



Etude structurale et fonctionnelle de l'ARN-polymérase du virus de la grippe

Alexandre Monod

► To cite this version:

Alexandre Monod. Etude structurale et fonctionnelle de l'ARN-polymérase du virus de la grippe. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GREN045 . tel-01343874

HAL Id: tel-01343874

<https://theses.hal.science/tel-01343874>

Submitted on 10 Jul 2016

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Alexandre MONOD

Thèse dirigée par le **Docteur Guy SCHOEHN**
et co-dirigée par le **Docteur Thibaut CREPIN**

préparée au sein de l'**Unit of Virus Host Cell Interaction (UVHCI)**,
RNA viruses group, Professeur Rob RUIGROK
et de l'**Institut de Biologie Structurale (IBS)**

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV)

Etude Structurale et Fonctionnelle de l'ARN-polymérase du virus de la grippe

Thèse soutenue publiquement le **06 Novembre 2014**,
devant le jury composé de :

Professeur Patrice GOUET

PR, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Rapporteur, Président du jury

Docteur Bernard DELMAS

DR1, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, Rapporteur

Docteur Nadia NAFFAKH

DR2, Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, Examineur

Docteur Guy SCHOEHN

DR2, Institut de Biologie Structurale, Directeur de thèse

Docteur Thibaut CREPIN

CR1, Unit of Virus Host Cell Interaction, Co-directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont en tout premier lieu vers le professeur Rob Ruigrok qui a accepté, il y a plus de quatre ans, de m'accueillir dans son laboratoire au sein de l'UVHCI. Il m'a réservé un accueil qui m'a permis de m'intégrer à sa si sympathique équipe. J'ai pour lui une grande admiration et une estime qui ne l'est pas moins.

Je réserve des remerciements tout particuliers à mes deux directeurs de thèse, les docteurs Guy Schoehn et Thibaut Crépin pour m'avoir accompagné dans chaque étape de ma vie de doctorant. Ils m'ont appris la méthode, la rigueur, le sens des responsabilités et m'ont conforté dans l'idée que l'on n'était pas scientifique, chercheur par hasard. Ils m'ont appris l'investissement dans le travail, m'ont fait découvrir, le plaisir de l'aboutissement mais aussi la réflexion face à l'échec dans les tâches initiales d'un projet. Pour la confiance que vous m'avez accordée, je ne vous remercierai jamais assez.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du groupe. Je voudrais traduire par quelques mots le plaisir que j'ai eu à travailler parmi vous et avec vous :

Sylvie Chenavas, pour cette accroche immédiate avec une collègue devenue une amie.

Christopher Swale, pour le vrai duo au diapason que nous avons formé dans tous les domaines.

Laura Tengo, pour notre complicité qui, j'en suis persuadé, va se poursuivre.

Alice Tissot, pour nos savoureux délires et fous rires laborantins.

Pour son accueil particulièrement sympathique, je remercie l'ensemble de l'UVHCI. Je garderai un chaleureux souvenir des pauses café et des repas de midi joyeux et animés.

Pour leur accueil et les nombreuses heures passées au microscope, je remercie le groupe de microscopie électronique de l'IBS.

Je tiens également à remercier le groupe d'Imre Berger, en particulier Frederic Garzoni pour son aide quotidienne.

Merci également aux groupes des docteurs Stephen Cusack et Darren Hart pour les intéressantes discussions que nous avons pu avoir.

Mes vifs remerciements à l'ESRF, aux plateformes de biophysique et HTX ainsi qu'à l'ensemble du PSB pour l'environnement de travail exceptionnel qu'il offre et dont j'ai pu profiter.

Mes remerciements vont bien sur à nos collaborateurs, Murielle Salomé (ESRF, ID21), Nadia Naffakh, Sandie Munier et Guillaume Fournier (Institut Pasteur, Paris) pour l'exceptionnel accueil qu'ils m'ont réservé et leur sens de la transmission.

Je ne pouvais terminer sans remercier Monsieur le Professeur Patrice Gouet, Monsieur le Docteur Bernard Delmas et Madame le Docteur Nadia Naffakh qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les membres de mon jury de thèse.

De l'expérience fabuleuse que représente une thèse de sciences, je retire un enrichissement certain, sur le plan technique, scientifique bien sûr, mais aussi sur le plan personnel et humain puisque j'ai eu l'immense chance de commencer mon apprentissage de « chercheur » avec des personnes passionnées, véritablement concernées par leur projet et impliquées dans leur travail. J'ai eu la double chance de travailler dans un environnement scientifique d'exception avec des gens exceptionnels.

A tous et pour tout cela, encore merci.

Alexandre

A mes parents,

A Tatïe et Tonton Gilbert,

A Claire,

A ma grand-mère,

A mes maîtres,

le bâtonnier Jean Nantermoz qui me manque,

Alain Pinon toujours à mes côtés

A tous ceux qui comptent ou qui ont compté pour moi,

A ma famille.

A mes amis.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1	INTRODUCTION.....	1
1.1	LA GRIPPE, GENERALITES	1
1.1.1	LES VIRUS DE LA GRIPPE	1
1.1.2	ELEMENTS D'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA GRIPPE.....	2
	LA LUTTE CONTRE LA GRIPPE	6
1.2	STRUCTURE DU VIRUS DE LA GRIPPE ET EVOLUTION.....	7
1.2.1	ORGANISATION DE LA PARTICULE VIRALE	7
1.2.2	GENOME ET PROTEINES DU VIRUS INFLUENZA A	9
1.2.2.A	SEGMENT 2.....	10
1.2.2.B	SEGMENT 3.....	11
1.2.2.C	SEGMENT 4.....	11
1.2.2.D	SEGMENT 5.....	12
1.2.2.E	SEGMENT 6.....	14
1.2.2.F	SEGMENT 7.....	14
1.2.2.G	SEGMENT 8.....	16
1.2.3	LE CYCLE VIRAL	18
1.3	LA GRIPPE, ZOONOSE ET EVOLUTION	23
1.3.1	GENETIQUE ET EVOLUTION	23
1.3.2	LA GRIPPE, UNE ZOONOSE	25
1.4	L'ARN- POLYMERASE ARN-DEPENDANTE, ZOOM SUR LE CŒUR DU VIRUS	27
1.4.1	LA TRANSCRIPTION	27
1.4.2	LA REPLICATION	28
1.4.3	TRANSCRIPTION <i>VERSUS</i> REPLICATION.....	31
1.4.4	LES 3 SOUS-UNITES, ASSEMBLAGE ET FONCTIONS	32
1.4.4.A	LA SOUS-UNITE PA, ACTIVITE ENDONUCLEASE	35
1.4.4.B	LA SOUS-UNITE PB1, ACTIVITE POLYMERASE	35
1.4.4.C	LA SOUS-UNITE PB2, FIXATION DE LA COIFFE ET ADAPTATION A L'HOTE.....	36
1.5	OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	38
CHAPITRE 2	MATERIEL ET METHODES	41
2.1	STRATEGIE DE CLONAGE DE L'ARN-POLYMERASE POUR LE SYSTEME D'EXPRESSION EN BACULOVIRUS	42
2.2	EXPRESSION DE L'ARN-POLYMERASE EN CELLULES D'INSECTE	44
2.3	PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE	44
2.3.1	HETEROTRIMERE TRONQUE (PA-PB1-PB2NTER).....	44
2.3.2	PACTER-PB1ΔCTER.....	44
2.3.3	PURIFICATION DES CONSTRUCTIONS EN PRESENCE D'ARN	45
2.3.4	FRACTIONNEMENT CYTOPLASMIQUE / NUCLEAIRE	45
2.4	WESTERN BLOT.....	46
2.5	PRODUCTION D'ARN_v PAR TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i>.....	46
2.5.1	TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i> PAR LA T7 POLYMERASE	47
2.5.1.A	CONCEPTION DES MATRICES ADN POUR LA TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i>	47
2.5.1.B	REACTION DE TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i>	47
2.5.2	PURIFICATION DE L'ARN PRODUIT SUR GEL DENATURANT	48
2.6	DIFFUSION DE LUMIERE LASER A ANGLES MULTIPLES ET REFRACTOMETRIE (SEC-MALLS-RI).....	50
2.7	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	50
2.7.1	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN COLORATION NEGATIVE	50
2.7.1.A	PREPARATION DES ECHANTILLONS	50
2.7.1.B	ACQUISITION ET TRAITEMENT DES IMAGES	50

	2.7.2	CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	50
	2.7.2.A	PREPARATION DES ECHANTILLONS	50
	2.7.2.B	ACQUISITION ET TRAITEMENT DES IMAGES	50
	2.7.2.C	METHODE GRAFIX.....	50
	2.8	TEST DE STABILITÉ THERMIQUE : TSA (THERMAL SHIFT ASSAY)	51
	2.9	DIFFUSION DES RAYONS-X AUX PETITS ANGLES (SAXS).....	51
	2.10	CRISTALLOGRAPHIE RAYONS-X	52
	2.11	ACTIVITE ENDONUCLEASE	52
	2.12	ACTIVITE DE SYNTHÈSE D'ARN.....	52
	2.13	MESURES DES AFFINITÉS ARN-POLYMERASE:ARN	52
	2.13.1	ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	52
	2.13.2	FILTER BINDING ASSAY (MESURE DES AFFINITÉS SUR FILTRE)	53
	2.14	MICROSCOPIE RAYONS-X	54
	2.14.1	PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE RAYONS-X.....	54
	2.14.2	EXPERIENCE DE MICROSCOPIE RAYONS-X	55
CHAPITRE 3		EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE DU VIRUS DE LA GRIPPE .	57
	3.1	SYSTEME D'EXPRESSION EN CELLULES D'INSECTE.....	58
	3.2	BILAN DES CONSTRUCTIONS REALISEES	60
	3.3	FRACTIONNEMENT NUCLEAIRE / CYTOPLASMIQUE	62
	3.4	PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE	63
	3.4.1	EXPRESSION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE	63
	3.4.2	PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE.....	63
	3.4.3	CARACTERISATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE.....	65
	3.4.3.A	EXPERIENCE DE DIFFUSION DE LUMIERE LASER A ANGLES MULTIPLES ET REFRACTOMETRIE	65
	3.4.3.B	EFFET DE L'ARN SUR L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE	67
	3.4.4	PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE EN PRESENCE D'ARN	68
	3.5	PURIFICATION DE PACTER-PB1ΔCTER	70
	3.5.1	EXPRESSION DE PACTER-PB1ΔCTER.....	70
	3.5.2	PURIFICATION DE PACTER-PB1ΔCTER	70
	3.5.3	CARACTERISATION DE PACTER-PB1ΔCTER PAR SEC-MALLS-RI.....	71
	3.6	DISCUSSION ET CONCLUSION	73
CHAPITRE 4		ETUDE STRUCTURALE	75
	4.1	ETUDE DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	76
	4.1.1	COLORATION NEGATIVE.....	76
	4.1.1.A	PRINCIPE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	76
	4.1.1.B	RECONSTRUCTIONS 3D OBTENUES EN COLORATION NEGATIVE	77
	4.1.2	CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	79
	4.1.2.A	PRINCIPE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	79
	4.1.2.B	RECONSTRUCTION 3D DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE NON DIMERIQUE	79
	4.1.2.C	CRYO-ME SUR LE DIMERE D'HETEROTRIMERES.....	80
	4.1.3	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	83
	4.2	ETUDES PAR LES RAYONS-X	85
	4.2.1	ETUDE PAR SAXS DE PACTER-PB1ΔCTER.....	85
	4.2.1.A	PRINCIPE	85
	4.2.1.B	TRAITEMENT DES DONNEES SAXS OBTENUES	86
	4.2.1.C	ENVELOPPE SAXS DE PACTER-PB1ΔCTER.....	88
	4.2.2	ETUDE PAR CRISTALLOGRAPHIE RAYONS-X DE PACTER-PB1ΔCTER	89
	4.2.2.A	PRINCIPE DE LA CRISTALLOGENESE	89

	4.2.2.B	CRISTALLOGENESE INITIALE AVEC ET SANS ARN	90
	4.2.2.C	PRODUCTION DES CRISTAUX DE PACTER-PB1ΔCTER	92
	4.2.2.D	VERIFICATION DE LA COMPOSITION DES CRISTAUX OBTENUS	93
	4.2.2.E	DIFFRACTION INITIALE.....	94
	4.2.2.F	STRATEGIE D'AMELIORATION DES CRISTAUX.....	94
	4.2.2.G	ACQUISITION DES DONNEES	98
	4.2.2.H	STRUCTURE DE PACTER-PB1ΔCTER.....	100
	4.2.3	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	100
CHAPITRE 5	ETUDE FONCTIONNELLE	101	
	5.1	TEST D'ACTIVITE ENDONUCLEASE.....	102
	5.2	TEST D'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN.....	104
	5.2.1	LE PROFIL DE TRANSCRIPTION TYPE	105
	5.2.2	CONTROLE DE L'ACTIVITE	106
	5.2.2.A	ACTIVATION DE L'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN	106
	5.2.2.B	INHIBITION DE L'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN	107
	5.2.3	CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN	108
	5.2.3.A	CRIBLAGE DU PH.....	108
	5.2.3.B	CRIBLAGE DES SELS	109
	5.2.3.C	CRIBLAGE DES TEMPERATURES.....	110
	5.2.3.D	MANGANESE VERSUS MAGNESIUM	111
	5.2.4	EFFET DE LA NUCLEOPROTEINE SUR L'ACTIVITE	113
	5.2.5	ESSAIS DE QUANTIFICATION DE L'ACTIVITE	114
	5.2.6	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	115
	5.3	MESURES DES AFFINITES ARN-POLYMERASE:ARN	118
	5.3.1	LES REGIONS PROMOTRICES DE L'ARNV	118
	5.3.2	AFFINITES INITIALES OBTENUES PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	120
	5.3.2.A	PRINCIPE	120
	5.3.2.B	AFFINITES INITIALES POUR LES EXTREMITES CONSERVEES	121
	5.3.2.C	IDENTIFICATION D'UNE REGION POUR LA FIXATION DE L'EXTREMITÉ 3'.....	122
	5.3.2.D	CONCLUSION	122
	5.3.3	AFFINITES OBTENUES PAR FILTER BINDING ASSAY (FBA)	123
	5.3.3.A	PRINCIPE	123
	5.3.3.B	CONFIRMATION DES AFFINITES POUR LES EXTREMITES CONSERVEES.....	124
	5.3.3.C	CONFIRMATION DE L'IMPLICATION DE PB2NTER DANS LA FIXATION DE L'EXTREMITÉ 3'	126
	5.3.3.D	AFFINITE POUR DES ARN « PANHANDLE ».....	126
	5.3.4	DISCUSSION SUR LES AFFINITES.....	127
CHAPITRE 6	DISTRIBUTION CELLULAIRE DES IONS METALLIQUES LORS D'UNE INFECTION PAR LE VIRUS DE LA GRIPPE	129	
	6.1	STRATEGIE DE MESURE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	130
	6.1.1	STRATEGIE EXPERIMENTALE ET PREPARATION DES CELLULES.....	130
	6.1.2	DESSICCATION PAR LA METHODE DU POINT CRITIQUE	131
	6.1.3	FLUORESCENCE DES RAYONS-X	132
	6.2	DISTRIBUTION DU MANGANESE CELLULAIRE LORS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS INFLUENZA A	133
	6.2.1	DISTRIBUTION DU Mn DANS LES CELLULES NON INFECTEES	133
	6.2.2	DISTRIBUTION DU Mn LORS DE L'INFECTION	135
	6.2.3	QUANTIFICATION DU MANGANESE CELLULAIRE.....	136
	6.3	DISCUSSION ET CONCLUSION	137
	CONCLUSION GENERALE	139	

BIBLIOGRAPHIE.....	143
LISTE DES ABREVIATIONS	171
TABLE DES ILLUSTRATIONS	175
LISTE DES TABLEAUX	179
PUBLICATIONS	183

INTRODUCTION

1.1	LA GRIPPE, GENERALITES	1
1.1.1	LES VIRUS DE LA GRIPPE	1
1.1.2	ELEMENTS D'EPIDEMIOLOGIE DE LA GRIPPE.....	2
	LA LUTTE CONTRE LA GRIPPE	6
1.2	STRUCTURE DU VIRUS DE LA GRIPPE ET EVOLUTION	7
1.2.1	ORGANISATION DE LA PARTICULE VIRALE	7
1.2.2	GENOME ET PROTEINES DU VIRUS INFLUENZA A	9
	1.2.2.A SEGMENT 2.....	10
	1.2.2.B SEGMENT 3.....	11
	1.2.2.C SEGMENT 4.....	11
	1.2.2.D SEGMENT 5.....	12
	1.2.2.E SEGMENT 6.....	14
	1.2.2.F SEGMENT 7.....	14
	1.2.2.G SEGMENT 8.....	16
1.2.3	LE CYCLE VIRAL	18
1.3	LA GRIPPE, ZOONOSE ET EVOLUTION	23
1.3.1	GENETIQUE ET EVOLUTION	23
1.3.2	LA GRIPPE, UNE ZOONOSE	25
1.4	L'ARN- POLYMERASE ARN-DEPENDANTE, ZOOM SUR LE CŒUR DU VIRUS	27
1.4.1	LA TRANSCRIPTION	27
1.4.2	LA REPLICATION	28
1.4.3	TRANSCRIPTION <i>VERSUS</i> REPLICATION.....	31
1.4.4	LES 3 SOUS-UNITES, ASSEMBLAGE ET FONCTIONS	32
	1.4.4.A LA SOUS-UNITE PA, ACTIVITE ENDONUCLEASE	35
	1.4.4.B LA SOUS-UNITE PB1, ACTIVITE POLYMERASE	35
	1.4.4.C LA SOUS-UNITE PB2, FIXATION DE LA COIFFE ET ADAPTATION A L'HOTE.....	36
1.5	OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	38

1.1 LA GRIPPE, GENERALITES

1.1.1 LES VIRUS DE LA GRIPPE

Les virus de la grippe sont des virus à ARN simple brin segmenté de polarité négative appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae* (Grec : *orthos*, droit ou correct ; *myxa*, mucus). Cette famille appartient au groupe V des virus à ARN selon la classification de Baltimore (Baltimore, 1971). Cette classification et la définition d'un ARN de polarité négative provient du travail de David Baltimore qui montra que le génome de ce groupe de virus est complémentaire aux ARN messagers (ARNm) qui eux, sont définis comme étant de polarité positive. Le groupe V intègre l'ordre des *Mononegavirales* qui comprend cinq familles de virus (les familles des *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Nyamiviridae*, *Paramyxoviridae* et *Rhabdoviridae*) dont le

génomique est simple brin non segmenté et quatre familles de virus dont le génome ARN est segmenté (les familles des *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Ophioviridae* et celle à laquelle appartiennent les virus influenza, la famille des *Orthomyxoviridae*). D'autres genres de virus à ARN négatif non assignés à une famille rentrent également dans le groupe V.

