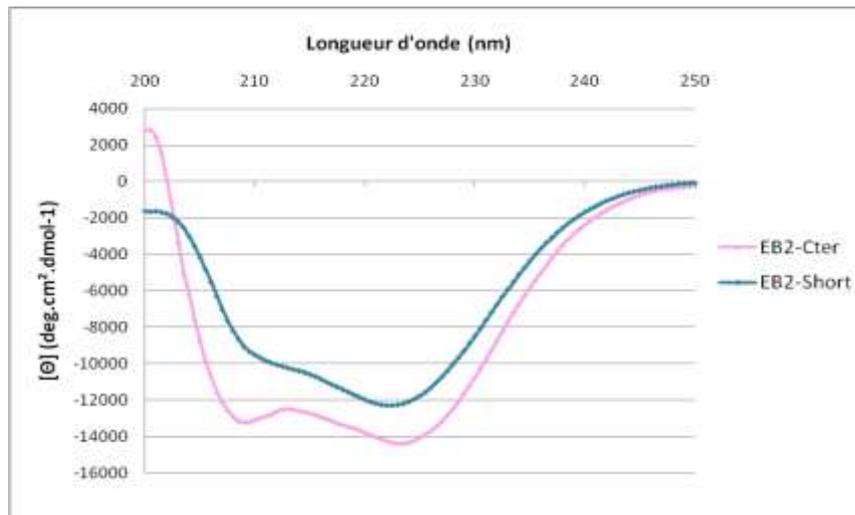


Figure 57 : Spectres CD de 200 à 250 nm d'EB2-Cter et EB2-Short. Dans les deux cas, l'allure de la courbe ressemble à celle d'une structure composée essentiellement d'hélices α , présentant un signal maximal à 222nm.

La différence observée dans la composition en hélices α des deux constructions n'est pas significative car une erreur sur le calcul de la concentration de protéine due à une fraction partiellement agrégée ou une légère précipitation avant la mesure induirait une erreur dans le calcul de l'ellipticité et donc dans l'estimation de la composition en hélices. On ne peut donc pas tirer de conclusion quant à la structure secondaire du domaine tronqué de la construction EB2-Short, et les deux constructions semblent autant repliées l'une que l'autre.

L'analyse des courbes totales par plusieurs algorithmes permet d'estimer la composition des protéines en hélices et feuillets (Tableau 5). L'ensemble des valeurs semble prédire en moyenne 43 % d'hélices α et 15 % de feuillets β pour EB2-Cter, et 30 % d'hélices α et 16 % de feuillets β pour EB2-Short. Les pourcentages prédits pour la composition en hélices α est cohérente avec les résultats obtenus en effectuant le calcul avec la valeur à 222 nm.

Construction	EB2-Cter			EB2-Short		
Programme	K2D2	K2D	Self consistent method	K2D2	K2D	Self consistent method
Hélices α	43	46	40	26	35	30
Feuillets β	11	23	13	19	13	17
Autres (turn, aléatoire...)	46	31	47	55	52	53

Tableau 5 : Composition (en pourcentage) en structures secondaires des deux constructions EB2-Cter et EB2-Short. Les valeurs sont calculées avec trois algorithmes, K2D, K2D2 et la « self consistent method » de Dicroprot.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus par la prédiction de structure secondaire par analyse informatique de la séquence par le logiciel Psipred, on voit une différence dans les prédictions. Psipred prédit que 52 % de la séquence est impliquée dans des hélices (Figure 47) mais l'indice de confiance aux extrémités des hélices est parfois faible, pouvant être à l'origine d'une possible surestimation du contenu en hélice. L'estimation à 5 % de feuillets par Psipred est bien inférieure à celle des logiciels d'analyse de données de CD, mais les données obtenues en CD sont de moins bonne qualité en dessous de 210 nm et inexploitable au delà de 200 nm. Ce sont les données à cette longueur d'onde qui sont importantes pour l'estimation de la quantité de feuillets β rendant peut-être difficile l'interprétation par les programmes pour ce type de structures.

La dénaturation thermique a été suivie par dichroïsme circulaire. Les spectres sont réalisés tous les 5°C entre 25 et 80°C (Figure 58 A). Jusqu'à 45°C les spectres se recouvrent quasiment, la protéine n'est pas dénaturée, seule la courbe à 45°C présente légèrement moins de signal. Dès 50°C, les effets de la température sont marqués, puisque à 50°C, environ un tiers du signal est perdu indiquant que la protéine est partiellement dénaturée. A partir de 55°C, le signal est quasiment nul, révélant qu'à cette température EB2-Cter est totalement dénaturée. Pour définir le T_m d'EB2-Cter, des mesures ont été effectuées tous les degrés à 222 nm (Figure 58 B), indiquant un T_m d'environ 50°C, proche de la valeur de 49°C déterminée en Thermofluor.

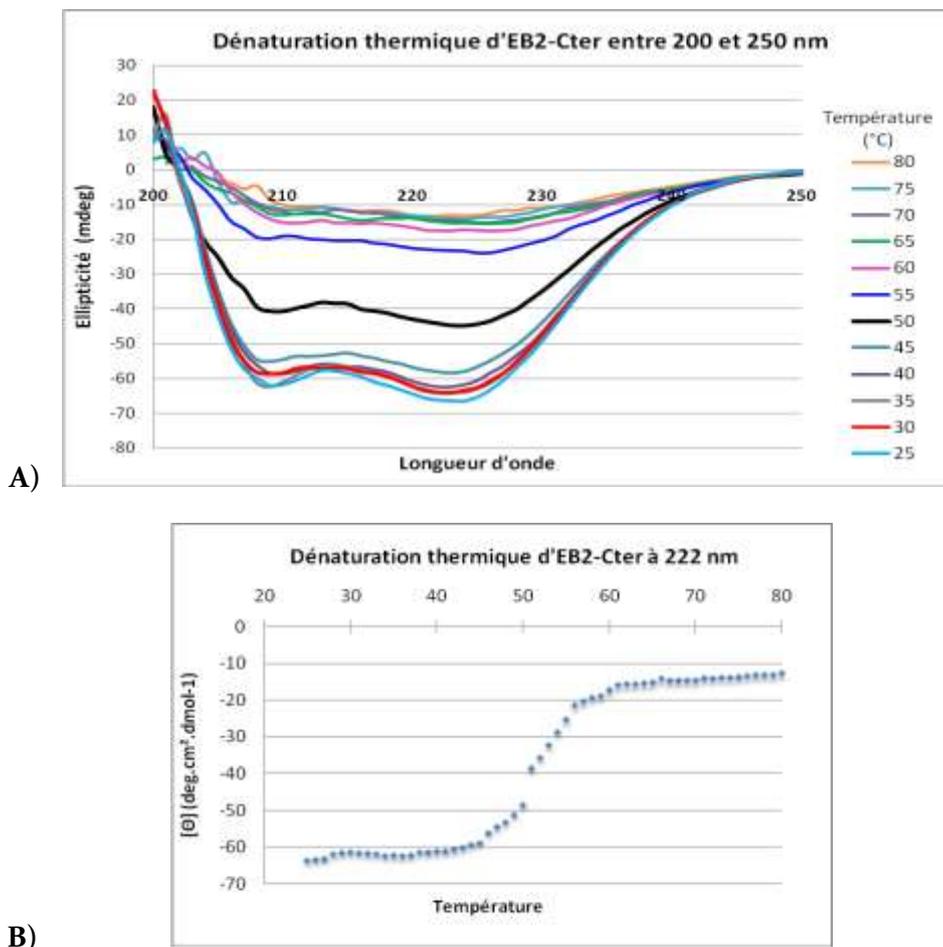


Figure 58 : Dénaturation thermique entre 25 et 80°C d'EB2-Cter suivie en CD A) Spectres de 200 à 250 nm effectués tous les 5°C, B) Mesure à 222 nm par pas de 1°C.

2) DLS

La mesure en DLS montre un rayon de 2,85 ou 2,77 nm pour EB2-short (appareils Malvern et Protein Solutions respectivement) avec la présence d'agrégats beaucoup plus importante sur l'une des mesures (6% de l'intensité sur l'appareil Protein Solutions contre >40% sur l'appareil

Malvern, ces valeurs ne représentent qu'un très faible pourcentage de la masse des particules en solution, l'intensité du signal étant importante pour des particules de taille plus grande)(Figure 59 A). Ce rayon correspond approximativement a une masse moléculaire de 34 kDa, proche de la masse théorique de 31,5 kDa attendue pour EB2-Short. La solution paraît beaucoup plus homogène sur l'appareil Protein Solutions, avec 86 % des particules possédant un rayon de 2,5 à 2,9 nm, la distribution est beaucoup plus étalée sur l'autre appareil (rayon entre 1,5 et 4 nm environ). Les distinctions entre les mesures des deux appareils peuvent être expliquées par les traitements mis en œuvre par les deux appareils qui utilisent des algorithmes différents.

Pour EB2-Cter on obtient un rayon moyen de 3,8 à 4 nm sur l'appareil Malvern (Figure 57 B), et 3,7 nm sur l'appareil Protein Solutions. Selon la calibration pour une protéine globulaire, un rayon de 3,8 nm correspond à une protéine de 68 kDa environ, et 4 nm 90 kDa, correspondant environ au double de la masse théorique d'EB2-Cter (35,5 kDa).

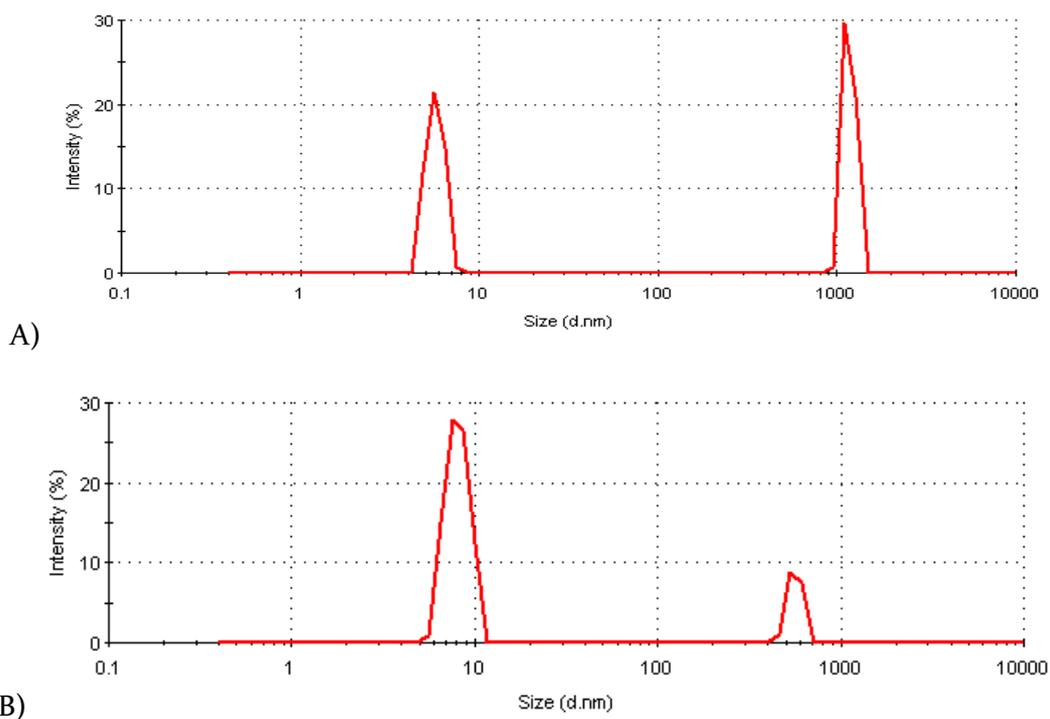


Figure 59 : Spectres DLS obtenus après mesure sur l'appareil Malvern Zeta A) EB2-Short et B) EB2-Cter représentant dans les deux cas le pourcentage de l'intensité en fonction du diamètre des particules présentes en solution. Sur les deux graphes le premier pic représente la protéine, le deuxième est certainement causé par les agrégats.