La famille des *Orthomyxoviridae* comprend six genres (International Committee on Taxonomy of Viruses, <http://www.ictvonline.org/>) :

- *Influenza virus A*
- *Influenza virus B*
- *Influenza virus C*
- *Thogotovirus* qui inclut *Thogoto virus* et *Dhori virus*
- *Isavirus* qui inclut le virus de l'anémie infectieuse du saumon (*Infectious salmon anemia virus*, ISAV)
- *Quarantavirus* qui inclut *Johnston Atoll virus* et *Quarantfil virus*

Les virus de la grippe sont classés en trois types : Influenza virus A, B et C. Leur classification a été initialement basée sur leurs caractéristiques biologiques et épidémiologiques (Ritchey et al., 1976). Le virus influenza de type A est en outre classé en sous-types selon l'antigénicité de deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Actuellement, au moins 18 sous-types de HA (H1 – H18) et 11 sous-types de NA (N1 – N11) sont distingués. Les derniers sous-types H18 et N11 ont été identifiés chez la chauve-souris au Pérou (Tong et al., 2013). Le type B ne présente qu'un seul sous-type de HA et de NA alors que le type C ne possède qu'une seule protéine de surface multifonctionnelle, HEF (Hemagglutinine Esterase Fusion) (Nakada et al., 1984, 1985; Pekosz and Lamb, 1997). La nomenclature actuelle (Bulletin of the World Health Organization, 1980) classe les virus selon le type (A, B ou C), l'hôte d'origine (excepté pour les souches humaines), le site géographique d'isolement, le numéro de souche, l'année d'isolation et le sous-type dans le cas du virus de type A (HxNx). Les travaux conduits lors de ce projet de thèse ont porté sur les souches A/Victoria/3/1975 (H3N2) et A/VietNam/1203/2004 (H5N1).

Le virus de type A possède un large spectre d'infection en ayant pour hôte les oiseaux et différents mammifères dont l'homme. Le virus de type B infecte presque exclusivement l'homme. Il est à l'origine, avec le type A, des grippes saisonnières. Quant au virus de type C, il est essentiellement présent chez l'homme et provoque des maladies des voies respiratoires bénignes.

1.1.2 ELEMENTS D'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA GRIPPE

Les virus de la grippe sont uniques dans leur capacité à causer à la fois des épidémies saisonnières récurrentes d'intensités variables et des pandémies. C'est autour de l'enchaînement d'épisodes épidémiques et d'épisodes pandémiques que l'histoire de la grippe s'est construite.

Les virus influenza accompagnent l'histoire de la santé de l'humanité depuis très longtemps. En 412 av. J-C, Hippocrate décrivait les mêmes symptômes que ceux constatés aujourd'hui lors d'une infection grippale (Chen and Subbarao, 2009). Plusieurs épisodes épidémiques et pandémiques dont les symptômes pourraient correspondre à ceux de la grippe ont été décrits au 16^{ème} et 17^{ème} siècle (Beveridge, 1977; Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats, 2005). Des analyses séro-épidémiologiques et séro-archéologiques ont permis d'attribuer aux virus de la grippe différents épisodes pandémiques ayant eu lieu au 19^{ème} siècle, en particulier ceux de 1889 et de 1900 (Beveridge, 1977; Patterson, 1985; Valleron et al., 2010). Grâce aux progrès techniques en virologie pour l'identification d'agents infectieux, le premier virus de la grippe a été isolé en 1930 (Shope, 1931). Il s'agissait d'un virus

d'origine porcine (A/swine/Iowa/30) et ce n'est qu'en 1933 que le premier virus influenza humain fut isolé (Smith et al., 1933). Etant le premier virus humain de la grippe isolé, il fut nommé virus influenza de type A. En 1940, un virus distinct d'un point de vue antigénique fut isolé et nommé virus influenza de type B (Francis, 1940) alors que le type C a été isolé en 1947 (Taylor, 1949).

La grippe sévit selon un **mode épidémique saisonnier** généralement sur la période automno-hivernale (9 semaines en France) et demeure la première cause d'infection des voies respiratoires (Figure 1).

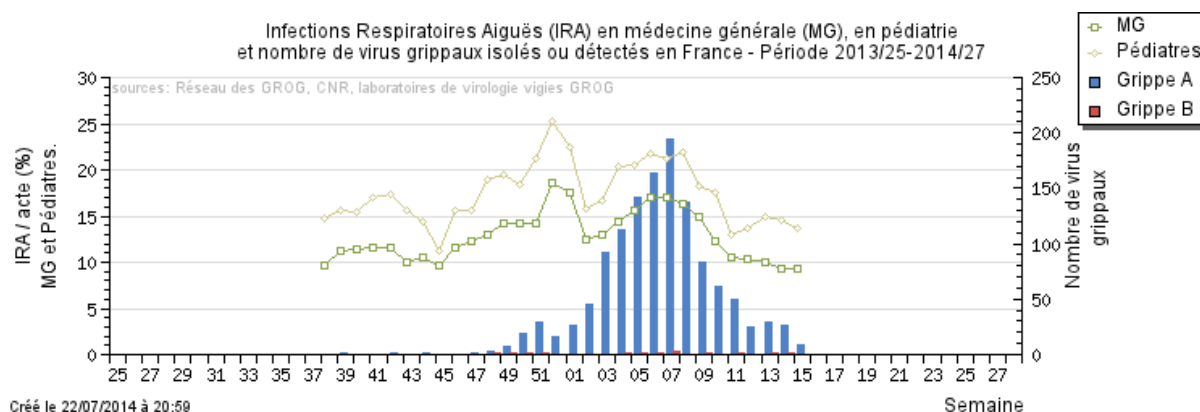


Figure 1 : Grippe saisonnière 2013 / 2014. Représentation graphique du nombre d'Infections Respiratoires Aiguës (IRA) en médecine générale (MG), en pédiatrie et du nombre de virus grippaux isolés ou détectés en France sur la période de grippe saisonnière 2013 / 2014 (GROG).

Depuis 1977 et la réémergence du virus H1N1 de 1918, les souches saisonnières de type A/H1N1 et A/H3N2 circulent ensembles avec les virus de type B (World Health Organization; Wright et al., 2013). Depuis 2009, la souche H1N1 saisonnière a été largement remplacée par la souche pandémique A/H1N1 (Broor et al., 2012; Van-Tam and Sellwood, 2013; World Health Organization; Wright et al., 2013). La prévalence de ces différents groupes de virus varie géographiquement et temporellement rendant l'étude de la circulation globale du virus influenza très complexe.

Réalisées durant plusieurs années, les études antigéniques et génétiques des virus en circulation ont indiquées que les souches épidémiques H1N1 et H3N2 se propagent chaque année à partir des virus ayant pour origine l'Asie du Sud-Est (Bedford et al., 2010; Chan et al., 2010; Russell et al., 2008). Le chevauchement des épidémies en Asie du Sud-Est crée un réseau de propagation conduisant à une circulation continue du virus de foyers épidémiques en foyers épidémiques et ainsi à sa persistance. Les forts flux humains et commerciaux reliant l'Asie du Sud-Est au reste du monde expliquent la dissémination du virus dans les différentes zones du globe aux saisons permettant sa propagation. Les conditions climatiques sont en effet en lien étroit avec la propagation du virus. Dans les zones tropicales, une faible saisonnalité est observée et le virus de la grippe peut circuler tout au long de l'année à l'inverse des zones tempérées (Russell et al., 2008; Viboud et al., 2006). Les conditions d'humidité et de température semblent jouer un rôle essentiel non seulement dans la transmission du virus par aérosols mais aussi pour sa survie sur les supports (McDevitt et al., 2010; Noti et al., 2013).

La grippe est une affection fébrile, le plus souvent bénigne, qui se caractérise par un ensemble de symptômes non spécifiques tels qu'une forte fièvre, une toux sèche, des douleurs musculaires (courbatures) et articulaires accompagnées de céphalées et d'une intense asthénie. En moyenne, les symptômes persistent de 2 à 7 jours. La réponse à l'infection grippale est très personnelle et dépend non seulement de la virulence du virus mais aussi de « l'exubérance » de la réponse inflammatoire qui est à l'origine des symptômes de l'infection (Junge, 2011). Dans les cas les plus sévères, l'affection peut

s'accompagner de complications graves telles que pneumonie avec surinfection bactérienne et déshydratation pouvant conduire au décès.

La transmission interhumaine de la grippe est essentiellement respiratoire via des gouttelettes riches en virus provenant de la toux et des éternuements des personnes infectées. Souvent considérés comme anodins, les virus de la grippe saisonnière touchent entre 5 et 15 % de la population mondiale et tuent entre 250 000 et 500 000 individus (World Health Organization) (Tableau 1). En France, chaque année, on estime qu'environ 1 000 décès sont dus à la grippe. La grippe constitue donc un vrai problème de santé publique et a également un impact économique fort (pertes évaluées à plusieurs milliards de dollars chaque année) notamment par l'absentéisme sur le lieu de travail (Weycker et al., 2005). En France, en période épidémique, près de 70 % des actifs confrontés à la grippe ont en moyenne 4,8 jours d'arrêt de travail provoquant un absentéisme évalué entre deux et douze millions de journées selon l'intensité de l'épidémie (GEIG; GROG). Le coût de la grippe en médecine ambulatoire française (hors hospitalisations et pertes de production) peut atteindre jusqu'à 800 millions d'euros et lors de manifestations plus graves de la maladie, certains secteurs tels que le tourisme, le transport et la vente au détail peuvent même être totalement paralysés (GEIG; GROG).

Tableau 1 : La grippe en chiffres, un problème de santé publique.

Monde			
5 à 15 % de la population touchée	3 à 5 millions de cas sévères	250 000 à 500 000 morts	
France			
2 millions de cas	9 semaines d'épidémie saisonnière	Jusqu'à 800 000 000 € de coûts médicaux ambulatoires	1000 morts

En marge des épidémies saisonnières auxquelles nous sommes confrontés chaque année, **des pandémies** nettement plus meurtrières se sont déjà produites et peuvent se reproduire. Jusqu'à présent, ces pandémies ont été provoquées par le virus influenza de type A. Elles sont la conséquence d'une évolution du virus qui s'accompagne de changements antigéniques relativement rapides et imprévisibles et/ou des réassortiments contre lesquels l'homme n'est pas immunisé.

L'émergence récente de nouveaux virus grippaux tel que le virus A/H1N1 qui a conduit à la pandémie de 2009 (A/H1N1pdm09) et l'apparition de virus plus agressifs comme le virus A/H5N1 rappellent qu'un épisode pandémique peut revêtir un caractère dramatique. L'histoire en est le témoin : l'exemple le plus significatif reste celui de la grippe dite « espagnole », pandémie la plus meurtrière qu'ait connue l'humanité, qui fit au moins 50 millions de morts dans le monde entre 1918 et 1919 et qui, selon certains historiens participa à sceller le sort de la première guerre mondiale. Surnommée « la grande tueuse », elle fit plus de victimes que la guerre elle-même. Il est à souligner que cette grippe, particulièrement contagieuse, tua majoritairement de jeunes adultes à l'inverse de la grippe saisonnière.

Des études récentes se sont intéressées à l'ampleur catastrophique de cette pandémie qu'il convient de replacer dans son contexte. Le début de la pandémie est intervenu sur les derniers mois de la Première Guerre Mondiale alors que des millions de personnes souffraient de famine et de malnutrition. Ce sont donc des organismes affaiblis et vulnérables que le virus de la grippe espagnole a infectés (Song, 2014)

d'autant plus que la vague d'infection la plus importante est intervenue en novembre 1918 quelques jours avant la fin des combats (Jivraj and Butler, 2013). Bien évidemment, à cette époque, aucun agent antiviral n'était connu et le contexte sanitaire couplé au manque de moyens pour le traitement des complications liées à l'infection telles que les surinfections bactériennes expliquent le niveau de morbidité atteint en 1918 (Jivraj and Butler, 2013; Song, 2014).

Le spectre de 1918 a plané sur le monde lors de la pandémie H1N1 de 2009. En vertu d'une virulence imprédictible et du principe de précaution, des mesures sanitaires, souvent critiquées (Song, 2014), ont été adoptées au niveau mondial pour minimiser l'effet de la pandémie. Ces mesures se sont d'une part axées sur une communication simple concernant les modes de transmission et les précautions à prendre par la diffusion de messages clairs et concis sur les procédures à adopter pour minimiser la pandémie (Jivraj and Butler, 2013). D'autre part, les pays industrialisés ont accumulé des stocks d'antiviraux pour d'abord traiter le personnel médical d'intervention (médecins, secouristes, policiers...) et les cas d'urgence et ensuite limiter la propagation virale en traitant la plus large partie de la population possible. A moyen et long terme, des stocks de vaccins ont également été commandés pour pouvoir immuniser la population (World Health Organization, Plan d'Action Global, GAP). Le haut niveau de précaution adopté par les pays industrialisés est un challenge à suivre pour les pays en voie de développement. Beaucoup de pays n'ont ni les infrastructures, ni les ressources nécessaires pour appliquer les procédures mises en place dans d'autres pays. Sous cet angle, les conséquences d'une pandémie par le virus de la grippe dans des populations de pays déjà affaiblies par de mauvaises conditions sanitaires sont un risque qui doit être considéré (Jivraj and Butler, 2013).

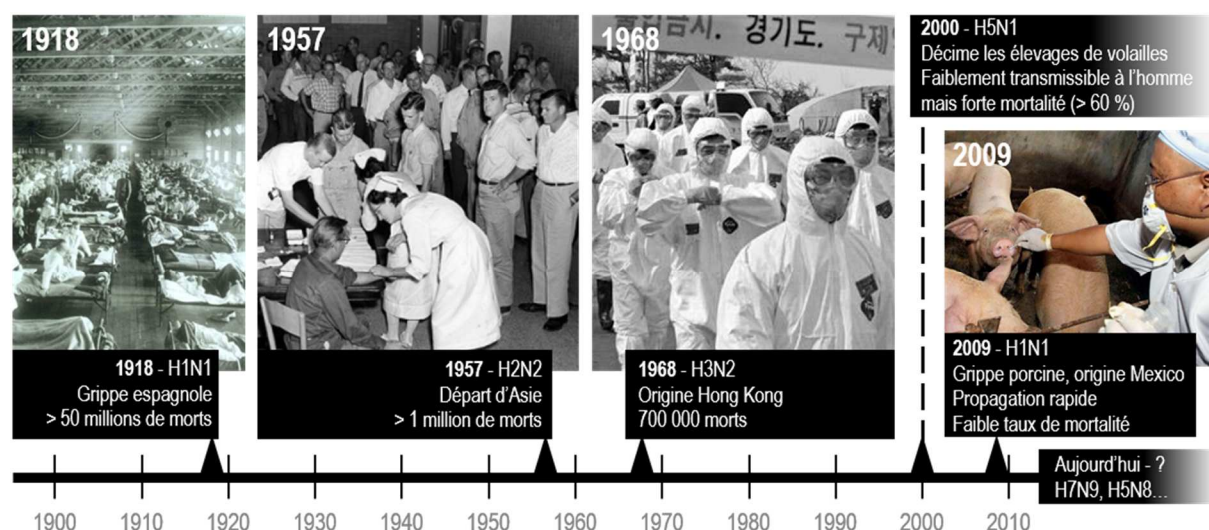


Figure 2 : La grippe, les événements majeurs. Les trois pandémies grippales du 20ème siècle suivies de la première pandémie du siècle actuel. **1918**, militaires du Fort Riley (Kansas) infectés par la grippe dite « espagnole » dans la salle de l'hôpital du Camp Funston (« Camp Funston Influenza Hospital », U.S. Army photographer, www.army.mil). **1957**, des employés en file indienne attendant leur vaccination (« Employees line-up flu shots, 1957 », Art Anderson, LCRA Corporate Archives). **1968**, 10 ans plus tard une souche H3N2 détectée à Hong Kong se propagera jusqu'aux E.U. en quelques mois. Cette souche est toujours circulante aujourd'hui. **2009**, prélèvement nasal effectué sur un porc pour le dépistage du virus de la grippe lors de la dernière pandémie grippale. Le virus H5N1 reste menaçant depuis le début des années **2000**.

Deux autres pandémies ont été recensées en 1957 (A/H2N2) et 1968 (A/H3N2). Certes moins meurtrières, elles représentent environ 2 millions de morts à elles deux. Originaire d'une province du sud de la Chine, la pandémie de février 1957 s'est propagée rapidement à Singapour et Hong Kong en mars et avril 1957 pour atteindre le Japon en mai. Les Etats-Unis et le Royaume-Uni n'ont été touchés qu'en octobre de la même année provoquant 70000 morts rien qu'aux Etats-Unis et plus d'un million dans le monde. Les premiers vaccins contre la grippe sont disponibles depuis la fin de la seconde guerre

mondiale (Artenstein, 2009). Un vaccin a été développé en 1957 contre la souche H2N2 responsable de la pandémie de 1957. Cependant, la faible couverture vaccinale liée au temps de développement du vaccin couplée au manque d'immunité préexistante face à ce nouveau virus explique le fort taux de mortalité observé. Le vaccin contre H2N2 a été administré jusqu'à la fin des années soixante mais de façon discontinue. Seuls les individus de plus de 45 ans aujourd'hui possèdent des anticorps dirigés contre cette souche suggérant qu'un départ de pandémie pourrait émaner du virus H2N2 toujours en circulation chez l'animal (Nabel et al., 2011).

Onze ans plus tard, le virus pandémique A/H2N2 a été complètement remplacé par le sous-type A/H3N2 émergeant d'Asie (Figure 2). Les HA du sous-type H3 partagent moins de 30 % d'identité de séquence avec leur prédécesseur H2. Cependant, la présence d'anticorps préexistants contre N2 dans la population a conduit à une pandémie d'une sévérité plus modérée (Wright et al., 2013). Ce virus est toujours en circulation aujourd'hui (Figure 16, p 25).

Le virus aviaire H5N1 hautement pathogène auquel fait face l'Asie du Sud-Est depuis le début des années 2000, possède une capacité de propagation calquée sur les voies migratoires des oiseaux. Depuis 2003 jusqu'à aujourd'hui, plus de 660 cas humains confirmés d'infection par le virus influenza A/H5N1 ont été rapportés dont presque 400 cas mortels (World Health Organization). Ce virus hautement pathogène qui décime les élevages de volailles reste faiblement transmissible à l'homme mais serait très souvent mortel (60 % de mortalité). Par le jeu des réassortiments géniques sa rencontre avec un virus adapté à l'homme pourrait conduire à l'apparition d'un virus d'un type très virulent.

LA LUTTE CONTRE LA GRIPPE

Le fort potentiel mutagène du virus influenza en fait une véritable cible mouvante pour les scientifiques. A l'heure actuelle, la vaccination reste la meilleure protection contre la grippe saisonnière. La variabilité des souches en circulation oblige l'actualisation annuelle du vaccin. En se basant sur les virus circulants, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, World Health Organization) essaie d'estimer chaque année les souches qui seront à l'origine de la grippe saisonnière et, sous ses recommandations, les industriels produisent en quelques mois le vaccin répondant à une formule actualisée du virus. Des vaccins inactivés et vivants atténués sont disponibles contre les virus influenza saisonniers. Les vaccins sont actuellement souvent trivalents : ils contiennent deux virus de type A correspondant aux sous-types A/H1N1 et A/H3N2 et un virus de type B (World Health Organization). Les vaccins quadrivalents intègrent un autre virus de type B. Leur composition est déterminée grâce au statut immunitaire des populations et aux informations antigéniques et génétiques des virus circulants dans les différents foyers épidémiques. Globalement, les recommandations de composition vaccinale pour la future saison grippale dans un hémisphère sont basées sur les observations des souches qui circulent dans l'autre hémisphère pendant la saison de grippe. Fin septembre, l'OMS, sur la base des observations au démarrage de la saison grippale de l'hiver de l'hémisphère nord, publie ses recommandations pour la saison grippale de l'hiver de l'hémisphère sud démarrant en février-mars de l'année suivante. La saison de grippe de l'hémisphère sud permettra quant à elle la publication des recommandations pour l'hiver suivant de l'hémisphère nord et ainsi de suite, un hémisphère servant alors de réservoir « témoin » pour l'autre et inversement.

Malheureusement, en cas de pandémie, la vaccination n'est pas une stratégie valable pour deux raisons :

- I) Il est impossible de prédire l'origine de la souche virale qui sera responsable d'une pandémie.
- II) Après caractérisation de la souche pandémique, six mois minimum sont nécessaires pour la fabrication d'un vaccin.

Des molécules antivirales ciblant spécifiquement les virus influenza sont disponibles. Il en existe seulement quatre :

- Deux inhibiteurs du canal ionique M2 (Hay et al., 1985) : l'amantadine et la rimantadine (classe de adamantanes). Ces composés sont actifs contre tous les virus de type A mais pas contre les type B et C (Bulletin of the World Health Organization, 1985). La dose d'amantadine ou de rimantadine est prise oralement de façon journalière et aucun effet secondaire significatif n'a été rapporté (Jackson et al., 2011).
- Deux inhibiteurs de la neuraminidase : l'oseltamivir et le zanamivir. L'oseltamivir est pris oralement alors que le zanamivir est inhalé sous forme de poudre. De nombreux effets indésirables ont été rapportés concernant ces inhibiteurs tels que vomissements, douleurs abdominales et nausées (Dutkowski et al., 2003).

Ces quatre inhibiteurs sont distribués à titre prophylactique (Tappenden et al., 2009) dans certains pays malgré l'apparition rapide de virus résistant à ces traitements (Degelau et al., 1992; Englund et al., 1998).

D'autres inhibiteurs sont encore en phases d'essais cliniques : le peramivir (Babu et al., 2000; Hernandez et al., 2011) et le laninamivir (Watanabe et al., 2010; Yamashita, 2010), des inhibiteurs de la neuraminidase, ainsi que le favipiravir (T-705) (Furuta et al., 2005), un inhibiteur spécifique de l'ARN-polymérase virale. Le favipiravir a été homologué en mars 2014 au Japon en tant qu'antiviral contre la grippe et est actuellement en phase de tests cliniques aux Etats-Unis. Fabriqué par une entreprise nipponne (Toyama Chemical, filiale de FujiFilm) il a été proposé à titre de traitement expérimental fin août 2014 contre le virus Ebola qui frappe les pays d'Afrique de l'Ouest. Son efficacité contre le virus Ebola a en effet été récemment montrée chez la souris (Oestereich et al., 2014).

De nombreux variants résistant aux antiviraux commercialisés ont été décrits. L'utilisation en combinaison de deux types d'antiviraux semblerait limiter l'apparition de phénomènes de résistance (Ilyushina et al., 2006). En raison de l'extraordinaire capacité d'adaptation du virus de la grippe, il reste néanmoins urgent de développer de nouveaux antiviraux. C'est pour cette raison que plusieurs groupes scientifiques ont entamé l'étude des protéines impliquées dans les mécanismes réplicatifs et transcriptionnels, en particulier celle de l'ARN-polymérase qui s'affiche en pièce maîtresse du système. Ce projet de thèse s'inscrit dans cette dynamique.

1.2 STRUCTURE DU VIRUS DE LA GRIPPE ET EVOLUTION

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés avec des protéines virales et des virus influenza de type A. Le virus influenza A constituera donc le modèle de référence pour la description du virus de la grippe.

1.2.1 ORGANISATION DE LA PARTICULE VIRALE

Le virus influenza de type A, est un virus enveloppé à ARN monocaténaire segmenté de polarité négative (Figure 3.A). Son enveloppe dérive de la cellule hôte et héberge deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) ainsi que la protéine M2 (Figure 3.B). La protéine de matrice M1 repose juste sous la surface de l'enveloppe. La morphologie des particules virales se distingue par des « épines » caractéristiques directement observables en microscopie électronique en coloration négative (Figure 3.B). Ces « épines », correspondant aux HA et NA, ont une longueur d'environ 10 à 14 nm, avec un ratio d'une NA pour quatre HA (Calder et al., 2010; Fujiyoshi et al., 1994; Harris et al., 2006;

Murti et al., 1992; Noda et al., 2006; Shaw and Palese, 2013). La particule virale sphérique avoisine la centaine de nanomètres mais les virus influenza sont pléomorphes et des particules plus allongées sont souvent observées (Chu et al., 1949).

A l'intérieur de la particule virale se trouve son génome composé de huit segments d'ARN viral (ARNv) recouverts de nucléoprotéines (NP). Chaque segment d'ARN est refermé sur lui-même et ses deux extrémités 3' et 5' conservées sont fixées à l'ARN-polymérase ARN-dépendante du virus qui se compose elle-même de trois sous-unités : protéine acide (PA), protéine basique 1 (PB1) et protéine basique 2 (PB2). L'ensemble ARNv, NP, ARN-polymérase forme un complexe appelé ribonucléoprotéine (RNP) (Figure 3.C et D). La protéine NS2 / NEP (Non Structural Protein / Nuclear Export Protein) est également retrouvée dans la particule purifiée (Richardson and Akkina, 1991).

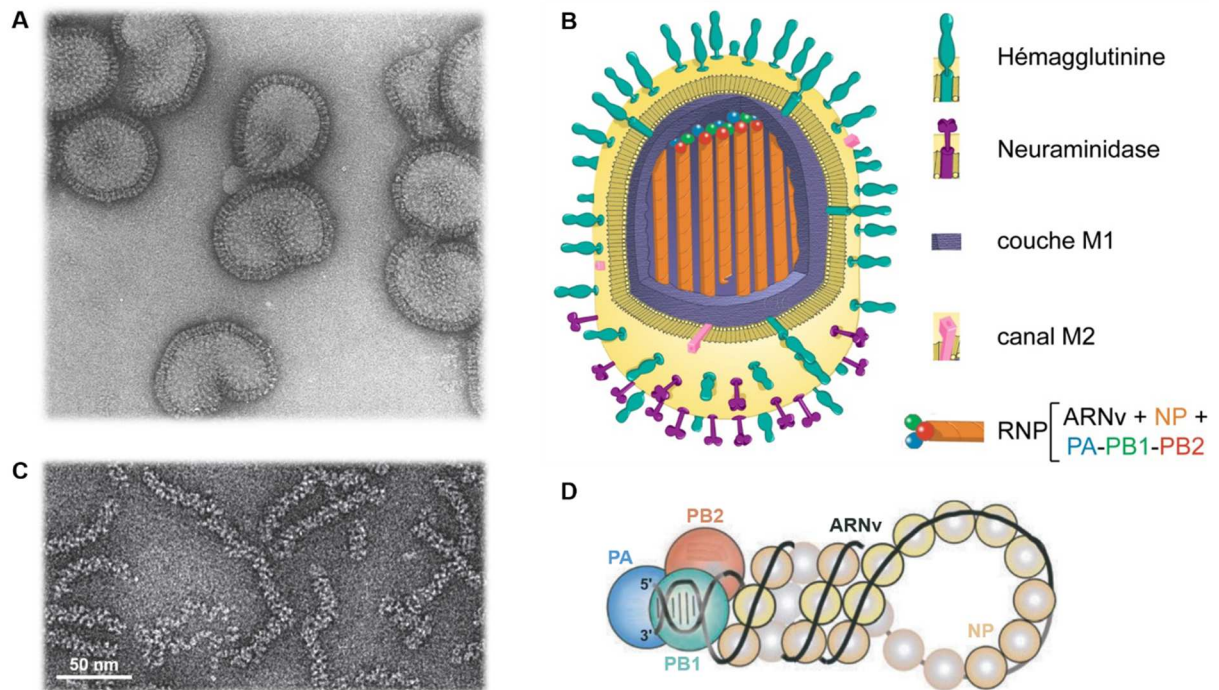


Figure 3 : La particule virale du virus influenza. A/ Photo de particules virales prises en microscopie électronique (Rob Ruigrok, non publié). B/ Représentation schématique d'une particule virale et de ses 8 segments d'ARNv organisés en 8 RNP (Claudia Dominguez (2010), <http://claudiagarabatos.blogspot.com/>). C/ Photo obtenue en microscopie électronique (coloration négative) de RNP purifiées de virions (Ruigrok et al., 2011). D/ Représentation schématique d'une RNP: l'ARNv est encapsidé par les NP et ses extrémités 3' et 5' sont fixées à l'ARN-polymérase (Naffakh et al., 2008).

1.2.2 GENOME ET PROTEINES DU VIRUS INFLUENZA A

Tous les virus de type A et B possèdent huit segments d'ARN alors que ceux de type C en possèdent seulement sept. La taille des huit segments des virus de type A varie de 890 à 2341 nt. Ils sont numérotés de 1 à 8 et nommés d'après la protéine principale pour laquelle ils codent (Figure 4).

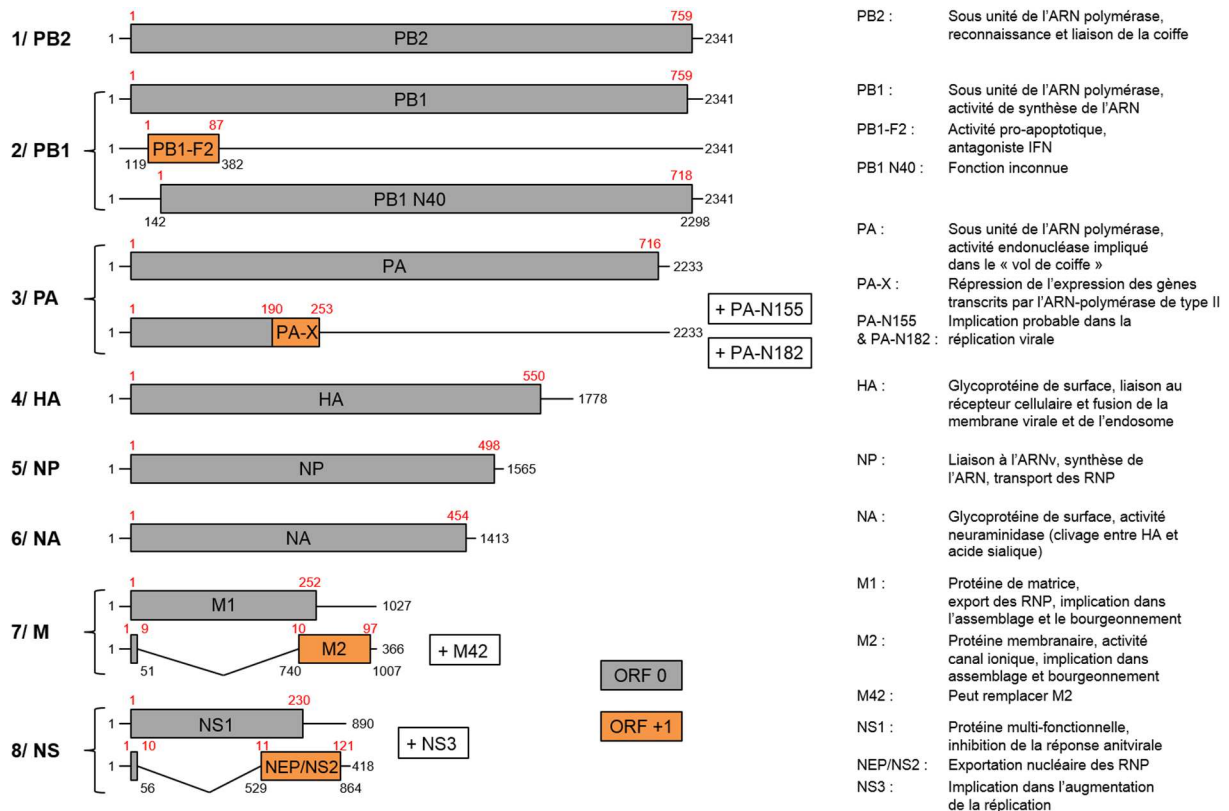


Figure 4 : Organisation du génome des virus influenza A, protéines codées par chaque segment et leurs fonctions. Les nucléotides de chaque segment d'ARN (montrés en polarité positive) sont numérotés en noir et les acides aminés des protéines pour lesquelles ils codent apparaissent en rouge. Les lignes noires aux extrémités 5' et 3' représentent les régions non codantes. Les protéines encodées par le cadre de lecture en 0 apparaissent en gris alors que celles encodées dans le second cadre de lecture en +1 apparaissent en orange. Les introns des ARNm épissés apparaissent en lignes noires en forme de V.

Malgré des tailles différentes, les segments ARN sont tous organisés sur le même schéma (Figure 5). Une phase de lecture centrale codant pour une ou plusieurs protéines est bordée de courtes régions non traduites (UnTranslated Regions, UTR) de 9 à 58 nt. Ces régions non traduites sont différentes pour chaque segment ARNv. Aux extrémités 3' et 5' se trouvent deux séquences U12 et U13, de 12 et 13 nt respectivement. Ces courtes séquences sont hautement conservées entre les segments ARNv d'une même souche virale mais aussi entre les différentes souches de virus influenza A (Desselberger et al., 1980; Gultyaev et al., 2010; Robertson, 1979). La complémentarité partielle qui existe entre les séquences U12 et U13 semble imposer à l'ARNv une structure particulière dont les modèles sont exposés dans la partie 5.3 (p 118). Ces deux extrémités conservées sont indispensables à l'appariement avec l'ARN-polymérase du virus.



Figure 5 : Organisation d'un segment d'ARN viral. La région codante (cadre violet) est flanquée de séquences non codantes spécifiques à chaque segment d'ARNv. Aux extrémités terminales 3' et 5' se trouvent les séquences U12 et U13 hautement conservées entre tous les segments de toutes les différentes souches de virus influenza A.

Les virus de type A présentent la particularité de pouvoir augmenter les capacités codantes de leur génome grâce au mécanisme d'épissage, à des cadres alternatifs de lecture et des décalages du cadre de lecture (Chen et al., 2001; Dubois et al., 2014; Jagger et al., 2012). Ceci conduit à l'expression d'au minimum 10 et d'au maximum 17 protéines virales lors de l'infection (Figure 4).

1.2.2.A SEGMENT 2

Si le segment 1 code uniquement pour la sous-unité PB2, le segment 2 code, en plus de la sous-unité PB1, deux protéines auxiliaires : **PB1-F2** et **PB1 N40**.

La protéine **PB1-F2**, présente chez la plupart des virus influenza de type A, est codée par un cadre de lecture alternatif. Il s'agit d'un court peptide de 87 à 90 résidus découvert en 2001 (Chen et al., 2001). PB1-F2 ne semble pas être incorporée dans les virions (Krumbholz et al., 2011) mais possède de nombreuses fonctions au sein des cellules infectées (Chakrabarti and Pasricha, 2013). Elle est impliquée dans la régulation du complexe de l'ARN-polymérase (Mazur et al., 2008) et dans l'induction de l'apoptose des cellules infectées par perturbation du potentiel de membrane mitochondrial en conduisant à une fuite de cytochrome C dans le cytoplasme. Elle induit aussi l'apoptose des cellules immunitaires et contribuerait à l'échappement du virus au système immunitaire (Chen et al., 2001). PB1-F2 augmente la réponse inflammatoire en dérégulant les cytokines et en modulant l'expression d'interféron (Dudek et al., 2011; Le Goffic et al., 2010; Leymarie et al., 2013; Reis and McCauley, 2013; Varga et al., 2012) et son expression dans les cellules infectées augmente également le risque d'infections bactériennes secondaires (McAuley et al., 2007). Au niveau structural, sa propension à former des feuilletts- β et des fibres amyloïdes aurait un lien avec sa capacité à exacerber la réponse inflammatoire (Chevalier et al., 2010).