3) MALLS-SEC sur EB2 short

D'après la mesure en MALLS-SEC-RI, la masse moléculaire calculée pour la protéine EB2-Short est de 33,6 kDa très proche de la masse théorique de 31,5 kDa prédit avec le logiciel ProtParam. On voit que l'échantillon est monodisperse, en accord avec les résultats obtenus par DLS (Figure 60).

L'essai de mesure d'EB2-Cter par cette technique n'a pas permis d'avoir de résultats. En effet après injection de la protéine, celle-ci ne passe pas sur la colonne, aucun pic n'est obtenu, la protéine semble être retenue sur le filtre à l'entrée du système. Ceci pourrait être dû à une précipitation de la protéine sous l'effet de la pression dans le système, l'échantillon n'étant pas agrégé avant au vu des résultats de chromatographie d'exclusion de taille et de DLS.

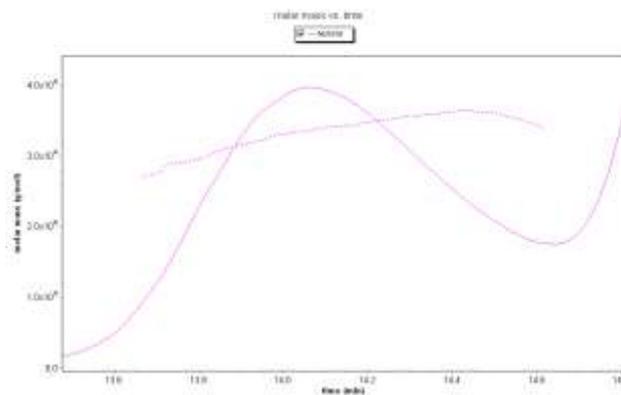


Figure 60 : Courbe de l'élution d'EB2-short de la colonne shodex. Les pointillés représentent la masse molaire moyenne observée sur l'ensemble du pic d'élution.

VIII. Etude de l'interaction avec les partenaires cellulaires

Les études d'interaction ont toutes été effectuées avec les constructions EB2-Cter ou EB2-Short toutes deux munies d'une étiquette hexa-histidine non-clivable, avec les partenaires REF et CK2 β , portant respectivement une étiquette GST ou MBP clivable.

1) EB2-REF

i) Pull-down EB2-REF su résine Ni-NTA : Les deux protéines ne coéluent pas

En présence de 100 mM Imidazole et 200 mM NaCl, la protéine EB2-Cter-His déjà purifiée se fixe à la résine, dans la fraction non-retenue on ne retrouve que la protéine REF (Figure 61) (piste FT). Lors de l'élution, seulement la protéine EB2-Cter est éluée de la résine (pistes El et

Résine). Dans ces conditions REF ne se fixe pas à EB2 sur la résine NiNTA, ce qui peut être dû à la forte concentration en sel.

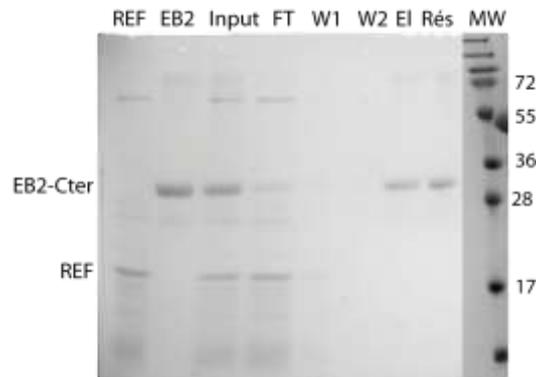


Figure 61 : Essai d'interaction entre EB2-Cter portant l'étiquette hexa-histidine et REF en présence de 100 mM imidazole et 200 mM NaCl. Les deux protéines sont incubées en présence de résine NiNTA (Input). FT est la fraction ne se fixant pas à la résine, W1 et W2 les lavages, El l'élution et Résine les billes de NiNTA.

Afin de déterminer si la concentration en sel influe sur la formation du complexe, l'essai fut réalisé en présence de 2 concentrations de sel. D'après ce gel (Figure 62 ci-dessous) on voit que les deux protéines ne coéluent pas à 100 ou 500 mM NaCl (pistes El). On retrouve une partie d'EB2-Cter portant l'étiquette histidine dans les fractions FT non retenues sur la résine, dû à la saturation de la résine. Les fractions éluées contiennent bien EB2-Cter mais sans la présence de REF. En présence de 100 mM NaCl une très faible quantité de REF est retrouvée dans la fraction éluée, mais cette bande est également présente dans le contrôle sans EB2, témoin d'une légère interaction non spécifique due à la faible concentration en sel ainsi que des lavages peu stringents.

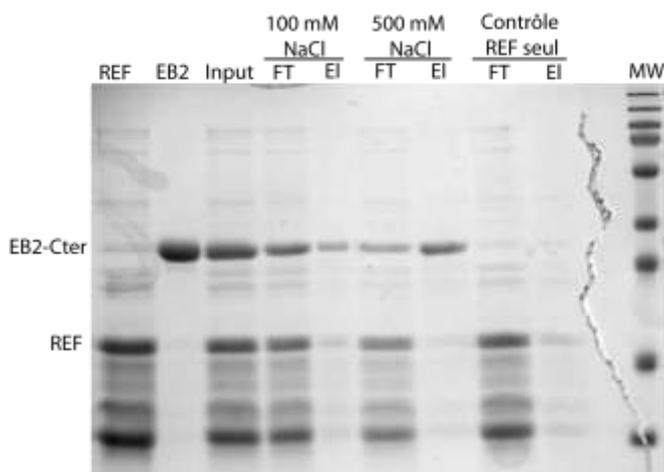


Figure 62 : Essai d'interaction entre EB2-Cter et REF en présence de différentes concentrations de NaCl. Les deux protéines sont incubées en présence de résine NiNTA (Input). FT est la fraction ne se fixant pas à la résine et El la fraction éluée. Le contrôle négatif est effectué en l'absence d'EB2 à 100 mM NaCl.

ii) Pull down EB2-REF sur Ni-NTA après purification de REF en présence de nucléase : Les deux protéines ne coéluent pas

Les échantillons de REF purifiée absorbent fortement à 260 nm, indiquant la présence d'acides nucléiques copurifiés avec la protéine. Ceux-ci pouvant inhiber l'interaction avec EB2, la purification de REF a été réalisée en présence de RNase, et l'essai d'interaction réalisé comme précédemment sur les deux partenaires purifiés. On voit d'après le gel (Figure 63, pistes REF+TEV et REF) que la protéine REF est peu pure et/ou fortement dégradée. Après incubation des deux protéines en présence de la résine Ni-NTA, REF se retrouve essentiellement dans la fraction non fixée ainsi que le premier lavage (Figure 63, pistes FT et W1), aucune présence de REF n'est observée dans la fraction d'élution ou la résine qui contiennent bien EB2. Cependant un spectre d'absorbance de l'échantillon de REF révèle une forte absorbance à 260 nm, indiquant la présence de d'acide nucléique même après le traitement à la RNase. L'essai a également été réalisé en présence de DNase, mais aucun complexe n'a été observé.

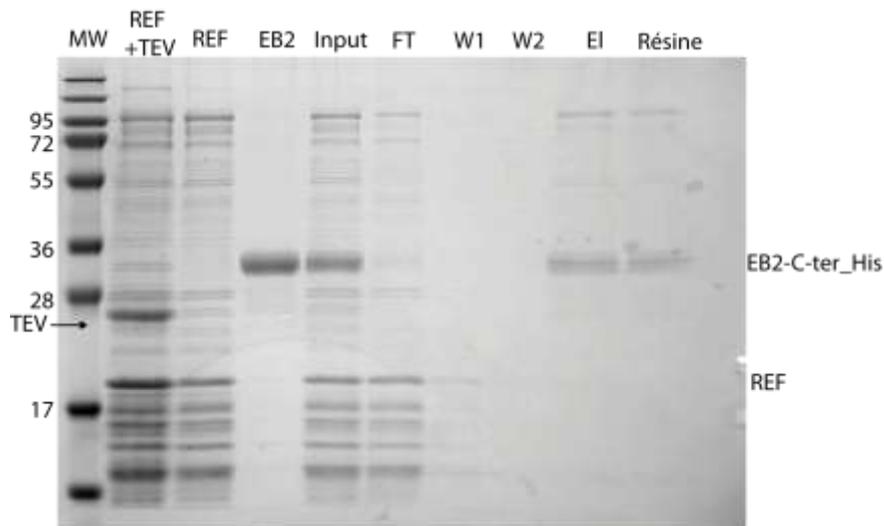


Figure 63 : Essai d'interaction sur résine NiNTA entre EB2-Cter et REF purifiée en présence de RNase. Les deux premières pistes montrent la purification de REF après clivage de l'étiquette GST par la protéase TEV (REF+TEV), et après élimination de la TEV (REF). Les deux protéines REF et EB2 sont ensuite incubées en présence de résine NiNTA (Input) dans un tampon phosphate pH 6,9 100 mM NaCl. FT est la fraction ne se fixant pas à la résine, W1 et W2 les lavages, El l'élution et Résine la résine NiNTA.

iii) Copurification d'EB2 et REF après mélange des deux culots bactériens : Les deux protéines coéluent

Lors d'essais de copurification après mélange des deux culots bactériens, les deux protéines (REF-GST et EB2-Cter-His) coéluent de la résine GST (Figure 64)(la purification est effectuée dans un tampon phosphate pH 7 avec 100 mM NaCl et 10 mM EDTA, les protéines sont éluées avec 10 mM glutathion réduit). Lors du passage en chromatographie d'exclusion de taille de la fraction éluee, on constate qu'EB2-Cter n'est presque plus présent dans l'échantillon, rendant difficile toute interprétation.

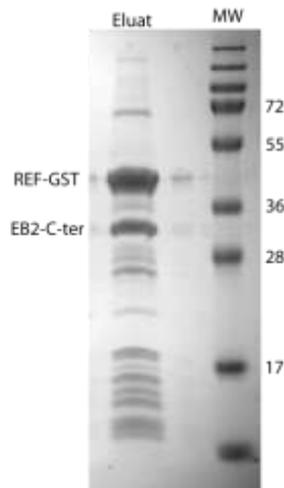


Figure 64 : Copurification d'EB2-Cter et REF : les deux protéines coéluent Coélution d'EB2-Cter-His et REF-GST de la résine glutathione sépharose lors d'une copurification réalisée en mélangeant les deux culots bactériens en quantités égales.

2) EB2-CK2 β

L'étude de l'interaction entre EB2 et la sous-unité β de la CK2 a été réalisée par divers pull-down avec les constructions EB2-Short et EB2-Cter suivis de chromatographie d'exclusion de taille.

i) Pull-down EB2-Short/CK2 β sur résine Ni-NTA

On peut voir sur le gel ci-contre (Figure 65) que la CK2 β ne coélué pas de la résine NiNTA avec la protéine EB2-Short, la majeure partie se retrouve dans le surnageant (la fraction FT). On voit également sur le gel que CK2 β est partiellement dégradée, rendant difficile l'interprétation des résultats. CK2 β est plus stable à très forte concentration de sel (500 mM) , il est donc important de chercher à effectuer l'expérience dans des conditions où CK2 β ne se dégrade pas et avec une concentration en sel qui n'inhibera pas les interactions éventuelles.

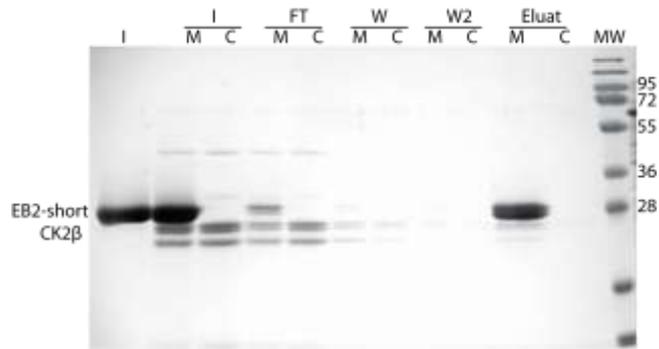


Figure 65 : Pull-down d'EB2-Short(His) et CK2 β sur résine NiNTA en présence de 250 mM NaCl. Les pistes M sont celles de l'expérience réalisée avec les deux protéines et C le contrôle sans EB2-Short. I représente la fraction initiale utilisée pour l'étude, FT (flowthrough) est la fraction non fixée à la colonne, W et W2 (Wash) les lavages à 35 mM Imidazole et Eluat les fractions éluées de la résine. Gel SDS PAGE 15 % acrylamide.

L'essai est renouvelé en présence de CK2 β -MBP car la protéine non-clivée est plus stable en solution. Ici en présence de CK2 β fusionnée à l'étiquette MBP, l'on voit clairement que les deux protéines sont présentes dans la fraction d'éluion (Figure 66) (Eluat M). Le contrôle négatif (Eluat C) en l'absence d'EB2-Short montre une faible quantité de CK2 β -MBP présente dans l'éluion de la résine Ni-NTA, dû à des lavages insuffisants. Néanmoins la quantité de CK2 β coéluant avec EB2 est fortement supérieure à celle du contrôle, incitant à étudier la fraction coéluée en chromatographie d'exclusion de taille.

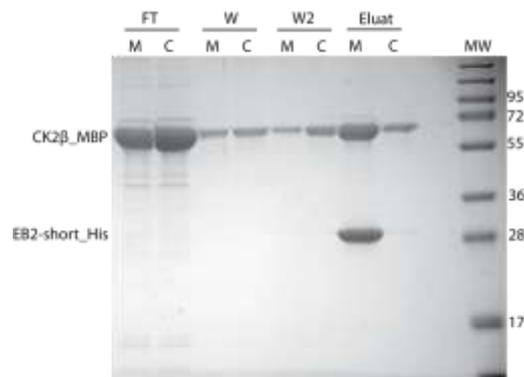


Figure 66 : Pull-down EB2-Short(His) et CK2 β -MBP sur résine NiNTA en présence de 100 mM NaCl. Les pistes M sont celles de l'expérience réalisée avec les deux protéines et C le contrôle sans EB2-Short. FT (flowthrough) est la fraction non fixée à la colonne, W et W2 (Wash) les lavages à 35 mM imidazole et Eluat les fractions éluées de la résine. (Pour cette expérience EB2-short était fixée à la résine, rincée avec un tampon 100 mM NaCl avant l'incubation avec CK2) Gel SDS PAGE 12 % Acrylamide

La superposition des spectres de chromatographie d'exclusion de taille (Figure 67) sur colonne Superdex200 de CK2 β -MBP seule et de la fraction coéluee de CK2 β -MBP et EB2-Short (Echantillon Eluat M du gel Figure 66 ci-dessus) indique clairement que dans ces conditions aucun complexe n'est observé. Le pic correspondant au poids moléculaire le plus élevé (fractions 24-26) est présent dans les deux spectres, et le gel SDS confirme qu'il s'agit de CK2 β -MBP (Figure 67 B pistes 24-27). Les pics plus tardifs sur le profil de chromatographie de la fraction de coélution sont composés d'EB2-Short seule (fractions 34 à 46) et l'imidazole utilisée pour l'élution. La dilution de l'échantillon lors de la chromatographie pourrait expliquer la dissociation éventuelle d'un complexe de faible affinité.

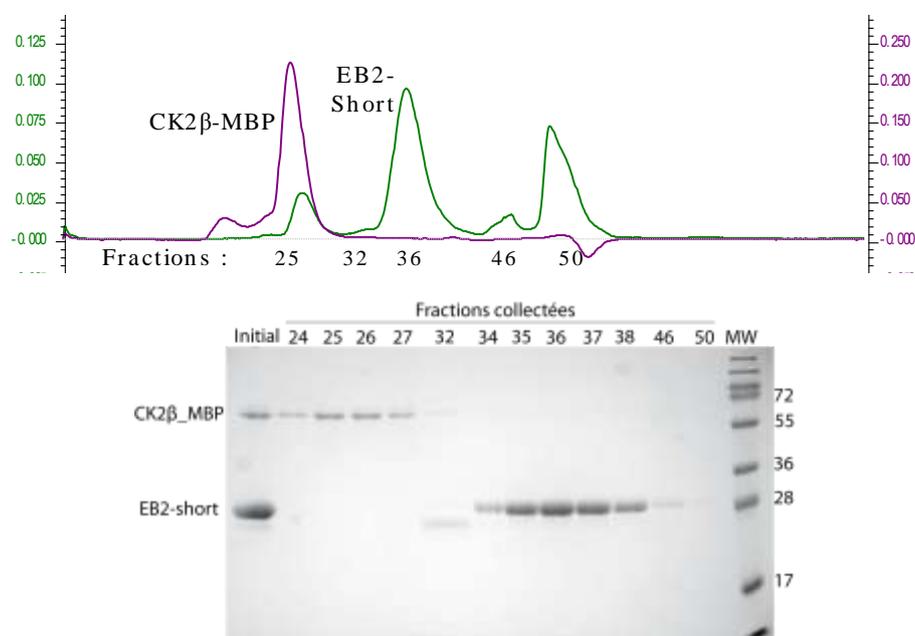


Figure 67 : A) Superposition des profils de chromatographie d'exclusion de taille effectuée sur une colonne S200 avec un échantillon de CK2 β -MBP seule (courbe violette) et la fraction de co-élution CK2/EB2short (courbe verte). Les chromatographies sont réalisées dans un tampon 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5 et 1 mM DTT. **B) Gel SDS PAGE 15 % Acrylamide** des fractions collectées après la chromatographie d'exclusion de taille de la co-élution CK2/EB2short. Le puits « Initial » est la fraction injectée, les autres puits sont les numéros des fractions collectées en sortie de colonne.

ii) Pull-down EB2-Short/CK2 β -MBP sur résine amylose

Afin de confirmer l'absence de complexe entre EB2-Short et CK2 β -MBP, l'essai « inverse » fut réalisé en fixant CK2 β -MBP sur résine amylose (Figure 68). On voit qu'en présence ou en absence de CK2 β -MBP sur la résine, EB2 ne se fixe pas et est retrouvée dans la fraction non fixée (FT) ainsi que les lavages (W et W2). Lors de l'élution une quantité infime d'EB2-Short est retrouvée en présence de CK2 β -MBP, mais également dans le contrôle indiquant une faible interaction non-spécifique, certainement dû à l'absence de lavages à haut sel afin de ne pas dissocier l'éventuel complexe. Ici encore, dans les conditions utilisées, aucun complexe n'est visible, les deux protéines ne coéluent pas de la résine amylose.

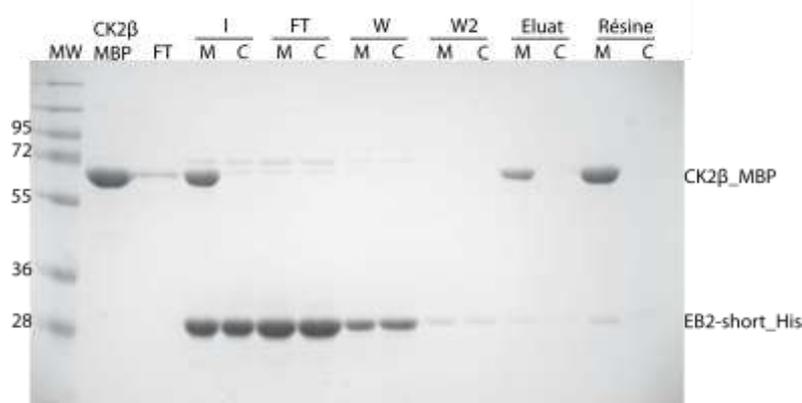


Figure 68 : Essai d'interaction entre CK2 β -MBP et EB2-Short sur résine amylose. Les pistes M sont celles de l'expérience réalisée avec les deux protéines et C le contrôle sans CK2 β -MBP. I représente la fraction initiale utilisée pour l'étude, FT (flowthrough) est la fraction non fixée à la colonne, W et W2 (Wash) les lavages et Eluat les fractions éluées de la résine. (Gel SDS PAGE 12 % Acrylamide)

iii) Pull-down EB2-Cter/CK2 β sur résine Ni-NTA

L'essai d'interaction a également été réalisé avec EB2-Cter, cette construction étant plus longue il est possible que l'interaction passe par les résidus 185-220, absents dans la construction EB2-Short. Le pull-down fut effectué entre EB2-Cter et CK2 β sur résine NiNTA (Figure 69). La majeure partie de CK2 β se retrouve dans la fraction non fixée (FT) ainsi que dans les lavages (W). Dans l'élution (Eluat M) une bande très nette correspondant à CK2 β est visible, mais sa présence dans le puits contrôle (Eluat C) ne permet pas de conclure quant à l'interaction spécifique entre EB2-Cter et CK2 β dans ces conditions.