Selon la souche, l'hôte ou le type cellulaire, PB1-F2 semble avoir des rôles différents (Chakrabarti and Pasricha, 2013). Son rôle dans la virulence et la pathogénicité est actuellement très discuté. Si 96 % des souches aviaires codent pour une protéine PB1-F2 complète, seulement 7 % des virus H1N1 humains encodent pour PB1-F2 fonctionnelle (Chakrabarti and Pasricha, 2013). Plusieurs études suggèrent d'ailleurs que la perte de PB1-F2 fonctionnelle peut être un bénéfice pour le virus lorsqu'il franchirait la barrière d'espèce pour être transmis à l'homme (DeLuca et al., 2011; Dundon, 2012; Zell et al., 2007) faisant de la perte de PB1-F2 un processus adaptatif potentiel lors de son passage chez le mammifère (McAuley et al., 2010).

Un variant de PB1, appelé **PB1-N40**, tronqué de 39 acides aminés en N-terminal par rapport à PB1, est aussi codé par le segment PB1. Son rôle n'a pas encore été identifié, il est toutefois différent de celui de la sous-unité PB1 car PB1-N40 ne permet ni l'interaction avec la sous-unité PA, ni la transcription des ARNv *in vitro* (Wise et al., 2009, 2011).

1.2.2.B SEGMENT 3

Codée par le segment codant pour la sous-unité PA, la protéine **PA-X** (253 aa) a été découverte en 2012. Elle possède les 190 premiers acides aminés N-terminaux de PA comprenant le domaine endonucléase et son extrémité C-terminale provient d'un décalage du cadre de lecture (Jagger et al., 2012). En dégradant les ARNm cellulaires via son activité endonucléase, PA-X réprime l'expression des gènes transcrits par l'ARN-polymérase II cellulaire et semble entraîner une réduction de la pathogénie (Jagger et al., 2012). Il convient d'ajouter deux autres protéines accessoires codées par le segment 3 et détectées dans des cellules infectées de différents hôtes : **PA-N155** et **PA-N182** (Muramoto et al., 2013). Leur traduction se fait à partir d'autres codons AUG et elles seraient impliquées dans la phase répliquative.

1.2.2.C SEGMENT 4

L'hémagglutinine, codée par le segment 4, est responsable de la reconnaissance spécifique de la cellule hôte, de l'attachement et de la fusion des membranes virales et cellulaires. Elle est synthétisée en un polypeptide (HA0) qui subit un clivage post-traductionnel par des protéases cellulaires. Ce clivage est essentiel pour l'infection car il permet l'exposition de la partie N-terminale hydrophobe de HA (HA2) qui gouverne la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale (Figure 11.4, p 19) (Harrison, 2008; Gamblin and Skehel, 2010). De nombreuses structures de HA sont disponibles. Leurs caractéristiques structurales communes se résument à une tige filamenteuse faite d'un enroulement en triple brin d'hélices- α correspondant à la partie HA2 surmontée d'une tête globulaire correspondant à la partie HA1 faite de trois domaines (Figure 6).

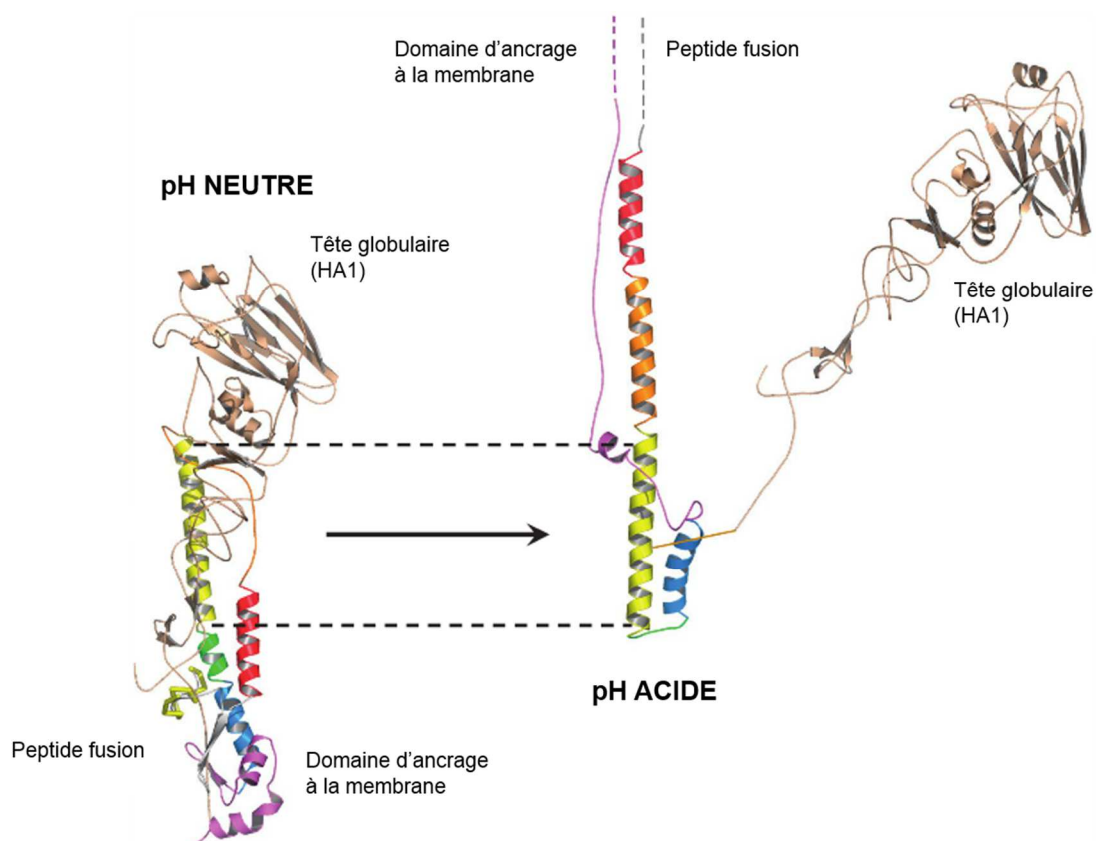


Figure 6 : Changements conformationnels de l'hémagglutinine (HA) à pH acide. Les domaines de HA2 sont représentés en couleurs. A pH acide, la tête globulaire correspondant à la portion HA1 s'éloignerait de la portion HA2 qui subit un changement conformationnel important entraînant l'alignement antiparallèle du peptide fusion et du domaine d'ancrage à la membrane. Ce processus permettrait au peptide fusion de juxtaposer la membrane endosomale à la membrane virale et conduit à la fusion (adaptée de Shaw and Palese, 2013).

HA possède trois fonctions majeures. La première correspond à la fixation sur les récepteurs cellulaires au moment de l'attachement de la particule virale à la cellule hôte. Pour cela, les HA se fixent aux acides sialiques à la surface des cellules pour initier l'infection. Les virus humains fixent préférentiellement les acides N-acétylneuraminiques attachés au pénultième sucre galactose par une liaison $\alpha 2,6$ (S α 2,6Gal) alors que les virus aviaires fixent majoritairement les acides sialiques avec une liaison $\alpha 2,3$ (Connor et al., 1994). Il convient de noter que cette spécificité n'est pas absolue puisque les deux types de liaisons peuvent être rencontrés chez l'homme et les oiseaux. Chez l'homme, les liaisons $\alpha 2,6$ sont présentes dans les parties hautes des voies respiratoires alors que les liaisons $\alpha 2,3$ sont principalement rencontrées au niveau des alvéoles.

La seconde fonction majeure de HA est la fusion pH-dépendante entre la membrane virale et celle endosomale. Lors de l'acidification de l'endosome (Figure 11.3, p 19), le faible pH entraîne des changements conformationnels drastiques au niveau des HA permettant l'exposition du peptide fusion hydrophobe à la membrane endosomale (Figure 6). Ce rapprochement conduit à la fusion des membranes, la présence de plusieurs HA permettant la formation d'un pore au travers duquel les RNP sont libérées dans le cytoplasme.

L'hémagglutinine est synthétisée sous la forme d'un précurseur HA0. Deux groupes de protéases ubiquitaires sont responsables de la maturation de HA0 en HA1 et HA2. Le premier groupe, incluant la plasmine et différentes tryptases, reconnaît une arginine et clive toutes les HA. Le clivage des HA par la plasmine peut même être augmenté par l'habilité de la HA à séquestrer le précurseur de la protéase, la plasminogène (Goto and Kawaoka, 1998). Le second groupe de protéases capable de cliver les HA comprend les endoprotéases furine et PC6 calcium-dépendantes. L'efficacité de leur clivage est déterminée par la séquence du site de clivage de type Q-R/K-X-R/K-R. Un lien direct entre clivabilité et virulence a été démontré (Horimoto and Kawaoka, 1994). Par exemple, les HA0 des virus A/H5N1 aviaires hautement pathogènes contiennent un site de clivage polybasique qui est reconnu par une protéase du réseau trans-Golgien, la furine, protéase ubiquitaire qui vient appuyer une infection virale systémique (Bogs et al., 2010). En revanche, les virus faiblement pathogènes possèdent des HA0 contenant un site monobasique sensible à des protéases de type tryptase, présentes dans le tractus respiratoire et gastro-intestinal confinant l'infection à ces régions de l'organisme.

A la fin du cycle viral, HA participe également avec d'autres protéines virales au processus de bourgeonnement (Rossman and Lamb, 2011; Schmitt and Lamb, 2005).

Du fait de sa présence à la surface du virus, HA est le déterminant antigénique majeur reconnu par le système immunitaire de l'hôte. Suivant l'infection et la réplication, une forte réponse immunitaire est induite engendrant la formation d'anticorps neutralisants. Ces anticorps conduisent à la sélection de variants qui échappent à ces anticorps. Les mutations conduisant à ces variants sont essentiellement retrouvées sur le fragment exposé HA1. Accumulés et fixés dans le temps, ces changements peuvent définir une dérive antigénique du virus influenza. L'évolution antigénique des virus influenza est très suivie en particulier pour le développement des stratégies vaccinales à développer chaque année (Du et al., 2012; Smith et al., 2004; Wan et al., 2014).

1.2.2.D SEGMENT 5

La nucléoprotéine (NP), codée par le segment 5, est un partenaire à part entière du complexe de réplication / transcription. Elle participe à l'architecture de la RNP en recouvrant et protégeant les huit segments d'ARNv. Du point de vue fonctionnel, elle posséderait un rôle clef dans le transport des RNP et la régulation des mécanismes de réplication et de transcription (Portela and Digard, 2002; Naffakh et

al., 2008). Elle pourrait notamment être un élément déterminant du basculement entre les phases transcriptionnelle et répliquative (Skorko et al., 1991). Son intervention lors de la répllication via une interaction avec la sous-unité PB2 a d'ailleurs été établie très récemment (Gui et al., 2014). Un acide aspartique en position 88 (D88) jouerait un rôle clef dans son interaction avec PB2. Ces résultats sont en accord avec des résultats antérieurs suggérant une interaction entre PB2 et l'extrémité N-terminale de NP (Albo et al., 1995; Biswas et al., 1998; Turan et al., 2004).

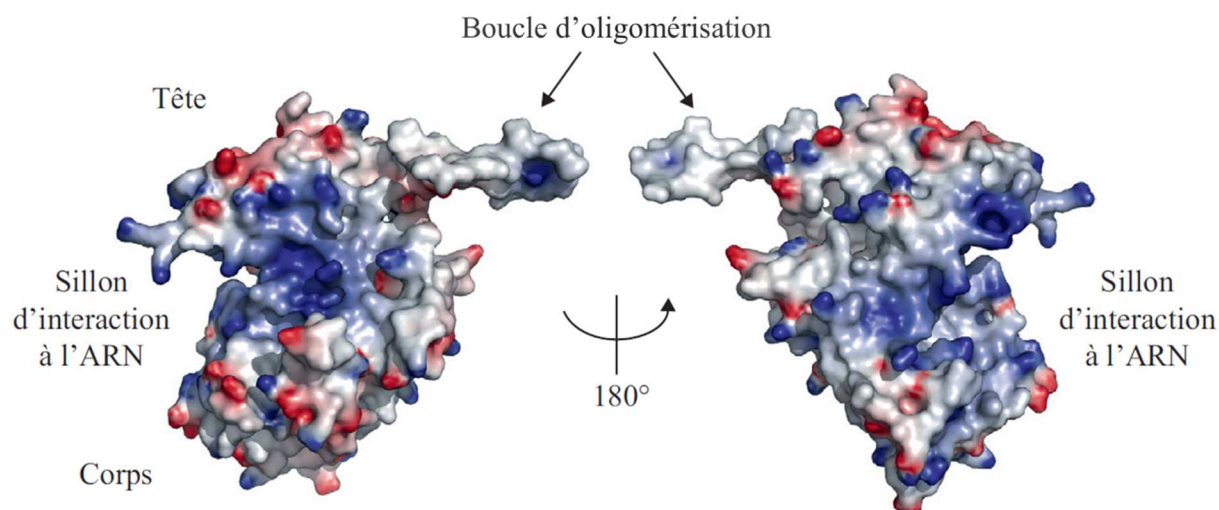


Figure 7 : La nucléoprotéine (NP) du virus de la grippe. Surface électrostatique de NP de la souche humaine H1N1 (PDB 2IQH) montrant la boucle d'oligomérisation ainsi que le sillon chargé positivement correspondant au site potentiel de liaison à l'ARN (Chenavas et al., 2013a).

Au niveau structural, elle présente un repliement différent de celui de NP d'autres virus à ARN négatif (Ruigrok and Crépin, 2010; Ruigrok et al., 2011), tel que le repliement des NP des rhabovirus (Albertini et al., 2006), des paramyxovirus (Tawar et al., 2009) ou des bornavirus (Rudolph et al., 2003). Depuis 2006, quatre structures cristallographiques ont été résolues, toutes en absence d'ARN et sous forme oligomérique. Les structures de NP de type A/H1N1 et A/H5N1 ont été obtenues en trimère (Ng et al., 2008; Ye et al., 2006), celle du type B forme un tétramère (Ng et al., 2012) alors que celle du mutant monomérique R416A a été cristallisée sous forme monomérique (Chenavas et al., 2013b). Quel que soit le type et/ou la souche, NP présente une boucle de 27 résidus exposée à l'extérieur du corps de la protéine permettant l'oligomérisation par échange de domaine. A l'opposé de cette boucle, la surface présente un sillon chargé positivement qui serait un site potentiel d'interaction avec l'ARN (Figure 7).

L'interaction entre NP et l'ARNv et ARNc ne dépend d'aucune séquence nucléotidique ni d'aucun motif consensus (Baudin et al., 1994). La longueur du fragment d'ARN couvert par un protomère de NP est encore sujette à débat. Elle serait de 24 nucléotides (Compans et al., 1972; Ortega et al., 2000; Portela and Digard, 2002). Cette longueur est relativement importante en comparaison à celles de virus à ARN non segmentés comme le virus de la rage ou le virus respiratoire syncytial pour lesquels NP couvre respectivement neuf et sept nucléotides (Albertini et al., 2006; Ruigrok et al., 2011; Tawar et al., 2009). Les données structurales et biochimiques font apparaître NP comme un partenaire dynamique. En fonction de la force ionique, NP peut être stabilisée sous forme monomérique (Tarus et al., 2012). Un fois la forme monomérique stabilisée, il est possible de déplacer l'état oligomérique en présence d'ARN de différentes tailles. Un ARN de 25 nt provoquerait un mélange trimères / tétramères alors qu'un ARN de 51 nt provoquerait la formation d'anneaux de tailles différentes. Ces anneaux semblent très proches dans leur organisation des RNPv dépliées et des mini-RNP recombinantes (Area et al., 2004; Coloma et al., 2009; Ortega et al., 2000). Ceci suggère que l'interaction entre un protomère de NP et l'ARN stabilise sa

boucle d'oligomérisation dans une conformation lui permettant alors d'interagir avec un autre protomère et ainsi d'amorcer un processus d'assemblage similaire à celui rencontré lors de la formation des RNP.

1.2.2.E SEGMENT 6

Codée par le segment 6, la **neuraminidase** est la seconde glycoprotéine majeure des virus influenza A et B. L'activité enzymatique de la neuraminidase est requise pour éliminer les acides sialiques et permettre ainsi la libération du virus de la cellule hôte (Figure 11.13, p 19) (Gamblin and Skehel, 2010). En effet, la particule virale doit être libérée de façon active après que l'enveloppe a été séparée de la membrane cellulaire durant l'étape de bourgeonnement (Rossman and Lamb, 2011; Schmitt and Lamb, 2005). Ceci est dû à l'ancrage des HA aux acides sialiques des récepteurs à la surface cellulaire. L'activité de la neuraminidase est également nécessaire pour éliminer les acides sialiques des particules virales elles-mêmes pour éviter qu'elles ne s'agrègent entre elles. Ce processus constitue un élément majeur pour que le virus puisse se propager (Palese and Compans, 1976; Palese et al., 1974).

Comme HA, NA est antigénique et des variants sont naturellement sélectionnés. Des anticorps dirigés contre NA n'ont toutefois pas d'effet neutralisant mais une immunisation réalisée à partir de préparation de NA a été proposée (Eichelberger and Wan, 2014; Sylte and Suarez, 2009).

1.2.2.F SEGMENT 7

Le segment 7 code pour trois protéines **M1**, **M2** et **M42** encodées par un ARNm épissé. La protéine matricielle **M1** est la plus abondante des protéines de la particule virale et repose juste sous l'enveloppe lipidique. Son analyse structurale fait apparaître deux domaines globulaires composés d'hélices- α et reliées par une région sensible aux protéases (Figure 8.A) (Arzt et al., 2001; Harris et al., 2001; Sha and Luo, 1997). M1 forme des tiges de 6 nm observables en microscopie électronique en coloration négative avec un côté en contact avec la membrane et l'autre pointant vers l'intérieur de la particule virale (Figure 8.B, C, D et E) (Ruigrok et al., 1989, 2000). Il est proposé que M1 joue un rôle capital dans l'assemblage et le recrutement des éléments de la particule virale au site d'assemblage à la membrane (Schmitt and Lamb, 2005; Nayak et al., 2009). Pour cela elle interagirait avec les RNP, NS2 et la queue cytoplasmique de M2 (Chen et al., 2008) en formant un pont entre les composants internes et les protéines membranaires de l'enveloppe virale.