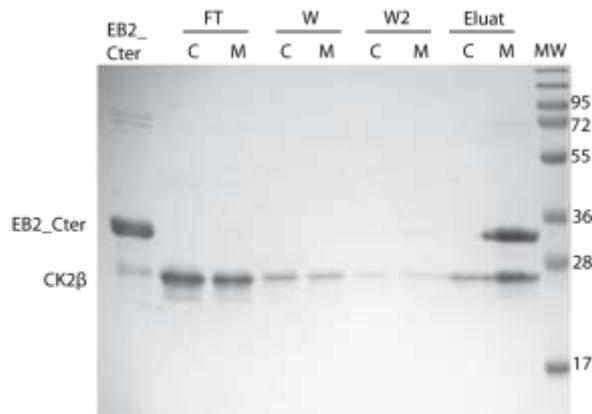


Figure 69: Essai d'interaction entre CK2 β et EB2-Cter sur résine NiNTA. Réalisé à 100 mM NaCl. Les pistes M sont celles de l'expérience réalisée avec les deux protéines et C le contrôle négatif sans EB2-Cter. FT (flowthrough) est la fraction de CK2 β non fixée à la colonne, W et W2 (Wash) les lavages et Eluat les fractions éluées de la résine. (Gel SDS PAGE 12 % Acrylamide)

Lors de l'essai inverse sur résine amylose avec la CK2 β fusionnée à l'étiquette MBP, on observe que les deux protéines coéluent de la résine (Figure 70, piste Eluat M). Trois lavages ont été réalisés afin de s'assurer d'éliminer l'intégralité de la protéine non-fixée. Lors de l'éluat, on retrouve EB2-Cter et CK2 β -MBP en quantités stoechiométriques dans l'échantillon, le contrôle réalisé en l'absence de CK2 β -MBP révèle une très faible quantité d'EB2-Cter retenue de manière non-spécifique sur la résine amylose. Au vu de ces résultats, les deux protéines semblent interagir de manière spécifique.

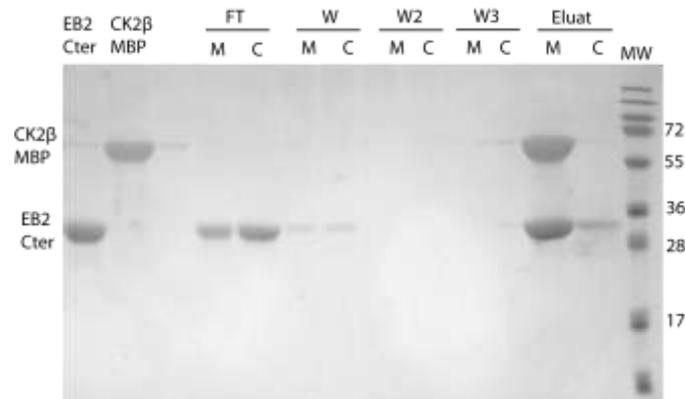


Figure 70 : Essai d'interaction entre EB2-Cter et CK2 β -MBP sur résine amylose réalisé à 100 mM NaCl. Les pistes M sont celles de l'expérience de pull down contenant EB2-Cter et CK2 β -MBP, les pistes C le contrôle négatif sans CK2 β -MBP. FT (flowthrough) est la fraction d'EB2-Cter non fixée à la résine, W (Wash) les lavages à 100 mM NaCl. (Gel SDS PAGE 12 % Acrylamide).

IX. Les essais de cristallogénèse

Les essais de cristallogénèse sur les protéines EB2-Cter et EB2-Short ont été effectués avec le criblage des 576 conditions proposées par la plateforme haut débit de l'EMBL. Pour EB2-Cter, l'essai a été effectué avec une protéine concentrée à 4 mg/ml. Lors de la première inspection après 48h, environ 40 % des gouttes sont claires (30 % après 1 mois). Avec EB2-Short à 1,5 mg/ml, 90 % des gouttes sont claires, indiquant une trop faible concentration de protéine. L'essai fut renouvelé avec une concentration de 3 mg/mL. 55 % des gouttes sont claires en présence de DTT, contre 45 % des gouttes sans DTT. Ces valeurs passent à 35 et 45 % respectivement au bout d'un mois. Aucun cristal ne fut formé dans les conditions testées, pour les deux constructions.

Discussion

I. La protéine EB2

Les expériences réalisées sur EB2 au cours de la thèse ont permis la production en système bactérien de deux constructions C-terminales d'EB2, EB2-Cter et EB2-Short. Des protéines pures et stables en solution ont pu être obtenues après optimisation des conditions de production et purification. L'étude en CD montre que les deux constructions de cette protéine sont structurées, composées essentiellement d'hélices α , en accord avec la prédiction basée sur la séquence.

Les études biochimiques et biophysiques ont soulevé des questions concernant l'importance des résidus 185 à 218, absents dans la construction EB2-Short. En effet, les profils de chromatographie d'exclusion de taille et de DLS révèlent une différence importante entre les deux constructions, qui diffèrent pourtant seulement par la présence de ces 32 résidus. La construction EB2-Cter semble se comporter comme une protéine de masse moléculaire fortement supérieure à 35 kDa, étant éluée de la colonne S75 peu après le volume mort. De plus les résultats obtenus en DLS semblent indiquer un rayon hydrodynamique correspondant plutôt à 70 kDa. Cependant la calibration de la S200 ne permet pas de tirer de conclusions quant à la masse de l'espèce en solution, EB2-Cter étant élué avec un volume supérieur à celui de la BSA (67 kDa), correspondant davantage à une masse proche de celle du monomère (35 kDa) et non d'un complexe oligomérique d'EB2-Cter. L'ensemble des résultats semble toutefois indiquer que la construction EB2-Cter et non EB2-Short serait capable de former des complexes oligomériques, certainement dimériques ou trimériques. Le domaine 185-218 serait alors essentiel à cette oligomérisation. L'absence de résultats avec la technique du MALLS sur EB2-Cter ne permet pas de conclure de façon précise sur l'état d'oligomérisation en solution. En effet des études précédentes ont révélé qu'EB2 était capable d'interagir avec elle-même (Silver-Key *et al.* 1998) mais aucune caractérisation de cette interaction n'a été réalisée. L'observation et l'étude de formes multimériques d'EB2 pourrait permettre d'éclaircir les nombreuses questions sur le fonctionnement d'EB2 ainsi que les interactions avec les protéines cellulaires partenaires ou l'ARN. Nos observations ont suscité l'intérêt de creuser plus profondément cette observation, par le biais de la collaboration avec l'ENS Lyon, des études ultérieures cherchant à mettre en évidence l'oligomérisation d'EB2 par les méthodes de double hybride ou co-immunoprécipitation d'EB2 totale avec la construction C-terminale sont envisageables.

L'étude structurale entreprise avec le criblage d'un grand nombre de conditions de cristallisation n'a pas permis d'obtenir de cristaux. Les concentrations de protéine inférieures à 5 mg/mL étaient assez faibles, pouvant expliquer l'absence de cristaux. Afin de poursuivre cette étude, il faut chercher à stabiliser davantage la protéine en solution, afin de renouveler les essais avec des concentrations de protéine supérieures. Les structures cristallographiques des partenaires d'EB2 décrits dans la littérature pourraient permettre d'obtenir la structure d'EB2 par une co-cristallisation de complexes éventuels.

II. Les complexes

1) EB2-REF

Pour les complexes EB2-REF, aucun résultat convaincant n'a été obtenu en pull-down. L'interaction entre EB2-Cter et REF, clairement décrit dans la littérature (Hiriart *et al.* 2003 b) n'a pas pu être reproduit dans les conditions expérimentales utilisées. En effet, lors de nos études les deux protéines EB2-Cter et REF semblent coéluer seulement lors de copurification après mélange des deux culots bactériens contenant les protéines exprimées séparément. Même avec cette technique, les protéines ne forment que très peu de complexe lors de passage en chromatographie d'exclusion de taille. Lors de ces co-purifications les quantités d'EB2 obtenues sont très faibles. De plus dans tous les essais REF se dégrade rapidement au cours de la purification et entraîne également des acides nucléiques, rendant les tests d'interaction moins optimaux. Il a été montré que l'interaction entre REF et EB2 est insensible au traitement à la RNase *in vitro* (Hiriart *et al.* 2003 b), révélant une interaction directe entre les deux protéines, ne passant pas par l'ARN. Ici la présence d'acides nucléiques en grande quantité pourrait bloquer le site de liaison de REF à EB2, et diminuer l'interaction, un traitement plus efficace avec des nucléases pourrait permettre de produire plus de complexe. Les conditions utilisées dans nos études diffèrent de celles de la littérature, et peuvent être à l'origine des différences de résultats constatées. En effet, les protéines peuvent adopter des conformations variables, exposant ou masquant des motifs à la surface de la protéine. Les acides nucléiques peuvent être à l'origine de ces changements de conformation, qui diffèrent certainement entre les études *in vitro* et *in vivo*, expliquant les différences de sensibilité à la RNase observées par Hiriart *et al.* Des événements complexes entrent certainement en jeu dans l'interaction entre EB2-Cter et REF, créant des obstacles pour l'étude de ce complexe en solution.

Afin de pouvoir confirmer et caractériser le potentiel complexe obtenu, une optimisation des méthodes de purification de ce complexe est nécessaire pour produire des quantités suffisantes. Une co-expression en système bactérien peut également être envisagée, mais les obstacles majeurs ne résident pas en l'expression de quantités importantes de protéine, mais l'augmentation du rendement par l'optimisation de la purification. En effet la purification d'EB2-Cter nécessite de fortes concentrations de sel lors de la lyse bactérienne, qui ne peuvent pas toujours être utilisées pour la purification d'un complexe.

2) EB2-CK2

Les résultats de pull down et de chromatographie montrent qu'il n'y a pas de complexe stable formé entre EB2 Short et la sous-unité β de la CK2 dans les conditions appliquées à cette étude, car on ne retrouve pas le complexe en chromatographie d'exclusion de taille. La coélution d'EB2-Cter et CK2 β des résines NiNTA et amylose en quantités stoechiométriques laisse à penser qu'elles formeraient un complexe plus stable. Il est nécessaire d'exploiter ce résultat de manière plus approfondie, par des études en chromatographie puis -si le complexe est confirmé- en étude cristallographique. Il est aussi nécessaire d'exclure l'interaction d'EB2-Cter avec l'étiquette MBP de la CK2 β . L'agrégation de la CK2 β au cours de ces études est aussi une éventualité car cette protéine est peu stable aux concentrations de sel utilisées pour les essais d'interaction. Au vu de ces résultats on peut dire que CK2 β semble interagir davantage avec EB2-Cter qu'avec EB2-Short car les deux partenaires coéluent dans les essais sur résine NiNTA et amylose (Figures 69 & 70). Les résidus 185-218 pourraient être importants pour cette interaction. Afin de mettre en évidence la capacité d'EB2-Cter décrite dans la littérature (Medina-Palazon *et al.* 2007) à dissocier les sous-unités α et β de la CK2, des expériences complémentaires ont été réalisées par Claude Cochet au CEA de Grenoble. D'après les résultats obtenus (non-montrés), dans les conditions employées, l'oligomère de CK2 avec les sous-unités α et β n'est pas dissocié, EB2-Cter et EB2-Short n'auraient pas la capacité à dissocier les deux sous-unités. Les différences constatées entre nos résultats et ceux de l'équipe de l'ENS concernant les complexes peuvent être causées par les méthodes de production et purification employées. La coélution entre EB2-Cter et CK2 β doit être davantage étudiée afin d'éclaircir s'il s'agit ou non d'un complexe qui peut être exploité.

Conclusions générales

Les travaux effectués au cours de ma thèse ont permis de mieux comprendre le mécanisme catalytique de la dUTPase du virus d'Epstein-Barr. Ces études détaillées ont nécessité la mise au point d'un test enzymatique adapté à l'activité fortement diminuée des mutants de cette protéine. Malgré les difficultés techniques rencontrées, notre analyse a permis une comparaison avec les dUTPases trimériques, présente chez l'homme. Ces enzymes fonctionnent selon un mécanisme similaire, nos résultats contribuant à créer un modèle de fonctionnement général des dUTPases. Les mécanismes catalytiques étant très proches, ceci rend difficile le ciblage spécifique de la dUTPase d'EBV en vue d'une thérapie.

Le deuxième aspect traité au cours de la thèse concernait la protéine EB2. Le sujet de départ concernait l'étude structurale des complexes entre EB2 et ses partenaires cellulaires. Les premiers essais ont révélé que la protéine EB2 n'était pas un candidat facile pour une étude structurale, étant prédite comme peu structurée et difficilement purifiable car instable en solution. Mais en se concentrant sur le domaine C-terminal, deux constructions ont pu être produites, cependant aucun complexe n'a été formé pour permettre une étude structurale. Les différences de conditions d'expression, de purification peuvent entrer en jeu pour expliquer ces différences de résultats. Nos études ont cependant permis d'émettre l'hypothèse que la protéine EB2 formerait des multimères en solution, ce qui pourrait être important pour le fonctionnement de cette protéine. Cette hypothèse sera adressée par des études ultérieures.

La note de la fin!

Au cours de ma thèse je me suis confrontée à différents obstacles techniques, certains surmontés, d'autres contournés afin de mener à terme mon projet de recherche. Ces difficultés m'ont appris à être tenace et ne pas lâcher prise, quelles que soient les conditions. Ces 3 années m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes qui ont marqué mon expérience ici, ainsi que mes choix d'orientation professionnelle. C'est ainsi que s'arrête ma thèse, et avec elle mon expérience en recherche académique, j'espère que mes futures expériences m'apporteront autant que celle-ci.

Références Bibliographiques

- Abbot, S. D., M. Rowe, *et al.* (1990). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein." *J Virol* **64**(5): 2126-34.
- Adams, A. and T. Lindahl (1975). "Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(4): 1477-81.
- Adhikary, S. and M. Eilers (2005). "Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 635-45.
- Almog, R., F. Maley, *et al.* (2004). "Three-dimensional structure of the R115E mutant of T4-bacteriophage 2'-deoxycytidylate deaminase." *Biochemistry* **43**(43): 13715-23.
- Altmann, M. and W. Hammerschmidt (2005). "Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis." *PLoS Biol* **3**(12): e404.
- Ariyoshi, M. and J. W. Schwabe (2003). "A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling." *Genes Dev* **17**(15): 1909-20.
- Ariza, M. E., R. Glaser, *et al.* (2009). "The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway." *J Immunol* **182**(2): 851-9.
- Babcock, G. J., L. L. Decker, *et al.* (1998). "EBV persistence in memory B cells in vivo." *Immunity* **9**(3): 395-404.
- Babcock, G. J., D. Hochberg, *et al.* (2000). "The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell." *Immunity* **13**(4): 497-506.
- Bachi, A., I. C. Braun, *et al.* (2000). "The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates." *Rna* **6**(1): 136-58.
- Backovic, M., R. Longnecker, *et al.* (2009). "Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2880-5.
- Baldo, A. M. and M. A. McClure (1999). "Evolution and horizontal transfer of dUTPase-encoding genes in viruses and their hosts." *J Virol* **73**(9): 7710-21.
- Barabas, O., V. Pongracz, *et al.* (2004). "Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase." *J Biol Chem* **279**(41): 42907-15.
- Bargou, R. C., F. Emmerich, *et al.* (1997). "Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells." *J Clin Invest* **100**(12): 2961-9.
- Barth, S., T. Pfuhl, *et al.* (2008). "Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5." *Nucleic Acids Res* **36**(2): 666-75.
- Barton, E. S., D. W. White, *et al.* (2009). "Herpesvirus latency and symbiotic protection from bacterial infection." *Viral Immunol* **22**(1): 3-4; author reply 5-6.
- Batisse, J., E. Manet, *et al.* (2005). "Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for intranuclear capsid assembly and production of gp350." *J Virol* **79**(22): 14102-11.
- Bergman, A. C., P. O. Nyman, *et al.* (1998). "Kinetic properties and stereospecificity of the monomeric dUTPase from herpes simplex virus type 1." *FEBS Lett* **441**(2): 327-30.
- Bjornberg, O., J. Neuhard, *et al.* (2003). "A bifunctional dCTP deaminase-dUTP nucleotidohydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Methanocaldococcus jannaschii*." *J Biol Chem* **278**(23): 20667-72.
- Bochkarev, A., J. A. Barwell, *et al.* (1996). "Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein, EBNA1, bound to DNA." *Cell* **84**(5): 791-800.
- Bochkarev, A., J. A. Barwell, *et al.* (1995). "Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein EBNA 1." *Cell* **83**(1): 39-46.

- Bochkarev, A., E. Bochkareva, *et al.* (1998). "The 2.2 Å structure of a permanganate-sensitive DNA site bound by the Epstein-Barr virus origin binding protein, EBNA1." *J Mol Biol* **284**(5): 1273-8.
- Bonnet, M., J. M. Guinebretiere, *et al.* (1999). "Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers." *J Natl Cancer Inst* **91**(16): 1376-81.
- Bornkamm, G. W. (2009). "Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers." *Int J Cancer* **124**(8): 1745-55.
- Boyer, J. L., S. Swaminathan, *et al.* (2002). "The Epstein-Barr virus SM protein is functionally similar to ICP27 from herpes simplex virus in viral infections." *J Virol* **76**(18): 9420-33.
- Boyle, S. M., V. Ruvolo, *et al.* (1999). "Association with the cellular export receptor CRM 1 mediates function and intracellular localization of Epstein-Barr virus SM protein, a regulator of gene expression." *J Virol* **73**(8): 6872-81.
- Brahms, S. and J. Brahms (1980). "Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism." *J Mol Biol* **138**(2): 149-78.
- Braun, I. C., E. Rohrbach, *et al.* (1999). "TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus." *Embo J* **18**(7): 1953-65.
- Brock, T., Ed. (1998). *Milestones in Microbiology*, ASM Press.
- Buisson, M., F. Hans, *et al.* (1999). "The C-terminal region but not the Arg-X-Pro repeat of Epstein-Barr virus protein EB2 is required for its effect on RNA splicing and transport." *J Virol* **73**(5): 4090-100.
- Buisson, M., J. F. Hernandez, *et al.* (2002). "The crystal structure of the Epstein-Barr virus protease shows rearrangement of the processed C terminus." *J Mol Biol* **324**(1): 89-103.
- Buisson, M., E. Manet, *et al.* (1989). "The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R." *J Virol* **63**(12): 5276-84.
- Burkitt, D. (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." *Br J Surg* **46**(197): 218-23.
- Burkitt, D. P. (1961). "Observations on the geography of malignant lymphoma." *East Afr Med J* **38**: 511-4.
- Caradonna, S. J. and D. M. Adamkiewicz (1984). "Purification and properties of the deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase enzyme derived from HeLa S3 cells. Comparison to a distinct dUTP nucleotidohydrolase induced in herpes simplex virus-infected HeLa S3 cells." *J Biol Chem* **259**(9): 5459-64.
- Carbone, A., E. Cesarman, *et al.* (2009). "HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses." *Blood* **113**(6): 1213-24.
- Chan, S., B. Segelke, *et al.* (2004). "Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis dUTPase: insights into the catalytic mechanism." *J Mol Biol* **341**(2): 503-17.
- Chantalat, L., D. Leroy, *et al.* (1999). "Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization." *Embo J* **18**(11): 2930-40.
- Chen, L., G. Liao, *et al.* (2001). "Properties of two EBV Mta nuclear export signal sequences." *Virology* **288**(1): 119-28.
- Chen, R., H. Wang, *et al.* (2002). "Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication." *J Gen Virol* **83**(Pt 10): 2339-45.
- Chene, A., D. Donati, *et al.* (2007). "A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation." *PLoS Pathog* **3**(6): e80.
- Cheng, H., K. Dufu, *et al.* (2006). "Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA." *Cell* **127**(7): 1389-400.
- Cheng, Y. C., J. Y. Chen, *et al.* (1980). "Frequency and levels of antibodies to Epstein-Barr virus-specific DNase are elevated in patients with nasopharyngeal carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(10): 6162-5.

- Chevallier-Greco, A., E. Manet, *et al.* (1986). "Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter." *Embo J* 5(12): 3243-9.
- Chodosh, J., V. P. Holder, *et al.* (1998). "Eradication of latent Epstein-Barr virus by hydroxyurea alters the growth-transformed cell phenotype." *J Infect Dis* 177(5): 1194-201.
- Chung, S. and R. P. Perry (1989). "Importance of introns for expression of mouse ribosomal protein gene rpL32." *Mol Cell Biol* 9(5): 2075-82.
- Cohen, J. I. (2000). "Epstein-Barr virus infection." *N Engl J Med* 343(7): 481-92.
- Cook, I. D., F. Shanahan, *et al.* (1994). "Epstein-Barr virus SM protein." *Virology* 205(1): 217-27.
- Custodio, N., C. Carvalho, *et al.* (2004). "In vivo recruitment of exon junction complex proteins to transcription sites in mammalian cell nuclei." *Rna* 10(4): 622-33.
- Damania, B. (2004). "Oncogenic gamma-herpesviruses: comparison of viral proteins involved in tumorigenesis." *Nat Rev Microbiol* 2(8): 656-68.
- Datta, A. K., B. M. Colby, *et al.* (1980). "Acyclovir inhibition of Epstein-Barr virus replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(9): 5163-6.
- Davison, A. J. and N. D. Stow (2005). "New genes from old: redeployment of dUTPase by herpesviruses." *J Virol* 79(20): 12880-92.
- Decaussin, G., F. Sbih-Lammali, *et al.* (2000). "Expression of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma biopsies." *Cancer Res* 60(19): 5584-8.
- Delecluse, H. J., R. Feederle, *et al.* (2007). "Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist." *J Clin Pathol* 60(12): 1358-64.
- Dickerson, S. J., Y. Xing, *et al.* (2009). "Methylation-dependent binding of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein to viral promoters." *PLoS Pathog* 5(3): e1000356.
- el-Hajj, H. H., H. Zhang, *et al.* (1988). "Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in Escherichia coli." *J Bacteriol* 170(3): 1069-75.
- Epstein, M. A. (1955). "Site of virus-like particles in Rous fowl sarcoma cells." *Nature* 176(4486): 784-5.
- Epstein, M. A., B. G. Achong, *et al.* (1964). "Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma." *Lancet* 1(7335): 702-3.
- Epstein, M. A., G. Henle, *et al.* (1965). "Morphological And Biological Studies On A Virus In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma." *J Exp Med* 121: 761-70.
- Erkmann, J. A., R. Sanchez, *et al.* (2005). "Nuclear export of metazoan replication-dependent histone mRNAs is dependent on RNA length and is mediated by TAP." *Rna* 11(1): 45-58.
- Farjot, G., M. Buisson, *et al.* (2000). "Epstein-Barr virus EB2 protein exports unspliced RNA via a Crm-1-independent pathway." *J Virol* 74(13): 6068-76.
- Farrell, P. J., D. T. Rowe, *et al.* (1989). "Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos." *Embo J* 8(1): 127-32.
- Farrell, R. A., D. Antony, *et al.* (2009). "Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI." *Neurology*.
- Faumont, N., A. Chanut, *et al.* (2009). "Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes." *Haematologica* 94(3): 355-63.
- Fingerroth, J. D., J. J. Weis, *et al.* (1984). "Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(14): 4510-4.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, *et al.* (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *J Exp Med* 170(6): 2081-95.
- Fleischmann, J., E. Kremmer, *et al.* (2002). "Expression of viral and human dUTPase in Epstein-Barr virus-associated diseases." *J Med Virol* 68(4): 568-73.
- Fornerod, M., M. Ohno, *et al.* (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." *Cell* 90(6): 1051-60.