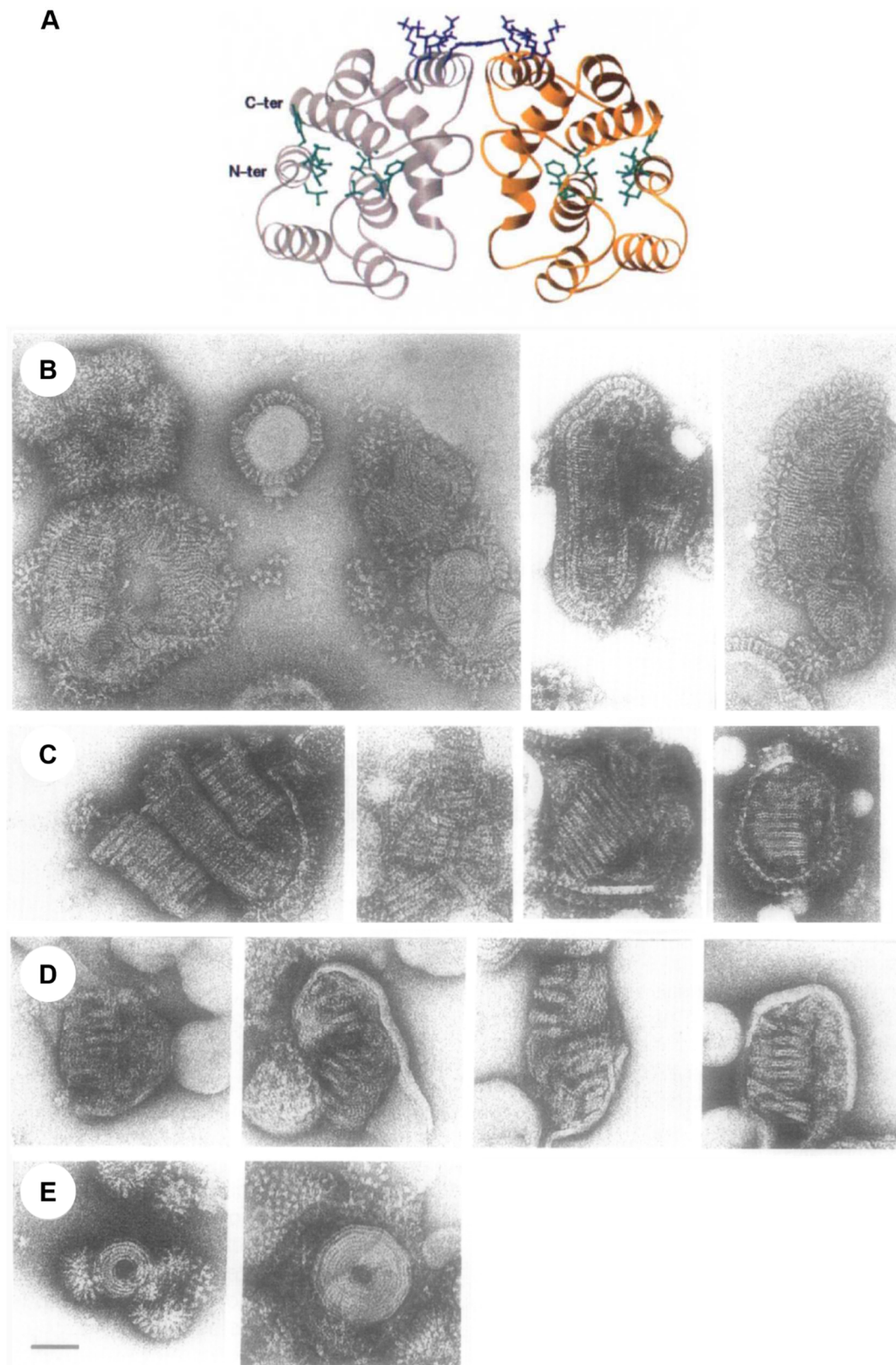


Figure 8 : Structure de la protéine M1 et son organisation au sein de la particule virale. La structure cristallographique de la protéine M1 (A) (Sha and Luo, 1997). Les extrémités N et C-terminales sont notées. Les résidus hydrophobes responsables de la fixation à la membrane sont de couleur verte alors que les résidus positifs sont indiqués en bleu. A la membrane, M1 apparaît sous forme de tiges de 6 nm de long parallèles (B) qui peuvent être organisées en paires (C). L'organisation parallèle et celle en paires peuvent être présentes dans une même particule (D) et une rare organisation circulaire peut être aussi observée (E). La barre d'échelle représente 50 nm (Ruigrok et al., 1989).

M2 est une protéine membranaire de 97 acides aminés fonctionnant en homotétramère (Holsinger and Lamb, 1991; Sugrue and Hay, 1991). Chaque monomère se compose d'un court ectodomaine antigénique N-terminal de 24 acides aminés, d'un domaine transmembranaire en hélice- α et un domaine cytoplasmique de 50 acides aminés qui contient une hélice- α (Pielak and Chou, 2011; Schnell and Chou, 2008). M2 possède une activité de canal ionique. Son rôle principal est de conduire les protons de l'endosome acide vers l'intérieur du virus pour dissocier les RNP du reste des composants de la particule virale et de faciliter l'étape de fusion membranaire avec l'endosome (Pinto and Lamb, 2006). Sa queue cytoplasmique a un rôle dans l'assemblage, le bourgeonnement et la morphogénèse de la particule (Chen et al., 2008; Grantham et al., 2010; Iwatsuki-Horimoto et al., 2006; McCown and Pekosz, 2005, 2006; Rossman and Lamb, 2011; Rossman et al., 2010).

En 2012, la protéine M42 a été découverte. M42 dérive de l'ARNm épissé de M2 mais présenterait un ectodomaine antigénique différent (Wise et al., 2012). Au niveau fonctionnel, M42 semble pouvoir remplacer M2 malgré une localisation intracellulaire différente, M42 étant retenue au niveau de l'appareil de Golgi alors que M2 se place à proximité de la membrane plasmique.

1.2.2.G SEGMENT 8

Le dernier segment (8) code pour la protéine **NS1** (Non Structural protein 1) et son épissage alternatif code pour deux autres protéines : **NS2/NEP** et **NS3** (Non Structural protein 2 et 3).

NS1 est une protéine dimérique nucléaire très exprimée dans les cellules infectées. Elle possède un domaine de fixation à l'ARN double brin (Hale et al., 2008a) localisé dans la partie N-terminale (73 aa) (Cheng et al., 2009). Les données structurales du domaine de fixation à l'ARN indiquent qu'il forme un homodimère symétrique avec des zones conservées composées de résidus basiques et hydrophiles sur chaque monomère médiant l'interaction avec l'ARN double brin. Des études d'analyses mutationnelles ont suggéré que les résidus basiques établissaient un contact avec le squelette phosphate de l'ARN via des interactions électrostatiques (Cheng et al., 2009). En cohérence avec ce mode d'interaction, des mesures d'affinité ont montré que NS1 reconnaissait l'ARNv à travers la structure de séquences ARNv spécifiques (Marc et al., 2012).

La partie de NS1 restante a été appelée « domaine effecteur ». Ce domaine inclut des sites de fixation à de nombreux facteurs cellulaires. Plusieurs structures du domaine effecteur ont été résolues (Aramini et al., 2011; Bornholdt and Prasad, 2006; Hale et al., 2008b; Kerry et al., 2011a). Alors que les formes monomériques sont structurellement très similaires, la dimérisation présente différentes interfaces suggérant l'existence d'une conformation ouverte s'opposant à une fermée (Kerry et al., 2011b). Finalement, une structure complète de NS1 a été résolue (Figure 9) (Bornholdt and Prasad, 2008). Au lieu de dimères individuels, la structure présente NS1 formant une chaîne à travers des interactions alternées se produisant via le domaine de fixation de l'ARN double brin et les domaines effecteurs (Figure 9.B). De plus, trois de ces chaînes dans le cristal interagissent entre elles pour former une structure tubulaire observable en cryo-microscopie électronique capable d'accueillir un ARN double brin en son centre et ainsi d'augmenter les capacités de fixation des ARN double brin (Figure 9.C et D). La fixation des ARN permet d'éviter leur rencontre avec des récepteurs inducteurs de la voie des interférons.

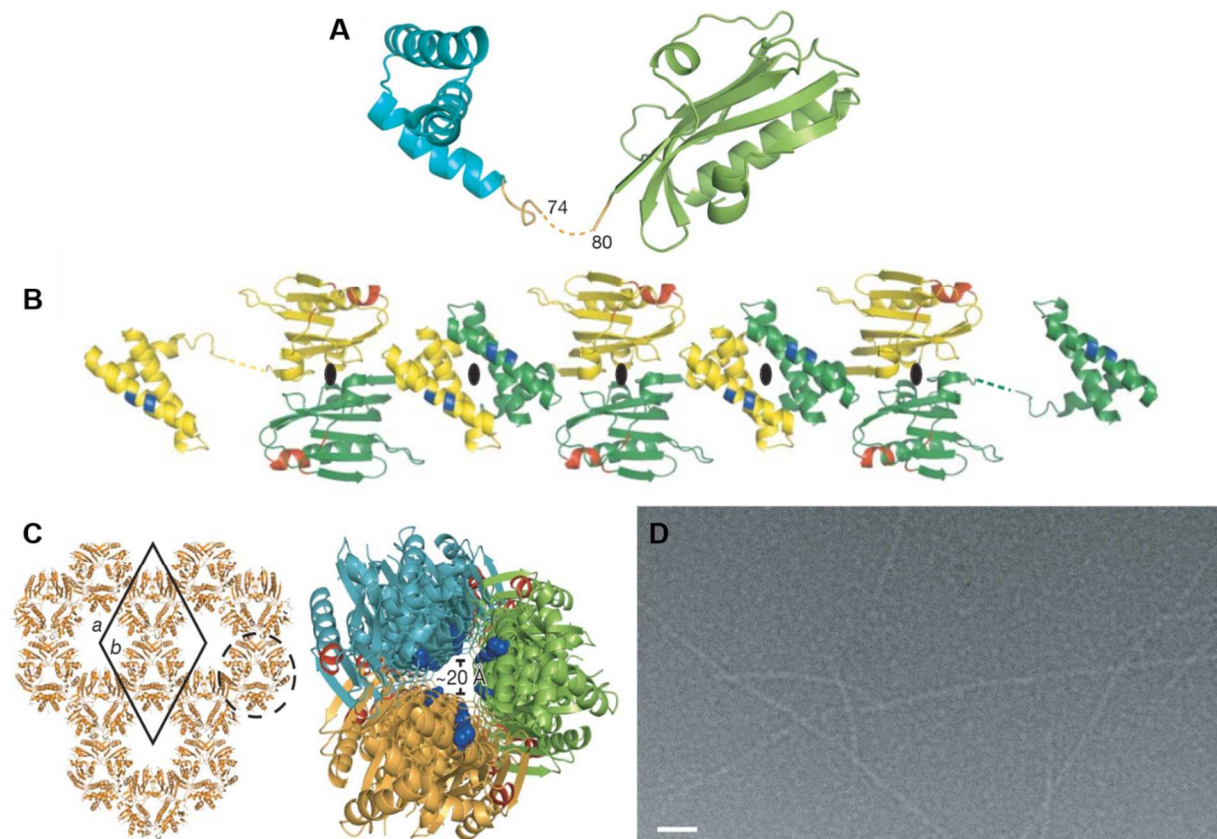


Figure 9 : Structure et organisation de la protéine NS1. **A/** Représentation de la structure de NS1 (H5N1). Le domaine de fixation de l'ARN (bleu) est relié au domaine effecteur (vert) par une courte région de connexion (orange). **B/** Formation des chaînes de NS1 dans le cristal. Les domaines de fixation à l'ARN et domaines effecteurs de chaque molécule NS1 interagissent séparément avec leurs domaines respectifs sur les molécules NS1 voisines pour former une chaîne. Les résidus essentiels pour la fixation de l'ARN sont colorés en bleu. Les ellipses noires indiquent un axe cristallographique d'ordre deux perpendiculaire à la feuille. **C/** A gauche, vue d'une partie de l'organisation cristalline des molécules de NS1 selon l'axe cristallographique *c*. L'unité asymétrique (losange noir) avec les axes *a* et *b* est représentée comme référence. A droite, structure tubulaire de NS1 (~ 65 Å de diamètre) vue dans la longueur montrant un tunnel d'environ 20 Å de diamètre. Chacune des trois chaînes formant le tunnel est colorée différemment (orange, vert et bleu). Les résidus essentiels pour la fixation de l'ARN sont montrés en sphères bleues foncées et apparaissent tous à l'intérieur du tunnel. **D/** Images de NS1 obtenues en cryomicroscopie électronique en présence d'ARN double brin. De longues structures tubulaires d'environ 70 nm de diamètre peuvent être observées. La barre d'échelle correspond à 500 nm (Bornholdt and Prasad, 2008).

Du point de vue fonctionnel, NS1 est un facteur de virulence non-essentiel qui possède de multiples fonctions accessoires durant l'infection. Un de ses rôles majeurs concerne l'inhibition des réponses immunitaires de l'hôte, en particulier la limitation de la production d'interférons et des effets antiviraux de protéines induites par ces derniers (Hale et al., 2008a, 2010; Wolff and Ludwig, 2009). En effet, quand le virus de la grippe infecte une cellule, il doit se battre avec une très rapide attaque de la réponse immunitaire innée de l'hôte dont la mission est d'établir un état antiviral dans la cellule et de prévenir la réplication virale. L'interféron de type I (IFN- α/β) sécrété par les cellules infectées est un composant critique de cette réponse et constitue le talon d'Achille de tous les orthomyxovirus qui sont très sensibles aux effets inhibiteurs de protéines induites par les IFN, comme les Mx GTPases par exemple (Haller et al., 2009). Plusieurs études suggèrent aussi que NS1 agirait directement sur les cycles réplcatif et transcriptionnel (Hale et al., 2008a).

L'épissage de l'ARNm de NS1 conduit à la traduction de la protéine **NEP** (Nuclear Export Protein) (appelée dans un premier temps NS2 pour Non Structural protein 2). NEP ainsi que la protéine M1 seraient impliquées dans l'export nucléaire des RNP (Cros and Palese, 2003; Boulo et al., 2007) en recrutant la machinerie cellulaire d'export. En de très faibles quantités, elle fait partie des protéines virales retrouvées dans la particule virale (Richardson and Akkina, 1991; Ward et al., 1995; Yasuda et al., 1993).

En plus de ce rôle, NEP contribue au processus de bourgeonnement à travers son interaction avec une ATPase cellulaire (Gorai et al., 2012). Structuralement, NEP peut être divisée en un domaine N-terminal sensible aux protéases et un domaine C-terminal résistant aux protéases dont la structure a été déterminée (Akarsu et al., 2003). Ce domaine très structuré est constitué de deux hélices- α antiparallèles C1 (aa 64 à 85) et C2 (aa 94 à 115) connectées par une boucle inter-hélices (Figure 10). Son interaction avec la partie N-terminale n'est pas connue et cette conformation conduit à un domaine amphiphile avec une face hydrophile opposée à une autre hydrophobe. C'est au niveau d'un tryptophane hydrophobe proéminent sur la face hydrophile que l'interaction avec M1 se ferait (Akarsu et al., 2003). Désormais, des études tendent à montrer son implication dans les processus réplcatif et transcriptionnel (Paterson and Fodor, 2012).

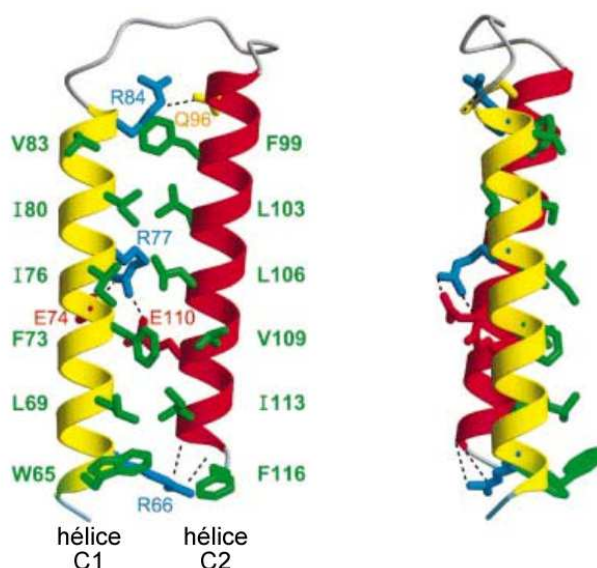


Figure 10 : Structure du domaine C-terminal de NEP/NS2. Les résidus hydrophobes impliqués dans les interactions entre les deux hélices sont représentés en vert. Sont également représentés : la liaison hydrogène entre L'Arg84 et la Gln96, l'interaction de recouvrement (« capping interaction ») entre l'Arg66 et l'extrémité C-terminale de l'hélice C2 ainsi que le pont salin entre l'Arg77, la Glu74 et la Glu110 (Akarsu et al., 2003).

L'épissage alternatif du segment 8 génère également un ARNm codant la protéine NS3, déléetée d'une séquence centrale par rapport à NS1. NS3 serait impliquée dans l'augmentation de l'activité réplcative (Selman et al., 2012).

1.2.3 LE CYCLE VIRAL

La prolifération du virus de la grippe se fait en plusieurs étapes au cours desquelles celui-ci prend le contrôle de la cellule à son profit. Le virus initie l'infection en se fixant aux acides neuraminiques (acides sialiques) situés à la surface des cellules (Figure 11.1). Alors que certains virus (paramyxovirus et herpesvirus) peuvent entrer directement en traversant la membrane plasmique par un processus de fusion, les virus influenza pénètrent dans la cellule par un mécanisme d'endocytose (Figure 11.2) et requièrent un faible pH pour activer la fusion de la membrane virale à celle de l'endosome. Ce processus d'entrée est retrouvé chez d'autres virus enveloppés (rhabdo-, flavi-, bunya- et filovirus). Après adsorption, la majorité des virus affiche un temps moyen de 25 minutes pour la pénétration dans la cellule. 10 minutes après pénétration (environ 35 min après adsorption), les RNP du virus influenza sont retrouvées dans le noyau (Martin and Helenius, 1991).