- Frayne, J., A. Taylor, *et al.* (2009). "Structure of insoluble rat sperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) via heterotetramer formation with *Escherichia coli* GAPDH reveals target for contraceptive design." *J Biol Chem* **284**(34): 22703-12.
- Fukuda, M. and R. Longnecker (2007). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway." *J Virol* **81**(17): 9299-306.
- Gadsden, M. H., E. M. McIntosh, *et al.* (1993). "dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **12**(11): 4425-31.
- Gandhi, M. K. (2006). "Epstein-Barr virus-associated lymphomas." *Expert Rev Anti Infect Ther* **4**(1): 77-89.
- Gao, M., L. Matusick-Kumar, *et al.* (1994). "The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth." *J Virol* **68**(6): 3702-12.
- Gasteiger, E. and C. Hoogland (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, Humana Press.
- Gatfield, D. and E. Izaurralde (2002). "REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export." *J Cell Biol* **159**(4): 579-88.
- Geoui, T., M. Buisson, *et al.* (2007). "New insights on the role of the gamma-herpesvirus uracil-DNA glycosylase leucine loop revealed by the structure of the Epstein-Barr virus enzyme in complex with an inhibitor protein." *J Mol Biol* **366**(1): 117-31.
- Gershburg, E. and J. S. Pagano (2005). "Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment." *J Antimicrob Chemother* **56**(2): 277-81.
- Glaser, R., M. L. Litsky, *et al.* (2006). "EBV-encoded dUTPase induces immune dysregulation: Implications for the pathophysiology of EBV-associated disease." *Virology* **346**(1): 205-18.
- Glaser, R., D. A. Padgett, *et al.* (2005). "Stress-associated changes in the steady-state expression of latent Epstein-Barr virus: implications for chronic fatigue syndrome and cancer." *Brain Behav Immun* **19**(2): 91-103.
- Glaser, R., G. R. Pearson, *et al.* (1991). "Stress-related activation of Epstein-Barr virus." *Brain Behav Immun* **5**(2): 219-32.
- Glaser, R., E. C. Strain, *et al.* (1985). "Changes in Epstein-Barr virus antibody titers associated with aging." *Proc Soc Exp Biol Med* **179**(3): 352-5.
- Gratama, J. W., M. A. Oosterveer, *et al.* (1988). "Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(22): 8693-6.
- Greenspan, J. S., D. Greenspan, *et al.* (1985) (b). "Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion." *N Engl J Med* **313**(25): 1564-71.
- Greenspan, J. S., D. Greenspan, *et al.* (1985) (a). "Oral viral leukoplakia--a new AIDS-associated condition." *Adv Exp Med Biol* **187**: 123-8.
- Gruffat, H., J. Batisse, *et al.* (2002). "Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus." *J Virol* **76**(19): 9635-44.
- Gruter, P., C. Taberner, *et al.* (1998). "TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus." *Mol Cell* **1**(5): 649-59.
- Han, Z. and S. Swaminathan (2006). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic gene ORF57 is essential for infectious virion production." *J Virol* **80**(11): 5251-60.
- Hardy, W. R. and R. M. Sandri-Goldin (1994). "Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect." *J Virol* **68**(12): 7790-9.
- Harkiolaki, M., E. J. Dodson, *et al.* (2004). "The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold." *Structure* **12**(1): 41-53.
- Hautbergue, G. M., M. L. Hung, *et al.* (2008). "Mutually exclusive interactions drive handover of mRNA from export adaptors to TAP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(13): 5154-9.

- Helt, S. S., M. Thymark, *et al.* (2008). "Mechanism of dTTP inhibition of the bifunctional dCTP deaminase:dUTPase encoded by *Mycobacterium tuberculosis*." J Mol Biol **376**(2): 554-69.
- Henle, G., W. Henle, *et al.* (1968). "Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ypete virus to infectious mononucleosis." Proc Natl Acad Sci U S A **59**(1): 94-101.
- Henle, W., G. Henle, *et al.* (1970). "Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups." J Natl Cancer Inst **44**(1): 225-31.
- Henson, B. W., E. M. Perkins, *et al.* (2009). "Self-assembly of Epstein-Barr virus capsids." J Virol **83**(8): 3877-90.
- Herrold, R. E., A. Marchini, *et al.* (1996). "Glycoprotein 110, the Epstein-Barr virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein B, is essential for Epstein-Barr virus replication in vivo." J Virol **70**(3): 2049-54.
- Hidalgo-Zarco, F., A. G. Camacho, *et al.* (2001). "Kinetic properties and inhibition of the dimeric dUTPase-dUDPase from *Leishmania major*." Protein Sci **10**(7): 1426-33.
- Hill, F., D. Loakes, *et al.* (1998). "Polymerase recognition of synthetic oligodeoxyribonucleotides incorporating degenerate pyrimidine and purine bases." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4258-63.
- Hiriart, E., L. Bardouillet, *et al.* (2003) (a). "A region of the Epstein-Barr virus (EBV) mRNA export factor EB2 containing an arginine-rich motif mediates direct binding to RNA." J Biol Chem **278**(39): 37790-8.
- Hiriart, E., G. Farjot, *et al.* (2003) (b). "A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein." J Biol Chem **278**(1): 335-42.
- Hiriart, E., H. Gruffat, *et al.* (2005). "Interaction of the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 with human Spen proteins SHARP, OTT1, and a novel member of the family, OTT3, links Spen proteins with splicing regulation and mRNA export." J Biol Chem **280**(44): 36935-45.
- Ho, D. N., G. A. Coburn, *et al.* (2002). "The crystal structure and mutational analysis of a novel RNA-binding domain found in the human Tap nuclear mRNA export factor." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 1888-93.
- Hsu, M., S. Y. Wu, *et al.* (2008). "Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta enhances chemotactic activity through induction of interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cells." J Virol **82**(7): 3679-88.
- Ingraham, H. A., L. Dickey, *et al.* (1986). "DNA fragmentation and cytotoxicity from increased cellular deoxyuridylate." Biochemistry **25**(11): 3225-30.
- Jin, M. S., S. E. Kim, *et al.* (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." Cell **130**(6): 1071-82.
- Johansson, E., O. Bjornberg, *et al.* (2003). "Structure of the bifunctional dCTP deaminase-dUTPase from *Methanocaldococcus jannaschii* and its relation to other homotrimeric dUTPases." J Biol Chem **278**(30): 27916-22.
- Johnson, L. A., L. Li, *et al.* (2009). "The cellular RNA export receptor TAP/NXF1 is required for ICP27-mediated export of herpes simplex virus 1 RNA, but the TREX complex adaptor protein Aly/REF appears to be dispensable." J Virol **83**(13): 6335-46.
- Jones, D. T. (1999). "Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices." J Mol Biol **292**(2): 195-202.
- Juillard, F., E. Hiriart, *et al.* (2009). "The Epstein-Barr virus (EBV) protein EB2 contains a N-terminal transferable NES that promotes nucleocytoplasmic export by directly binding TAP/NXF1." J Virol.
- Kanegane, H., K. Bhatia, *et al.* (1998). "A syndrome of peripheral blood T-cell infection with Epstein-Barr virus (EBV) followed by EBV-positive T-cell lymphoma." Blood **91**(6): 2085-91.

- Katahira, J., K. Strasser, *et al.* (1999). "The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human." *Embo J* **18**(9): 2593-609.
- Katlama, C. and R. Murphy (2009). "Emerging role of integrase inhibitors in the management of treatment-experienced patients with HIV infection." *Ther Clin Risk Manag* **5**(2): 331-40.
- Kausche, G. and E. Pfankuch (1939). "Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop." *Naturwissenschaften* **27**(18): 292-9.
- Kieff, E. and A. B. Rickinson (2001). Epstein-Barr Virus and its replication, Epstein-Barr Virus. *Fields Virology*. Knipe and Howley, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2511-2627.
- Kovari, J., O. Barabas, *et al.* (2008). "Methylene substitution at the alpha-beta bridging position within the phosphate chain of dUDP profoundly perturbs ligand accommodation into the dUTPase active site." *Proteins* **71**(1): 308-19.
- Kremmer, E., P. Sommer, *et al.* (1999). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) ORF54 encodes a functional dUTPase expressed in the lytic replication cycle." *J Gen Virol* **80** (Pt 5): 1305-10.
- Kunitomi, A., N. Arima, *et al.* (2007). "Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorders presented as interstitial pneumonia; successful recovery with rituximab." *Haematologica* **92**(4): e49-52.
- Kuppers, R. (2003). "B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus." *Nat Rev Immunol* **3**(10): 801-12.
- Ladner, R. D. and S. J. Caradonna (1997). "The human dUTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. Differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species." *J Biol Chem* **272**(30): 19072-80.
- Ladner, R. D., F. J. Lynch, *et al.* (2000). "dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer." *Cancer Res* **60**(13): 3493-503.
- Ladner, R. D., D. E. McNulty, *et al.* (1996). "Characterization of distinct nuclear and mitochondrial forms of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase." *J Biol Chem* **271**(13): 7745-51.
- Laichalk, L. L. and D. A. Thorley-Lawson (2005). "Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo." *J Virol* **79**(2): 1296-307.
- Langdon, W. Y., A. W. Harris, *et al.* (1986). "The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice." *Cell* **47**(1): 11-8.
- Larsson, G., P. O. Nyman, *et al.* (1996). "Kinetic characterization of dUTPase from Escherichia coli." *J Biol Chem* **271**(39): 24010-6.
- Larsson, G., L. A. Svensson, *et al.* (1996). "Crystal structure of the Escherichia coli dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP)." *Nat Struct Biol* **3**(6): 532-8.
- Laurent, C., F. Meggetto, *et al.* (2008). "Human herpesvirus 8 infections in patients with immunodeficiencies." *Hum Pathol* **39**(7): 983-93.
- Le Hir, H., E. Izaurralde, *et al.* (2000) (a). "The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions." *Embo J* **19**(24): 6860-9.
- Le Hir, H., M. J. Moore, *et al.* (2000) (b). "Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions." *Genes Dev* **14**(9): 1098-108.
- Lee, S. K. and R. Longnecker (1997). "The Epstein-Barr virus glycoprotein 110 carboxy-terminal tail domain is essential for lytic virus replication." *J Virol* **71**(5): 4092-7.
- Lichtenstein, D. L., K. E. Rushlow, *et al.* (1995). "Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity." *J Virol* **69**(5): 2881-8.
- Lieberman, P. M., P. O'Hare, *et al.* (1986). "Promiscuous trans activation of gene expression by an Epstein-Barr virus-encoded early nuclear protein." *J Virol* **60**(1): 140-8.
- Lifang, Y., T. Min, *et al.* (2008). "HSV-tk/GCV gene therapy mediated by EBV-LMP1 for EBV-associated cancer." *J Exp Clin Cancer Res* **27**: 42.