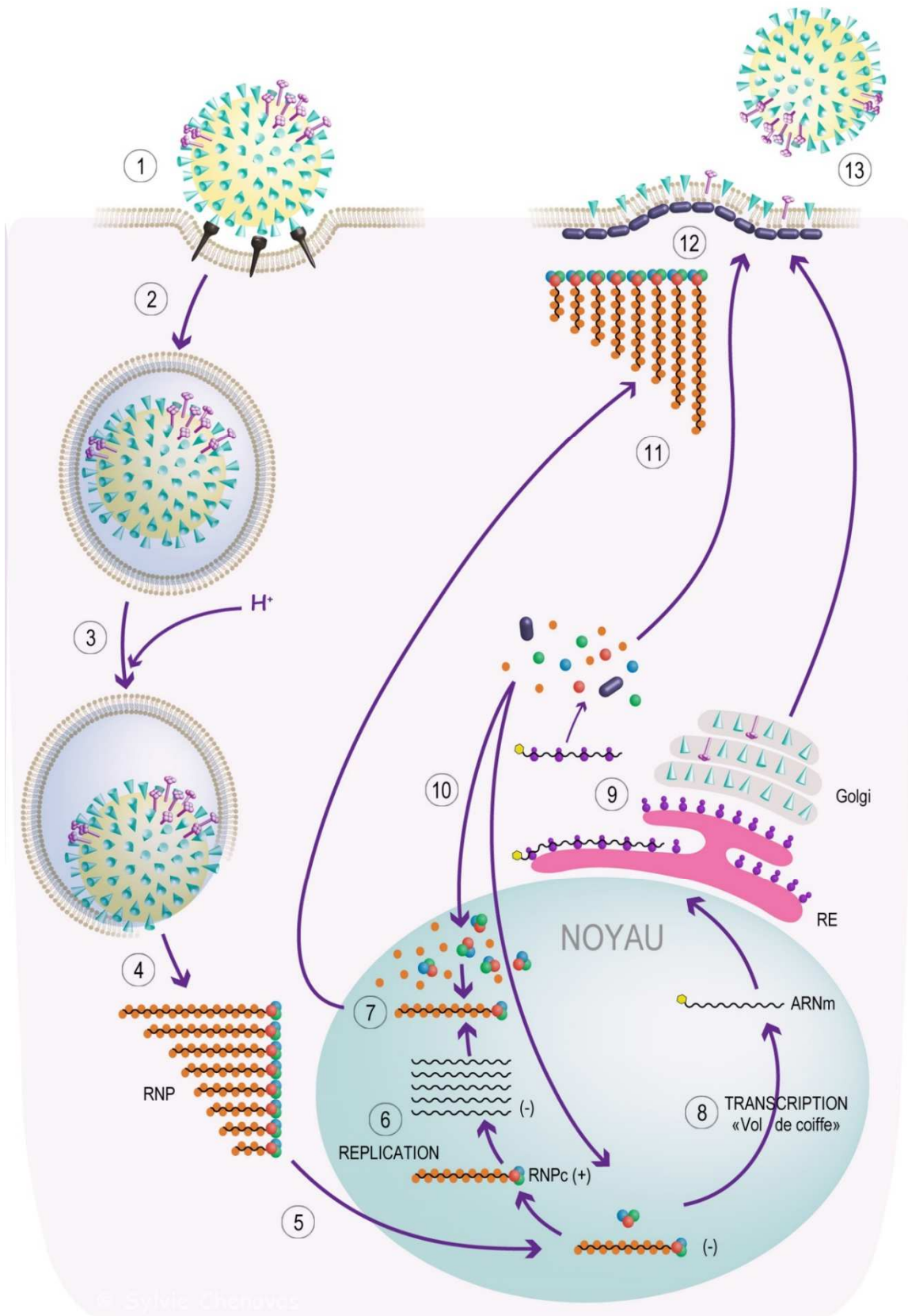


Figure 11 : Cycle viral. (1) Fixation du virus sur les acides neuraminiques cellulaires via ses hémagglutinines de surface et internalisation par endocytose (2). (3) Acidification de l'endosome et libération des RNP (4) qui sont transportées jusqu'au noyau (5). Produits lors de la phase de transcription (8), les ARNm sont traduits dans le cytoplasme (9). Les trois sous-unités de l'ARN-polymérase ainsi que les NP néo synthétisées sont importées dans le noyau (10) pour former de nouvelles RNP (7) avec les ARNv issus de la réplication (6). Les RNP nouvellement formées et les autres protéines virales sont adressées vers la membrane (11) où se déroule l'assemblage final (12) pour former de nouvelles particules virales libérées par bourgeonnement (13) (Guilligay et al., 2010).

Au cours de sa migration dans le cytoplasme, l'endosome s'acidifie (Figure 11.3). L'environnement acide induit un changement conformationnel de HA2 qui entraîne l'exposition de sa partie N-terminale hydrophobe qui gouverne la fusion entre l'enveloppe du virus et la membrane endosomale (Harrison, 2008; Gamblin and Skehel, 2010). Ce mécanisme demeure encore assez mal compris. Le domaine transmembranaire de HA2 (inséré dans la membrane de la particule virale) et le peptide de fusion (inséré dans la membrane endosomale) sont juxtaposés grâce aux modifications structurales induites par l'abaissement du pH. Les changements conformationnels concertés de plusieurs HA entraîneraient l'ouverture d'un pore pour permettre le relargage des RNP. Lors de cette étape, il a été montré que la protéine M2 permet l'afflux de protons H^+ de l'endosome dans la particule virale. La baisse du pH entraîne un changement conformationnel des protéines matricielles M1 qui a pour effet de rompre les interactions entre elles et les RNP qui se retrouvent alors libres (Matlin et al., 1981; Zhirnov and Grigoriev, 1994) (Figure 11.4). Les RNP sont ensuite transportées jusqu'au noyau (Figure 11.5).

Le processus d'import nucléaire des RNP implique la machinerie nucléocytoplasmique des cellules hôtes (Figure 12) (Cros and Palese, 2003; Boulo et al., 2007). Les RNP d'une taille de 10 à 20 nm de large (Compans et al., 1972; Martín-Benito et al., 2001) sont en effet trop grosses pour traverser la membrane nucléaire passivement et doivent donc se reposer sur les mécanismes actifs d'import nucléaire de la cellule hôte. Cette dépendance pour les fonctions nucléaires est une caractéristique du cycle des virus influenza. La synthèse de tous les ARN se déroulent dans le noyau et le trafic du génome viral vers et depuis le noyau est un processus étroitement régulé (Boulo et al., 2007; Cros and Palese, 2003). Durant tout le cycle viral, les ARN ne sont jamais sous une forme libre mais toujours associés aux ARN-polymérases virales et aux NP pour former des RNP. Chaque élément de la RNP possède une séquence NLS mais il a été montré que seule la séquence signal de NP était suffisante et nécessaire pour l'import des RNP (Bullido et al., 2000; Cros and Palese, 2003; Cros et al., 2005; O'Neill et al., 1995; Ozawa et al., 2007). Pour cela, NP interagit avec les membres de la famille des karyophérine- α . Une fois fixée à la RNP, la karyophérine- α recrute une karyophérine- β qui sert d'intermédiaire pour l'interaction avec les protéines du pore nucléaire (Cros and Palese, 2003).

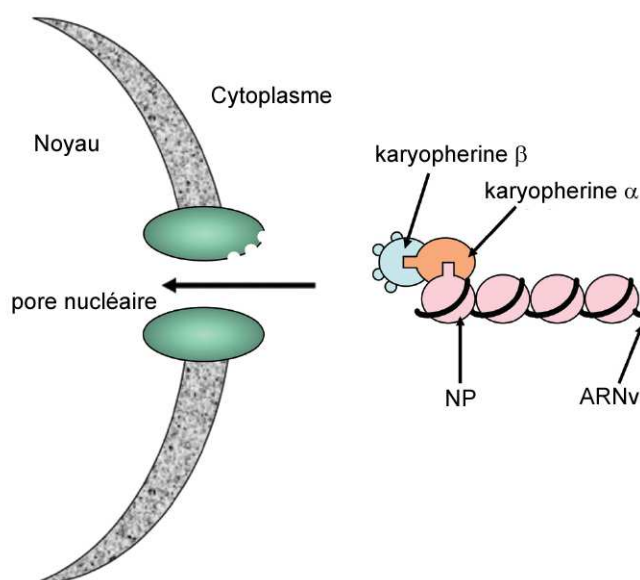


Figure 12 : Illustration de l'import nucléaire des RNP du virus influenza. Les RNPv sont importées dans le noyau par un processus énergie-dépendant requérant des interactions avec des facteurs cellulaires. NP interagit avec la karyophérine- α via sa séquence de localisation nucléaire. La karyophérine- α se fixe à la karyophérine- β qui permet l'interaction avec les protéines du pore nucléaire (Shaw and Palese, 2013).

Une fois dans le noyau, l'ARN-polymérase virale orchestre la réplication (Figure 11.6) et la transcription (Figure 11.8). La réplication correspond à la phase d'amplification du génome viral alors que la transcription correspond à l'étape de synthèse d'ARN messagers (ARNm) viraux. Ces deux phases seront développées dans le paragraphe relatif à l'ARN-polymérase ARN-dépendante du virus influenza (cf. § 1.4, p 27). Une fois produits, les ARNm sont exportés vers le cytoplasme pour être traduits en protéines (Figure 11.9) (Cros and Palese, 2003; Boulo et al., 2007).

Les trois sous-unités de l'ARN-polymérase virale (PA, PB1 et PB2) ainsi que les NP néo synthétisées sont importées dans le noyau (Figure 11.10) afin de former de nouvelles RNP avec les ARNv issus de la phase de réplication (Figure 11.7). Différents modèles ont été proposés pour cet import nucléaire mais le consensus actuel est le suivant : PA et PB1 forment un dimère dans le cytoplasme et sont transportées sous cette forme par le facteur d'import RanBP5 (Figure 13) (Ran-Binding Protein 5, membre de la superfamille des importines- β) (Fodor and Smith, 2004; Huet et al., 2010; Hutchinson et al., 2011). La sous-unité PB2 est quant à elle importée séparément, par le biais d'une voie classique via une importine- α (Resa-Infante et al., 2008; Tarendeau et al., 2007).

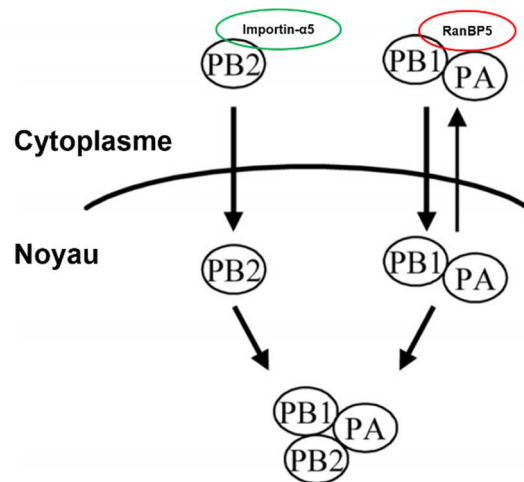


Figure 13 : Modèle d'import nucléaire des sous-unités de l'ARN-polymérase du virus influenza. (adaptée de Huet et al., 2010)

Les complexes de RNP nouvellement formées sont exportés vers le cytoplasme et dirigés vers la membrane cellulaire suivant le cytosquelette (Figure 11.11). Comme pour l'import des RNP, l'export des RNP repose sur la machinerie d'export du noyau et les protéines M1 et NEP / NS2 sont impliquées dans cet export (Figure 14) (Cros and Palese, 2003; Boulo et al., 2007; Elton et al., 2001; Neumann et al., 2000; O'Neill et al., 1998). M1 interagirait à la fois avec les RNPv néo-synthétisées et avec NEP qui recrute la machinerie d'export par son interaction avec Crm1 (protéine d'export nucléaire, Chromosome Region Maintenance 1) permettant l'export des RNPv vers le cytoplasme (Hutchinson and Fodor, 2013).

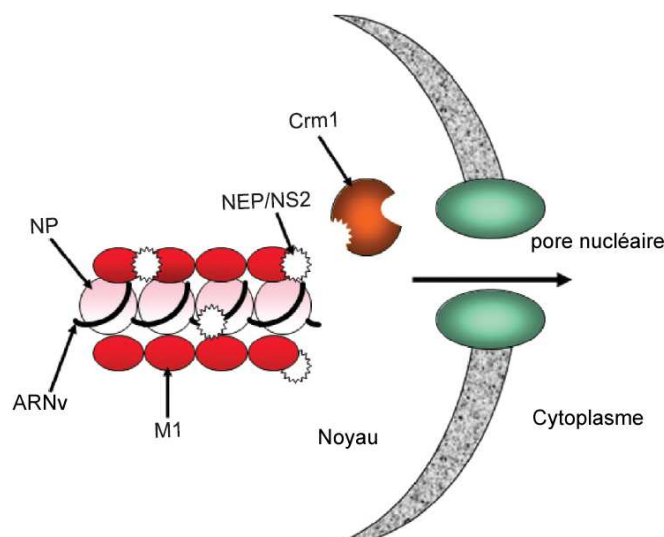


Figure 14 : Illustration de l'export nucléaire des RNPv du virus influenza. L'export nucléaire des RNPv nouvellement synthétisées est pris en charge par la protéine virale d'export nucléaire NEP/NS2. NEP/NS2 interagit avec un facteur d'export nucléaire, Crm1, et avec les RNPv via la protéine M1. L'interaction avec la machinerie d'export nucléaire facilite le transport des RNPv à travers le pore nucléaire vers le cytoplasme (Shaw and Palese, 2013).

Les autres protéines virales, HA, NA et M2, sont adressées vers la membrane plasmique où l'assemblage final se déroule (Figure 11.12) pour former de nouvelles particules virales libérées par bourgeonnement (Figure 11.13) couplé à l'action de la NA (cf. § 1.2.1, p 7).

Un assemblage correct des huit segments d'ARN génomique est essentiel pour qu'un virion soit infectieux. Le mécanisme précis de combinaison des différents segments demeure mal compris et deux modèles ont été proposés : le modèle d'incorporation aléatoire s'opposant à celui incorporation sélective.

Le premier modèle d'incorporation aléatoire implique l'existence d'un mécanisme discriminant les RNPv des autres RNP qui permettrait leur incorporation aléatoire dans les virions bourgeonnants. Il repose aussi sur l'incorporation de plus de huit RNPv pour assurer la présence d'un jeu complet des huit RNPv dans un pourcentage significatif de particules virales (Bancroft and Parslow, 2002; Enami et al., 1991; Gao et al., 2010). L'analyse mathématique de l'assemblage des RNP montre que si huit segments sont aléatoirement incorporés, la probabilité d'assembler un jeu complet de huit RNPv est 0,24 % (Enami et al., 1991). Cependant, si davantage de RNPv sont incorporées aléatoirement, le nombre de particules virales infectieuses augmente (Compans and Choppin, 1975). Une incorporation aléatoire de 12 RNPv par virion fournirait une proportion d'environ 10 % de particules infectieuses (Compans and Choppin, 1975; Donald and Isaacs, 1954).

Des études plus récentes fournissent des arguments génétiques et biochimiques en faveur d'une incorporation sélective lors de laquelle les RNP se comportent indépendamment en permettant à chaque segment d'être incorporé sélectivement (Gerber et al., 2014; Hutchinson et al., 2010). Ces travaux montrent qu'en plus des régions non codantes, des régions codantes joueraient un rôle dans la discrimination et l'incorporation sélective des segments (Muramoto et al., 2006). Parmi les régions non codantes, les extrémités U12 et U13 pourraient permettre la discrimination des RNPv (Luytjes et al., 1989; Muramoto et al., 2006) alors que les séquences non codantes spécifiques à chaque segment et une partie des régions codantes en 3' et 5' serviraient de signal d'incorporation sélective pour assurer un jeu complet des huit RNPv (Goto et al., 2013). La gestion des signaux d'incorporation serait gérée par des interactions directes (type Watson-Crick) entre les segments d'ARNv (Fujii et al., 2003) et permettrait la création d'un réseau d'interactions entre les RNPv (Hutchinson et al., 2010). Cette hypothèse a été émise après des

expériences montrant que l'absence d'un ARNv ou des mutations dans certaines régions d'un ARNv donné affectait l'incorporation d'autres ARNv (Hutchinson et al., 2008, 2009; Marsh et al., 2007, 2008; Muramoto et al., 2006). Ce modèle d'incorporation par interactions ARN/ARN impose l'existence de régions de l'ARNv accessibles et pose la question de l'impact de la structure des RNPv sur ces interactions. La liaison des NP aux phosphates des ARNv autoriserait l'exposition des bases nucléotidiques rendant ce modèle d'incorporation possible. La compréhension des lois gouvernant l'incorporation des segments d'ARNv apporterait des indications sur celles gouvernant les processus de réassortiment.

1.3 LA GRIPPE, ZOONOSE ET EVOLUTION

Les virus influenza évoluent à travers un processus complexe qui implique l'accumulation de mutations au fil du temps et le réarrangement des segments d'ARNv entre virus lors d'une co-infection d'une cellule par plusieurs virus.

1.3.1 GENETIQUE ET EVOLUTION

La structure segmentée de l'information génétique du virus est à l'origine d'une propriété évolutive importante : le réassortiment entre virus (Figure 15). Il correspond au réarrangement des segments d'ARNv entre différents virus dans les cellules infectées. Cette évolution drastique est appelée « cassure ». Lors d'un réassortiment entre deux virus, il peut théoriquement se produire jusqu'à 256 possibilités de combinaisons (2^8). Le réassortiment se produit chez les trois types viraux, A, B et C, mais n'a jamais été observé entre les différents types. Sur le plan antigénique, ce mécanisme peut conduire à des changements radicaux durant lesquels des HA ou NA de motifs antigéniques distincts de ceux des virus circulant peuvent être introduits dans la population de virus humains, il s'agit d'une cassure antigénique. Habituellement, la cassure antigénique est causée par des HA ou NA d'un nouveau sous-type, différent de ceux circulants. Ces nouvelles protéines introduites sont immunologiquement distinctes de celles des virus circulant menant à de forts taux d'infection dans une population immunologiquement naïve. C'est ce mécanisme qui peut conduire à des pandémies.