- Lindhahl, T., S. Ljungquist, *et al.* (1977). "DNA N-glycosidases: properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **252**(10): 3286-94.
- Lischka, P., Z. Toth, *et al.* (2006). "The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA." *Mol Cell Biol* **26**(5): 1631-43.
- Long, J. C. and J. F. Caceres (2009). "The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression." *Biochem J* **417**(1): 15-27.
- Luo, M. J. and R. Reed (1999). "Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14937-42.
- Luo, M. L., Z. Zhou, *et al.* (2001). "Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly." *Nature* **413**(6856): 644-7.
- Malik, P., D. J. Blackbourn, *et al.* (2004). "The evolutionarily conserved Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with REF protein and acts as an RNA export factor." *J Biol Chem* **279**(31): 33001-11.
- Malik, P. and J. B. Clements (2004). "Protein kinase CK2 phosphorylation regulates the interaction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus regulatory protein ORF57 with its multifunctional partner hnRNP K." *Nucleic Acids Res* **32**(18): 5553-69.
- Markowitz, M., J. O. Morales-Ramirez, *et al.* (2006). "Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naive HIV-1-infected individuals." *J Acquir Immune Defic Syndr* **43**(5): 509-15.
- Masuyama, K., I. Taniguchi, *et al.* (2004). "RNA length defines RNA export pathway." *Genes Dev* **18**(17): 2074-85.
- McGeoch, D. J. (1990). "Protein sequence comparisons show that the 'pseudoproteases' encoded by poxviruses and certain retroviruses belong to the deoxyuridine triphosphatase family." *Nucleic Acids Res* **18**(14): 4105-10.
- Medina-Palazon, C., H. Gruffat, *et al.* (2007). "Protein kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles." *J Virol* **81**(21): 11850-60.
- Miller, C. L., A. L. Burkhardt, *et al.* (1995). "Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases." *Immunity* **2**(2): 155-66.
- Mol, C. D., J. M. Harris, *et al.* (1996). "Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits." *Structure* **4**(9): 1077-92.
- Molesworth, S. J., C. M. Lake, *et al.* (2000). "Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells." *J Virol* **74**(14): 6324-32.
- Moore, P. and Y. Chang (2001). Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus. *Fields Virology*. Knipe and Howley, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2803-2833.
- Mullen, M. M., K. M. Haan, *et al.* (2002). "Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1." *Mol Cell* **9**(2): 375-85.
- Nemeth-Pongracz, V., O. Barabas, *et al.* (2007). "Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins." *Nucleic Acids Res* **35**(2): 495-505.
- Neuhard, J. and E. Thomassen (1971). "Deoxycytidine triphosphate deaminase: identification and function in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **105**(2): 657-65.
- Newcomb, W. W., F. L. Homa, *et al.* (1999). "Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins." *J Virol* **73**(5): 4239-50.
- Nicewonger, J., G. Suck, *et al.* (2004). "Epstein-Barr virus (EBV) SM protein induces and recruits cellular Sp1 to stabilize mRNAs and enhance EBV lytic gene expression." *J Virol* **78**(17): 9412-22.

- Niedobitek, G., A. Agathangelou, *et al.* (1997). "Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells." J Pathol **182**(2): 151-9.
- Oussaief, L., A. Hippocrate, *et al.* (2009). "Activation of the lytic program of the Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma cells leads to a two steps downregulation of expression of the proapoptotic protein BimEL, one of which is EBV-late-gene expression dependent." Virology **387**(1): 41-9.
- Padgett, D. A., A. K. Hotchkiss, *et al.* (2004). "Epstein-Barr virus-encoded dUTPase modulates immune function and induces sickness behavior in mice." J Med Virol **74**(3): 442-8.
- Pagano, J. S., J. W. Sixbey, *et al.* (1983). "Acyclovir and Epstein-Barr virus infection." J Antimicrob Chemother **12 Suppl B**: 113-21.
- Palmen, L. G., K. Becker, *et al.* (2008). "A double role for a strictly conserved serine: further insights into the dUTPase catalytic mechanism." Biochemistry **47**(30): 7863-74.
- Pan, Y. R., C. Y. Fang, *et al.* (2005). "Analysis of Epstein-Barr virus gene expression upon phorbol ester and hydroxyurea treatment by real-time quantitative PCR." Arch Virol **150**(4): 755-70.
- Papworth, M. A., A. A. Van Dijk, *et al.* (1997). "The processing, transport and heterologous expression of Epstein-Barr virus gp110." J Gen Virol **78 (Pt 9)**: 2179-89.
- Patel, D. J. (1999). "Adaptive recognition in RNA complexes with peptides and protein modules." Curr Opin Struct Biol **9**(1): 74-87.
- Perez-Alvarado, G. C., M. Martinez-Yamout, *et al.* (2003). "Structure of the nuclear factor ALY: insights into post-transcriptional regulatory and mRNA nuclear export processes." Biochemistry **42**(24): 7348-57.
- Perkins, E. M., D. Anacker, *et al.* (2008). "Small capsid protein pORF65 is essential for assembly of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsids." J Virol **82**(14): 7201-11.
- Perkins, R. S., K. Sahm, *et al.* (2006). "Analysis of Epstein-Barr virus reservoirs in paired blood and breast cancer primary biopsy specimens by real time PCR." Breast Cancer Res **8**(6): R70.
- Petosa, C., P. Morand, *et al.* (2006). "Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein." Mol Cell **21**(4): 565-72.
- Pinna, L. A. (2002). "Protein kinase CK2: a challenge to canons." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3873-8.
- Prasad, G. S., E. A. Stura, *et al.* (2000). "Structures of feline immunodeficiency virus dUTP pyrophosphatase and its nucleotide complexes in three crystal forms." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56 (Pt 9)**: 1100-9.
- Prasad, G. S., E. A. Stura, *et al.* (1996). "Crystal structure of dUTP pyrophosphatase from feline immunodeficiency virus." Protein Sci **5**(12): 2429-37.
- Pratt, Z. L., M. Kuzembayeva, *et al.* (2009). "The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines." Virology **386**(2): 387-97.
- Preston, V. G. and F. B. Fisher (1984). "Identification of the herpes simplex virus type 1 gene encoding the dUTPase." Virology **138**(1): 58-68.
- Prichard, M. N., E. R. Kern, *et al.* (2008). "Vaccinia virus lacking the deoxyuridine triphosphatase gene (F2L) replicates well in vitro and in vivo, but is hypersensitive to the antiviral drug (N)-methanocarbathymidine." Virol J **5**: 39.
- Prilusky, J., C. E. Felder, *et al.* (2005). "FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded." Bioinformatics **21**(16): 3435-8.
- Pyles, R. B., N. M. Sawtell, *et al.* (1992). "Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency." J Virol **66**(11): 6706-13.
- Quesada-Soriano, I., I. Leal, *et al.* (2008). "Kinetic and thermodynamic characterization of dUTP hydrolysis by Plasmodium falciparum dUTPase." Biochim Biophys Acta **1784**(9): 1347-55.

- Quesada-Soriano, I., J. A. Musso-Buendia, *et al.* (2007). "Plasmodium falciparum dUTPase: studies on protein stability and binding of deoxyuridine derivatives." Biochim Biophys Acta **1774**(7): 936-45.
- Reed, R. and H. Cheng (2005). "TREX, SR proteins and export of mRNA." Curr Opin Cell Biol **17**(3): 269-73.
- Reisman, D., J. Yates, *et al.* (1985). "A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components." Mol Cell Biol **5**(8): 1822-32.
- Resnick, L., J. S. Herbst, *et al.* (1988). "Regression of oral hairy leukoplakia after orally administered acyclovir therapy." Jama **259**(3): 384-8.
- Ricci, E. P., F. Mure, *et al.* (2009). "Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2." Nucleic Acids Res **37**(15): 4932-43.
- Rickinson, A. B. and D. J. Moss (1997). "Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection." Annu Rev Immunol **15**: 405-31.
- Roizman, B. and P. Pellett (2001). The family Herpesviridae: A brief introduction. Fields Virology. Knipe and Howley, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2381-2398.
- Rougemaille, M., G. Dieppois, *et al.* (2008). "THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association." Cell **135**(2): 308-21.
- Rous, P. (1911). "A Sarcoma Of The Fowl Transmissible By An Agent Separable From The Tumor Cells." J Exp Med **13**(4): 397-411.
- Rowe, M., A. L. Lear, *et al.* (1992). "Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes." J Virol **66**(1): 122-31.
- Ruvolo, V., A. K. Gupta, *et al.* (2001). "Epstein-Barr virus SM protein interacts with mRNA in vivo and mediates a gene-specific increase in cytoplasmic mRNA." J Virol **75**(13): 6033-41.
- Ruvolo, V., E. Wang, *et al.* (1998). "The Epstein-Barr virus nuclear protein SM is both a post-transcriptional inhibitor and activator of gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8852-7.
- Sacks, W. R., C. C. Greene, *et al.* (1985). "Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein." J Virol **55**(3): 796-805.
- Semmes, O. J., L. Chen, *et al.* (1998). "Mta has properties of an RNA export protein and increases cytoplasmic accumulation of Epstein-Barr virus replication gene mRNA." J Virol **72**(12): 9526-34.
- Seto, E., L. Yang, *et al.* (2005). "Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARF1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression." J Med Virol **76**(1): 82-8.
- Shannon-Lowe, C., E. Adland, *et al.* (2009). "Features distinguishing Epstein-Barr virus infections of epithelial cells and B cells: viral genome expression, genome maintenance, and genome amplification." J Virol **83**(15): 7749-60.
- Shannon-Lowe, C. D., B. Neuhierl, *et al.* (2006). "Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7065-70.
- Sheaffer, A. K., W. W. Newcomb, *et al.* (2001). "Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation." J Virol **75**(2): 687-98.
- Siggaard, J. H., E. Johansson, *et al.* (2009). "Concerted bifunctionality of the dCTP deaminase-dUTPase from Methanocaldococcus jannaschii: a structural and pre-steady state kinetic analysis." Arch Biochem Biophys **490**(1): 42-9.
- Silver-Key, S. C., T. Yoshizaki, *et al.* (1998). "The Epstein-Barr virus (EBV) SM protein enhances pre-mRNA processing of the EBV DNA polymerase transcript." J Virol **72**(11): 8485-92.
- Sixbey, J. W., E. H. Vesterinen, *et al.* (1983). "Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro." Nature **306**(5942): 480-3.