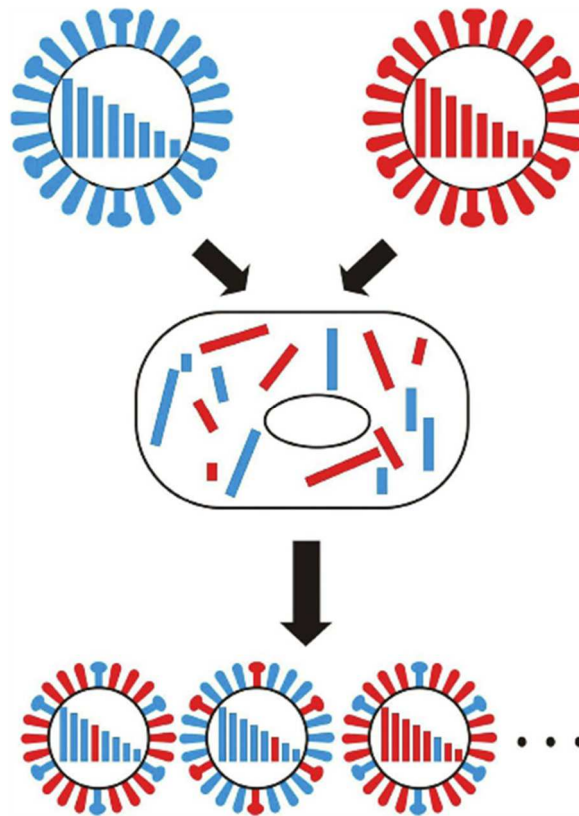


Figure 15 : Réassortiment. Le réassortiment est le mécanisme majeur pour la génération de virus de la grippe pandémiques (Wright et al., 2013).

L'importance du réassortiment pour la génération de nouvelles souches virales a été mise en évidence par les trois dernières pandémies (Figure 16). Celles de 1957 et de 1968 ont été causées par des virus réassortis contenant respectivement les segments HA, PB1 et NA ou les segments HA et PB1 d'origine aviaire (Laver and Webster, 1973; Scholtissek et al., 1978; Kawaoka et al., 1989). La pandémie H1N1 de 2009 a été causée par un virus réassorti possédant les segments de PA et PB2 d'un virus aviaire Nord-américain, les segments NA et M d'un virus aviaire Eurasien et les segments HA, NP et NS d'un virus porcin de type H1N1. Seul le segment PB1 avait pour origine un virus humain (H3N2). Il constitue un exemple de triple réassortiment (Garten et al., 2009; Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team et al., 2009; Smith et al., 2009; Trifonov et al., 2009). Ces réassortiments peuvent également engendrer des virus qui vont circuler durant une période de temps limitée (Iqbal et al., 2009; Zhang et al., 2009; Kim et al., 2010). Cependant, le mécanisme précis de ces réassortiments est totalement inconnu.

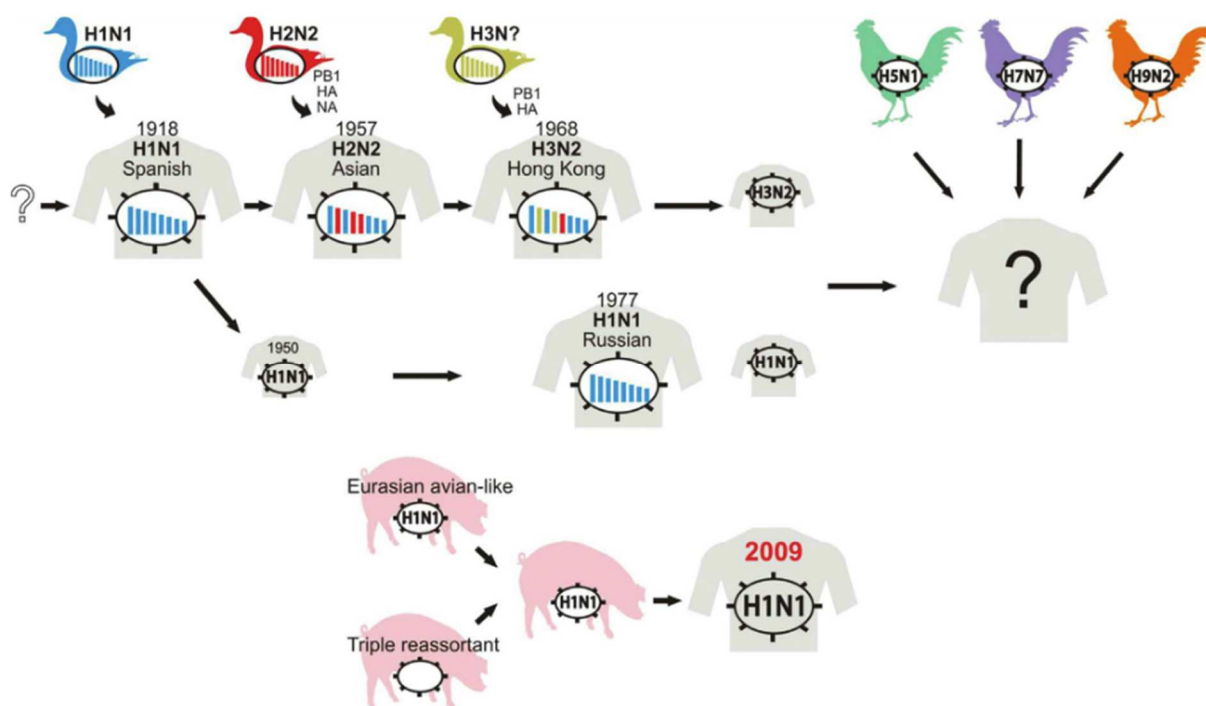


Figure 16 : Evolution des virus de la grippe de type A circulant chez l'humain. En 1918, la grippe espagnole a été causée par un virus aviaire H1N1. Après avoir circulé jusqu'au milieu des années 50, ses descendants ont réémergé en 1977 en Russie et ont provoqué des épisodes épidémiques sur plusieurs continents entre 1977 et 1979. Les virus de cette lignée ont continué à circuler dans la population humaine jusqu'en 2009. La pandémie de grippe au départ d'Asie a été déclenchée par un virus H2N2 qui a acquis ses gènes codant pour HA, NA et PB1 d'un virus aviaire H2N2. Un réassortiment similaire en 1968 résultant de l'introduction de gènes HA et PB1 aviaires est à l'origine de la souche Hong Kong du virus influenza à l'origine de la pandémie de 1968. Ce virus H3N2 est toujours en circulation dans la population humaine aujourd'hui. En 2009, le réassortiment d'un virus porcin triplement réassorti et d'un virus porcin eurasiatique a abouti au virus H1N1 pandémique de 2009 qui a désormais remplacé les précédents virus saisonniers H1N1.

Outre cette capacité évolutive particulière, le virus de la grippe possède une forte propension à évoluer par mutations. Cette évolution par mutations ponctuelles est appelée « glissement ». Les variants résultent d'une sélection positive de mutants spontanés par les anticorps neutralisants (Bush et al., 1999; Plotkin and Dushoff, 2003). Ces variants ne peuvent plus être neutralisés par les anticorps qui visaient le virus « parental ».

Des recombinaisons ont également été détectées dans des segments qui contiennent du matériel génétique de plusieurs origines. Le processus de recombinaison homologue n'est pas connu chez le virus de la grippe mais des recombinaisons par échange de matrice peuvent se produire et conduire à améliorer les aptitudes biologiques du virus. Par exemple, une insertion de 54 nucléotides de l'ARN ribosomal 28S a été décrite dans la souche A/turkey/Oregon/71 au niveau du gène de HA augmentant sa clivabilité (Khatchikian et al., 1989). Ces échanges semblent pouvoir se produire également entre segments : une insertion de 60 nucléotides provenant du gène de NP a été mise en évidence chez le variant A/seal/Massachusetts/1/80 au niveau du gène de HA (Orlich et al., 1994).

Ce fort potentiel mutagène peut permettre au virus de la grippe d'échapper au système immunitaire de l'hôte et les changements moléculaires, même mineurs, qu'il provoque ont des conséquences majeures puisqu'il oblige chaque année lors de la saison de grippe à la production d'un nouveau vaccin adapté à ces changements.

1.3.2 LA GRIPPE, UNE ZONOSE

Les virus influenza A infectent un large panel d'animaux incluant les humains, les oiseaux, les porcs, les chevaux, les chiens et les chauves-souris. Ils infectent occasionnellement d'autres animaux tels que les

chats, les tigres, les léopards et même les chameaux, les phoques et les baleines entre autres. Des études sérologiques suggèrent que les virus influenza A peuvent toucher les ruminants, les reptiles ainsi que les amphibiens (Figure 17) (Herfst et al., 2014; Reperant et al., 2009).

Le réservoir naturel des virus influenza A est constitué des ordres *Ansériformes* (canards, oies et cygnes) et *Charadriiformes* (mouettes, sternes ou hirondelles de mer et oiseaux de rivage) (Webster et al., 1992; Yoon et al., 2014). Les virus influenza A ont été isolés d'au moins 105 espèces aviaires de 26 familles différentes. Presque tous les sous-types HA et NA ont été détectés chez le canard de surface ou barboteur (genre *Anas*, dont fait partie le canard colvert).

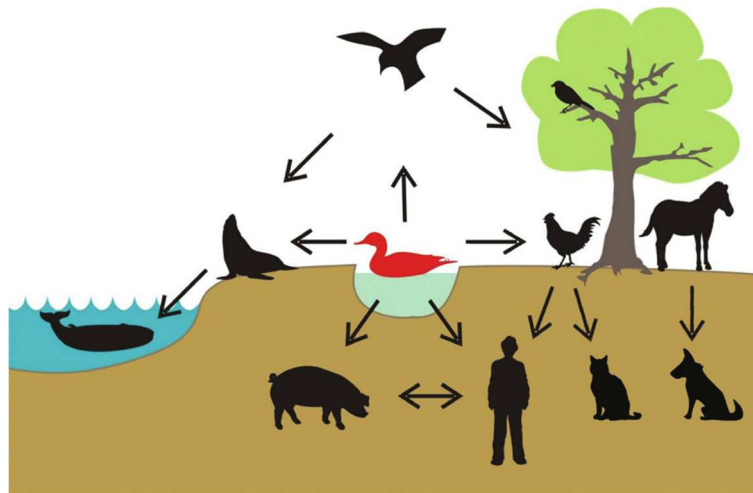


Figure 17 : Réservoirs des virus influenza A et transmissibilité. Les oiseaux aquatiques sauvages constitue le réservoir principal des virus influenza de type A. La transmission du virus a été détectée des oiseaux aquatiques à la volaille, aux mammifères marins, aux cochons, aux chevaux et aux humains. Les virus sont aussi transmis entre les cochons et les humains et de la volaille aux humains. Les virus influenza équin ont été transmis aux chiens (Wright et al., 2013).

Chez ces espèces, la plupart des virus influenza A évoluent lentement suggérant qu'ils sont bien adaptés à leur hôte (Webster et al., 1992; Yoon et al., 2014). Les virus aviaires infectant les volailles terrestres font exception à cette règle puisque leur évolution rapide engendre des épidémies intra-espèce. Ces virus incluent le virus H5N1 hautement pathogène apparu dans la deuxième moitié des années 90 (Shortridge, 1999; Shortridge et al., 1998). Ce virus conduit à un très fort taux de mortalité chez le poulet infecté (Subbarao et al., 1998) et provient d'un virus réassorti. Pour la première fois, les épidémies chez la volaille se sont accompagnées d'une transmission d'un virus entièrement aviaire à l'homme avec des issues fatales (Claas et al., 1998a, 1998b; de Jong et al., 1997; Subbarao et al., 1998).

Les analyses phylogénétiques couplées à la détection de presque tous les sous-types de HA et NA chez les oiseaux sauvages aquatiques suggèrent que tous les virus influenza A de mammifères sont dérivés des virus influenza aviaires (Gorman et al., 1990a, 1990b, 1991; Shortridge, 1992; Webster et al., 1992; Yoon et al., 2014). Les trois types de virus influenza, A, B et C auraient par contre un ancêtre commun (Perez et al., 2011).

Ces dernières années, d'importants efforts de séquençage à grande échelle ont généré des milliers de séquences d'ARNv génomiques de virus influenza (Obenauer et al., 2006). La comparaison des séquences protéiques des différents virus a révélé une signature en acides aminés à des positions spécifiques qui distingue les virus humains, aviaires et porcins. En particulier, des études comparatives se sont penchées sur l'identification de signatures en acides aminés du virus pandémique H1N1 et du virus aviaire H5N1 pour obtenir des pistes sur les mécanismes d'adaptation à l'homme (Chen et al., 2006; Pan et al., 2010). Pour certaines de ces signatures, des rôles dans l'adaptation à l'hôte et la pathogénicité

ont été décrits. Certains de ces rôles sont abordés dans le manuscrit à travers la description des différentes protéines virales (cf. § 1.2.2, p 9 et 1.4.4, p 32). Ces études ont permis d'établir les grandes lignes des déterminants moléculaires de l'adaptation à l'hôte.

1.4 L'ARN- POLYMERASE ARN-DEPENDANTE, ZOOM SUR LE CŒUR DU VIRUS

L'ARN-polymérase ARN-dépendante du virus de la grippe est un complexe macromoléculaire hétérotrimérique formé de l'assemblage de trois protéines : PA (Protéine Acide), PB1 (Protéine Basique 1) et PB2 (Protéine Basique 2). L'ARN-polymérase fonctionne uniquement dans le cadre d'une RNP. Ce complexe est responsable à la fois de la **réplication** du génome viral et de sa **transcription** en ARN messagers (ARNm), deux processus moléculaires distincts se produisant dans le noyau des cellules infectées (Figure 18). Le basculement d'un processus à l'autre demeure encore largement obscur à ce jour. Leur ordre et leur déroulement font l'objet de nombreuses spéculations.

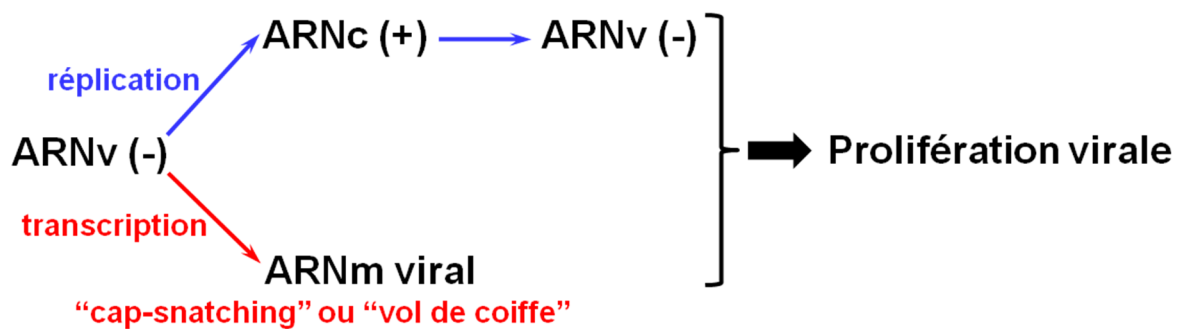


Figure 18 : Transcription versus Réplication. Deux processus moléculaires distincts orchestrés par l'ARN-polymérase ARN-dépendante du virus influenza conduisant à la prolifération virale.

1.4.1 LA TRANSCRIPTION

Ce processus correspond à la synthèse d'ARNm à partir de l'ARNv. L'ARN-polymérase des virus influenza diffère des ARN-polymérases des virus à ARN négatifs non segmentés car elle ne porte pas les activités enzymatiques requises pour coiffer l'extrémité 5' de ses propres ARNm viraux (activités guanylyl et méthyltransférase). Pour contourner ce problème, l'ARN-polymérase virale va coiffer ses ARNm viraux par un mécanisme particulier appelé « vol de coiffe » (Figure 19) (Bouloy et al., 1978; Plotch et al., 1979, 1981).

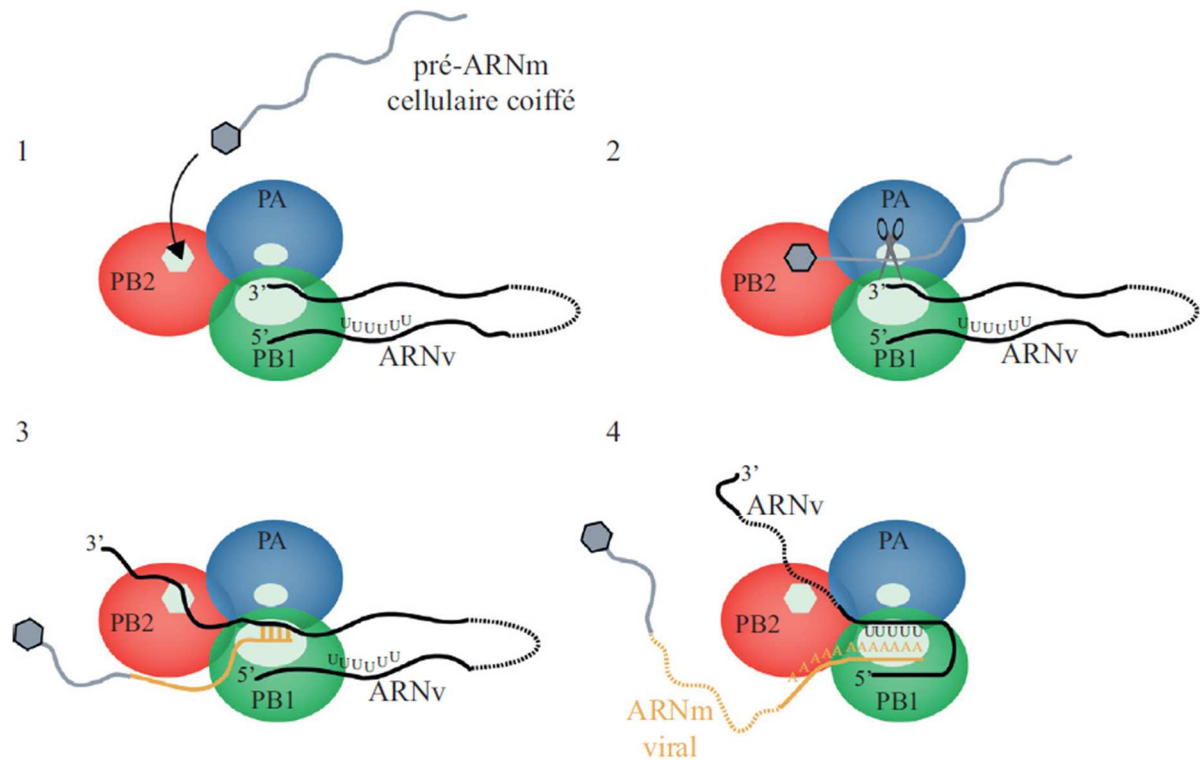


Figure 19 : Mécanisme de transcription coiffe-dépendant du virus influenza ou « vol de coiffe ». 1/ Fixation de la coiffe d'un pré-ARNm cellulaire par la sous-unité PB2 de l'ARN-polymérase du virus. 2/ Clivage de l'ARNm cellulaire 10 – 13 nucléotides après la coiffe par le site endonucléase porté par PA. L'ARN clivé est relargué. 3/ Elongation de l'ARN coiffé par PB1 utilisant l'ARN viral comme matrice. 4/ Polyadénylation de l'ARNm viral par bégaiement de l'ARN-polymérase au niveau de la séquence poly-U en 5' de l'ARN viral (Chenavas et al., 2013a).