- Slobod, K. S., G. H. Taylor, *et al.* (2000). "Epstein-Barr virus-targeted therapy for AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system." *Lancet* **356**(9240): 1493-4.
- Smith, K. and M. Laufer (1955). *Advances in virus research*, Elsevier.
- Sommer, P., E. Kremmer, *et al.* (1996). "Cloning and expression of the Epstein-Barr virus-encoded dUTPase: patients with acute, reactivated or chronic virus infection develop antibodies against the enzyme." *J Gen Virol* **77** (Pt 11): 2795-805.
- Sorem, J., T. S. Jardetzky, *et al.* (2009). "Cleavage and secretion of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 promote membrane fusion with B lymphocytes." *J Virol* **83**(13): 6664-72.
- Speck, P., K. M. Haan, *et al.* (2000). "Epstein-Barr virus entry into cells." *Virology* **277**(1): 1-5.
- Stowe, R. P., E. V. Kozlova, *et al.* (2007). "Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging." *Exp Gerontol* **42**(6): 563-70.
- Strasser, K. and E. Hurt (2001). "Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p." *Nature* **413**(6856): 648-52.
- Strasser, K., S. Masuda, *et al.* (2002). "TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export." *Nature* **417**(6886): 304-8.
- Stutz, F., A. Bachi, *et al.* (2000). "REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export." *Rna* **6**(4): 638-50.
- Szakonyi, G., M. G. Klein, *et al.* (2006). "Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein." *Nat Struct Mol Biol* **13**(11): 996-1001.
- Takacs, E., O. Barabas, *et al.* (2009). "Molecular shape and prominent role of beta-strand swapping in organization of dUTPase oligomers." *FEBS Lett* **583**(5): 865-71.
- Takacs, E., V. K. Grolmusz, *et al.* (2004). "A tradeoff between protein stability and conformational mobility in homotrimeric dUTPases." *FEBS Lett* **566**(1-3): 48-54.
- Taniguchi, I. and M. Ohno (2008). "ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56." *Mol Cell Biol* **28**(2): 601-8.
- Tarbouriech, N., M. Buisson, *et al.* (2006) (a). "Structural genomics of the Epstein-Barr virus." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 10): 1276-85.
- Tarbouriech, N., M. Buisson, *et al.* (2005). "The monomeric dUTPase from Epstein-Barr virus mimics trimeric dUTPases." *Structure* **13**(9): 1299-310.
- Tarbouriech, N., F. Ruggiero, *et al.* (2006) (b). "Structure of the Epstein-Barr virus oncogene BARF1." *J Mol Biol* **359**(3): 667-78.
- Terry, L. J., E. B. Shows, *et al.* (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." *Science* **318**(5855): 1412-6.
- Terry, L. J. and S. R. Wentz (2007). "Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex." *J Cell Biol* **178**(7): 1121-32.
- Thorley-Lawson, D. A. and A. Gross (2004). "Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas." *N Engl J Med* **350**(13): 1328-37.
- Toth, J., B. Varga, *et al.* (2007). "Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme." *J Biol Chem* **282**(46): 33572-82.
- Toth, Z., P. Lischka, *et al.* (2006). "RNA-binding of the human cytomegalovirus transactivator protein UL69, mediated by arginine-rich motifs, is not required for nuclear export of unspliced RNA." *Nucleic Acids Res* **34**(4): 1237-49.
- Tran, H., J. Nourse, *et al.* (2008). "Immunodeficiency-associated lymphomas." *Blood Rev* **22**(5): 261-81.
- Traut, T. W. (1994). "Physiological concentrations of purines and pyrimidines." *Mol Cell Biochem* **140**(1): 1-22.
- Tye, B. K. and I. R. Lehman (1977). "Excision repair of uracil incorporated in DNA as a result of a defect in dUTPase." *J Mol Biol* **117**(2): 293-306.
- Uriel, G., M. Buisson, *et al.* (1989). "The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites." *Embo J* **8**(5): 1447-53.

- Uversky, V. N., J. R. Gillespie, *et al.* (2000). "Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?" *Proteins* **41**(3): 415-27.
- van der Horst, C., J. Joncas, *et al.* (1991). "Lack of effect of peroral acyclovir for the treatment of acute infectious mononucleosis." *J Infect Dis* **164**(4): 788-92.
- Varga, B., O. Barabas, *et al.* (2007). "Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase." *FEBS Lett* **581**(24): 4783-8.
- Varga, B., O. Barabas, *et al.* (2008). "Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor." *Biochem Biophys Res Commun* **373**(1): 8-13.
- Vertessy, B. G. (1997). "Flexible glycine rich motif of Escherichia coli deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase is important for functional but not for structural integrity of the enzyme." *Proteins* **28**(4): 568-79.
- von Itzstein, M., W. Y. Wu, *et al.* (1993). "Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication." *Nature* **363**(6428): 418-23.
- Wadd, S., H. Bryant, *et al.* (1999). "The multifunctional herpes simplex virus IE63 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein K and with casein kinase 2." *J Biol Chem* **274**(41): 28991-8.
- Waldman, W. J., M. V. Williams, Jr., *et al.* (2008). "Epstein-Barr virus-encoded dUTPase enhances proinflammatory cytokine production by macrophages in contact with endothelial cells: evidence for depression-induced atherosclerotic risk." *Brain Behav Immun* **22**(2): 215-23.
- Wang, L. and B. Weiss (1992). "dcd (dCTP deaminase) gene of Escherichia coli: mapping, cloning, sequencing, and identification as a locus of suppressors of lethal dut (dUTPase) mutations." *J Bacteriol* **174**(17): 5647-53.
- Wang, X. and L. M. Hutt-Fletcher (1998). "Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect." *J Virol* **72**(1): 158-63.
- Wang, X., W. J. Kenyon, *et al.* (1998). "Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells." *J Virol* **72**(7): 5552-8.
- Webb, M. R. (1992). "A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 4884-7.
- Williams, M. V. (1988). "Herpes simplex virus-induced dUTPase: target site for antiviral chemotherapy." *Virology* **166**(1): 262-4.
- Williams, M. V., J. Holliday, *et al.* (1985). "Induction of a deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase activity in Epstein-Barr virus-infected cells." *Virology* **142**(2): 326-33.
- Wong, K. M. and A. J. Levine (1986). "Identification and mapping of Epstein-Barr virus early antigens and demonstration of a viral gene activator that functions in trans." *J Virol* **60**(1): 149-56.
- Wong, K. M. and A. J. Levine (1989). "Characterization of proteins encoded by the Epstein-Barr virus transactivator gene BMLF1." *Virology* **168**(1): 101-11.
- Wu, L., C. M. Borza, *et al.* (2005). "Mutations of Epstein-Barr virus gH that are differentially able to support fusion with B cells or epithelial cells." *J Virol* **79**(17): 10923-30.
- Yates, J. L., N. Warren, *et al.* (1985). "Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells." *Nature* **313**(6005): 812-5.
- Yonekura, S., N. Nakamura, *et al.* (2009). "Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA." *J Radiat Res (Tokyo)* **50**(1): 19-26.
- Young, K. A., A. P. Herbert, *et al.* (2008). "Molecular basis of the interaction between complement receptor type 2 (CR2/CD21) and Epstein-Barr virus glycoprotein gp350." *J Virol* **82**(22): 11217-27.
- Young, L. S., C. W. Dawson, *et al.* (1988). "Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma." *J Gen Virol* **69** (Pt 5): 1051-65.

- Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nat Rev Cancer **4**(10): 757-68.
- Zhao, B. and C. E. Sample (2000). "Epstein-barr virus nuclear antigen 3C activates the latent membrane protein 1 promoter in the presence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 through sequences encompassing an spi-1/Spi-B binding site." J Virol **74**(11): 5151-60.
- Zhou, Z., L. J. Licklider, *et al.* (2002). "Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome." Nature **419**(6903): 182-5.
- Zhou, Z., M. J. Luo, *et al.* (2000). "The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans." Nature **407**(6802): 401-5.
- zur Hausen, A., A. A. Brink, *et al.* (2000). "Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF1 gene." Cancer Res **60**(10): 2745-8.
- zur Hausen, H., F. J. O'Neill, *et al.* (1978). "Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA." Nature **272**(5651): 373-5.
- zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, *et al.* (1970). "EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx." Nature **228**(5276): 1056-8.

Résumé

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un gamma herpesvirus humain largement répandu dans le monde. Il est responsable de la mononucléose infectieuse et associé à diverses pathologies lymphoprolifératives. L'une des protéines lytiques précoces d'EBV est la dUTPase, enzyme hydrolysant le dUTP en dUMP prévenant ainsi sa mésincorporation dans l'ADN. Les structures cristallographiques et les études enzymatiques de plusieurs mutants de cette protéine ont permis d'étudier le mécanisme catalytique en détail. Le motif C-terminal et notamment le résidu phénylalanine conservé sont essentiels à l'activité de l'enzyme contrairement au pont disulfure reliant les deux extrémités de la dUTPase. Le magnésium, cofacteur de la réaction est impliqué dans l'affinité pour le substrat. Ces éléments permettent d'avoir une vision précise du fonctionnement de cette enzyme. Nous avons étudié une autre protéine précoce du cycle lytique, EB2, facteur d'export des ARNm viraux. Les complexes décrits dans la littérature n'ont pas pu être clairement reproduits dans nos conditions expérimentales. Toutefois nos travaux ont permis d'optimiser les conditions de purification de deux constructions C-terminales de la protéine et les analyses biophysiques soulèvent des questions sur l'état d'oligomérisation de cette protéine, ces hypothèses étant intéressantes à développer par la suite.

Mots clés : Structure cristallographique, enzyme, EBV

Summary

Epstein Barr virus (EBV) is a human gamma herpesvirus largely present worldwide. It is the causative agent of infectious mononucleosis and associated with various lymphoproliferative syndromes. An early protein of EBV's lytic cycle is the dUTPase enzyme, catalyzing the hydrolysis of dUTP into dUMP, thus preventing its misincorporation into DNA. Crystal structures of various mutants of this enzyme, based on the structure of the native enzyme allowed us to study its precise catalytic mechanism. The C-terminal motif and especially a conserved phenylalanine residue are essential for dUTPase activity, but no particular role was revealed for the disulphide bond linking N and C-termini. The magnesium ion, cofactor of the reaction plays a role in substrate affinity. We studied another early protein of the lytic cycle, the viral mRNA export factor EB2. In the conditions used in our studies, we could not reproduce the complexes with cellular partners previously described. Our work allowed us to optimise purification conditions of two C-terminal constructs of EB2 and the biophysical assays raised interesting questions concerning potential oligomerisation state of the protein. This hypothesis is an interesting point to be developed by further studies.

Key words: Crystal structure, enzyme, EBV