L'ARN-polymérase reconnaît spécifiquement, via la sous-unité PB2, le 7-méthyl-guanosine (7^mG) de la coiffe (7^mGpppN) situé à l'extrémité 5' des pré-ARNm cellulaires. Grâce au site endonucléase porté par PA, elle clive ensuite les pré-ARNm cellulaires 10 à 13 nucléotides après la coiffe. Ces petits oligonucléotides d'ARN coiffés sont utilisés comme amorce par la sous-unité PB1 pour initier la transcription des ARNv. En fin de transcription, un motif poly-A est synthétisé à l'extrémité 3' des ARNm viraux par un mécanisme de bégaiement à partir d'une courte séquence poly-U localisée à l'extrémité 5' de l'ARNv. Ce dernier pourrait être dû à une gêne stérique résultant de la constante interaction entre l'ARN-polymérase et l'extrémité 5' de l'ARNv durant cette étape (Tiley et al., 1994; Fodor et al., 1994; Poon et al., 1999; González and Ortín, 1999a).

1.4.2 LA REPLICATION

Elle correspond à la phase d'amplification du matériel génétique du virus. Lors de ce second processus, l'ARN complémentaire (ARNc), première copie complémentaire et colinéaire de l'ARNv, est synthétisé (fonction de PB1) puis « encapsidé » par l'ARN-polymérase et les NP nouvellement produites formant une ribonucléoprotéine complémentaire (RNPc). L'ARNc porté par ces RNP, sert alors de matrice pour la synthèse de nouveaux ARNv qui sont à leur tour encapsidés par l'ARN-polymérase et les protomères de NP pour former des RNP destinées à intégrer les nouveaux virions.

Le mécanisme moléculaire de ce processus est encore mal connu mais se déroule en deux étapes. La première concerne la synthèse d'ARNc à partir de l'ARNv qui se produit tôt après infection et durant une courte période de temps. La synthèse d'ARNv à partir de l'ARNc synthétisé est d'une plus grande ampleur et a lieu plus tard (Hay et al., 1977). Ces observations couplées aux données collectées sur des virus thermosensibles pour la synthèse d'ARNv mais montrant une accumulation normale d'ARNc à

température restrictive (Falcón et al., 2004; Thierry and Danos, 1982; Wolstenholme et al., 1980) suggèrent que la synthèse d'ARNc utilise majoritairement les RNP parentaux comme matrice.

La structure des régions promotrices des ARNv et ARNc montrent des similarités structurales mais également quelques différences ponctuelles pouvant expliquer une reconnaissance différente par l'ARN-polymérase (Bae et al., 2001; Cheong et al., 1999; Park et al., 2003). De plus, des données biochimiques et génétiques suggèrent que des régions distinctes de l'ARN-polymérase interagissent avec les régions promotrices de l'ARNv ou de l'ARNc (González and Ortín, 1999a, 1999b).

Ces différences sont en accord avec la proposition de mécanismes différents pour l'initiation de la synthèse sur l'ARNc et sur l'ARNv (Deng et al., 2006). Pour initier la réplication, l'ARN-polymérase du virus influenza présente la particularité de toujours synthétiser un dinucléotide (pppApG) à partir de la région promotrice hautement conservée à l'extrémité 3'. Si la synthèse de l'ARNc est initiée à l'extrémité 3' terminale de la matrice d'ARNv (Figure 20.B), l'initiation de la synthèse d'ARNv se produit trois nucléotides en aval de l'extrémité 3' terminale et le dinucléotide initial pppApG devrait être réaligné au niveau de l'extrémité 3' terminale de la matrice d'ARNc pour obtenir une réplication complète (Figure 20.A). Cette particularité d'initiation sur le promoteur d'ARNc pourrait permettre à l'ARN-polymérase de réparer une mutation qui se serait produite à l'extrémité 3'.

Ces résultats ainsi que ceux obtenus lors de l'étude de mutants thermosensibles défectifs, soit pour la synthèse d'ARNc, soit pour celle d'ARNv (Mena et al., 1999; Thierry and Danos, 1982), suggèrent que les RNPv et RNPc sont structuralement et fonctionnellement distinctes. Ces différences pourraient être à la base d'un mécanisme de contrôle du niveau d'intermédiaires réplcatifs dans la cellule infectée (Resa-Infante et al., 2011).

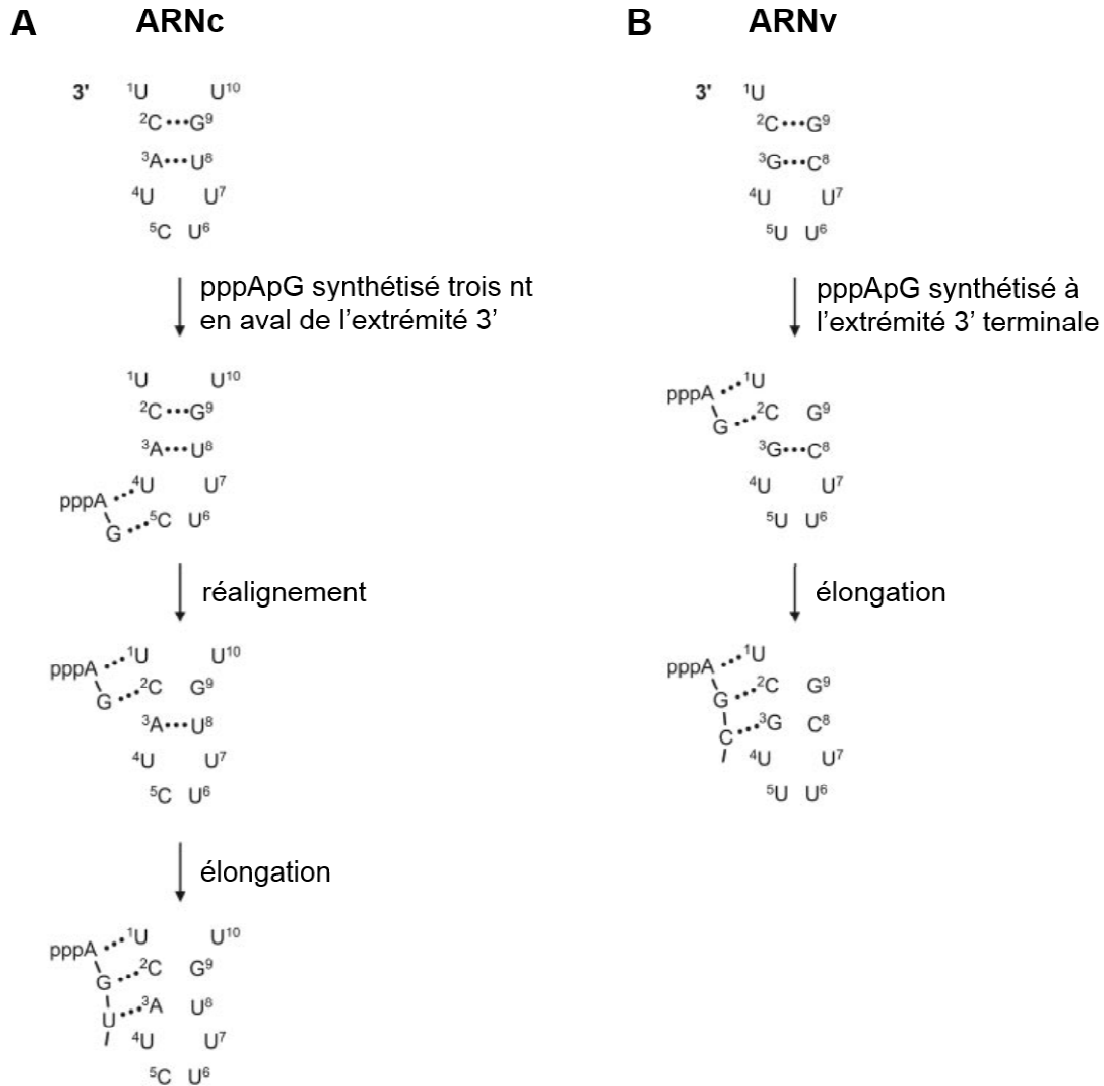


Figure 20 : Différentes stratégies d'initiation sont utilisées par l'ARN-polymérase de la grippe sur les promoteurs ARNc et ARNv pour la réplication de l'ARN viral. Le codon initial pppApG est synthétisé à partir des nucléotides 4 et 5 sur le promoteur ARNc et réaligné à l'extrémité 3' terminale de la matrice d'ARNc pour permettre la synthèse complète d'ARNv (A). A l'inverse, le dinucléotide initial est synthétisé à partir des nucléotides 1 et 2 terminaux de l'extrémité 3' pour permettre la synthèse d'ARNc (B) (figure tirée de Deng et al., 2006).

Deux modèles de mécanismes pour la deuxième étape (synthèse d'ARNv à partir d'ARNc) du processus de réplication ont été proposés. Dans le modèle dit de « réplication en *trans* » (Jorba et al., 2009; Resa-Infante et al., 2011), l'extrémité 5' de la matrice d'ARNc portée par les RNPc serait protégée par une ARN-polymérase appelée « ARN-polymérase résidente » (Figure 21.A). Une autre polymérase, appelée « ARN-polymérase non-résidente » accèderait à l'extrémité 3' de l'ARNc. Une fois l'ARNv synthétisé, une seconde « ARN-polymérase non-résidente » reconnaîtrait et protégerait l'extrémité 5'. Ceci induirait l'association avec NP et son oligomérisation. Durant le processus, d'autres « polymérases non-résidentes » pourraient venir sur la matrice d'ARNc et augmenter ainsi l'efficacité de la réplication.

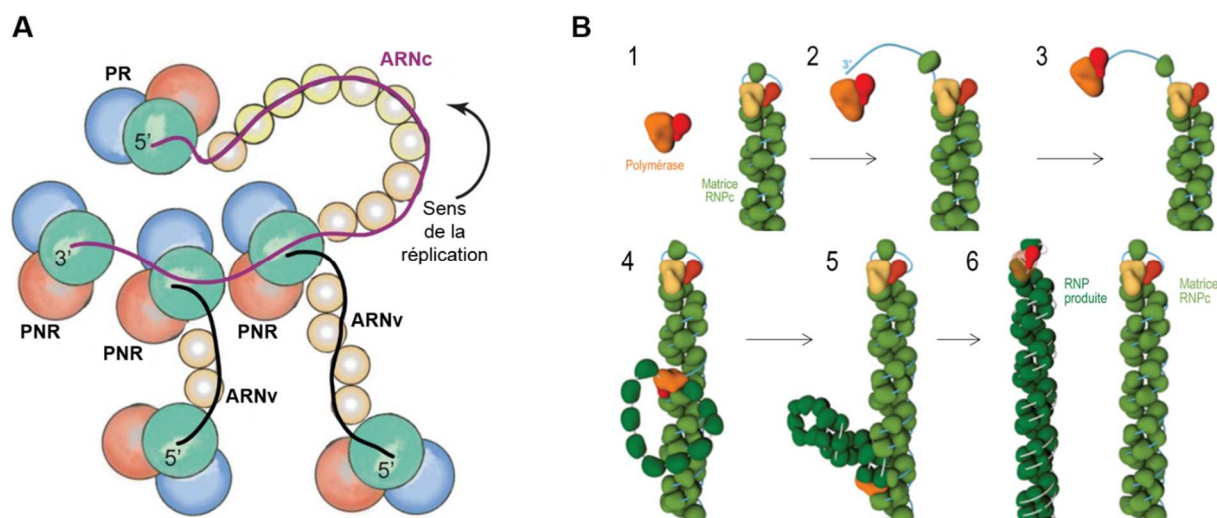


Figure 21 : Modèles pour la seconde étape de réplication de l'ARN du virus influenza. **A/** La réplication en *trans*. Lors d'une première phase, l'ARNc (violet), synthétisé à partir de l'ARNv, serait encapsidé par une ARN polymérase hétérotrimérique dite « résidente » (PR) et des protomères de NP. Son extrémité 3' serait accessible à des complexes hétérotrimériques « non-résidents » (PNR) à l'origine de la synthèse des ARNv (noir). Encapsidés à leur tour, ils formeraient de nouvelles ribonucléoprotéines (RNP). **B/** (1) La réplication du génome viral est effectuée par une seconde ARN-polymérase à partir d'une matrice RNP. Le grand et petit domaine de l'ARN-polymérase sont représentés en orange et rouge respectivement. Sur la matrice RNP, l'ARN est en bleu et NP en vert clair. (2) L'extrémité 3' de la matrice ARN se désengage de l'extrémité 5' et (3) se fixe au site actif de la seconde ARN-polymérase. (4) La synthèse d'ARN est initiée et la nouvelle extrémité 5' produite est fixée par l'ARN-polymérase répliquative. Cette fixation initie l'encapsidation de l'ARN par NP dans le sens 5' - 3' formant ainsi une nouvelle RNP. (5) Après avoir atteint une longueur de 12 NP, la boucle de NP-ARN adopte une forme hélicoïdale. La RNP naissante poursuit son élongation jusqu'à l'extrémité 5' de la matrice pour former une RNP complètement assemblée (figure adaptée de Moeller et al., 2012).

Dans ce modèle, les extrémités 3' et 5' n'interagissent pas avec la même ARN-polymérase mais il corrobore les données montrant que les deux extrémités sont nécessaires pour la réplication (Hagen et al., 1994; Vreede and Brownlee, 2007; Olson et al., 2010). L'initiation de la réplication par « l'ARN-polymérase non résidente » est peu claire et la participation d'autres partenaires viraux ou cellulaires pour l'accès à l'extrémité 3' est encore inconnue.

Un autre modèle basé sur l'activation en *trans* a récemment été proposé (Moeller et al., 2012) impliquant également la formation d'une RNPc. Dans ce modèle, une seconde ARN-polymérase vient effectuer la réplication sur une RNPc qui sert alors de matrice (Figure 21.B). L'extrémité 3' de l'ARNc se désengage de l'extrémité 5' et est fixée par une seconde polymérase. Contrairement au premier modèle, la nouvelle extrémité 5' produite est alors fixée par l'ARN-polymérase répliquative. Cette fixation initie l'association entre NP et l'ARNv néo synthétisé. Une nouvelle RNP est alors générée.

Comme dans le mécanisme répliquatif en *trans*, l'initiation de la réplication par la seconde ARN-polymérase est peu claire. De plus, pour autoriser l'accès à la matrice d'ARNc, NP doit être retirée de la RNPc et remplacée après la synthèse ce qui implique un débobinage transitoire de la RNPc pour faciliter le mouvement de NP. A l'inverse du premier modèle, les extrémités 3' et 5' interagissent avec la même ARN-polymérase.

1.4.3 TRANSCRIPTION VERSUS REPLICATION

Contrairement à une majorité de virus à ARN (famille des *Bunyaviridae* par exemple) dont le cycle répliquatif est confiné dans le cytoplasme, les RNPv des orthomyxovirus entrent dans le noyau des cellules infectées pour transcrire et répliquer l'information génétique virale (Figure 11.5, p 19). Fonctionner à l'intérieur du compartiment nucléaire présente des avantages à la fois pour la transcription et la réplication.

La réplication dans le noyau permet aux ARNV d'être encapsidés sous forme de RNP avant qu'ils ne rencontrent les protéines de type RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene 1) qui entraîneraient une réponse immunitaire antivirale (Rehwinkel et al., 2010).

La transcription dans le noyau permet aux RNP de s'associer avec l'ARN-polymérase II cellulaire (Engelhardt et al., 2005; Mayer et al., 2007; Rameix-Welti et al., 2009; Rodriguez et al., 2007) assurant un positionnement parfait à proximité de la coiffe des ARNm naissants pour le déroulement du mécanisme de « vol de coiffe ».

Synthétisées par la même enzyme, les molécules d'ARN produites ont donc des destinées très différentes. En effet, à partir de la même matrice d'ARNV, la transcription produit des ARNm alors que la réplication génère des ARNc qui serviront de matrice pour la synthèse de nouveaux ARNV. *In vitro*, il a été montré que les RNPv seraient capables de synthétiser l'ARNm et l'ARNc (Vreede and Brownlee, 2007). Des études avec des cellules infectées ont montré qu'une phase initiale de transcription et donc de synthèse protéique, serait nécessaire avant l'étape répliquative (Hay et al., 1977) ce qui signifierait que les RNP entrantes seraient uniquement destinées à une étape de transcription primaire. NP semblerait jouer un rôle clef dans l'orchestration des deux processus en stabilisant et en favorisant l'accumulation des ARNc (Portela and Digard, 2002; Vreede et al., 2011). Il a également été montré que la présence de NP était nécessaire pour la synthèse complète des ARNc viraux (Beaton and Krug, 1986).

1.4.4 LES 3 SOUS-UNITES, ASSEMBLAGE ET FONCTIONS

Les trois sous-unités de l'ARN-polymérase ARN-dépendante s'assemblent tête-bêche dans cet ordre : PA-PB1-PB2, l'extrémité C-terminale d'une sous-unité interagissant avec l'extrémité N-terminale de la suivante (Figure 23.c). Les reconstructions en trois dimensions obtenues par microscopie électronique montrent que les trois sous-unités sont étroitement associées pour former une structure compacte (Figure 22) (Torreira et al., 2007; Coloma et al., 2009; Resa-Infante et al., 2010; Area et al., 2004; Moeller et al., 2012).

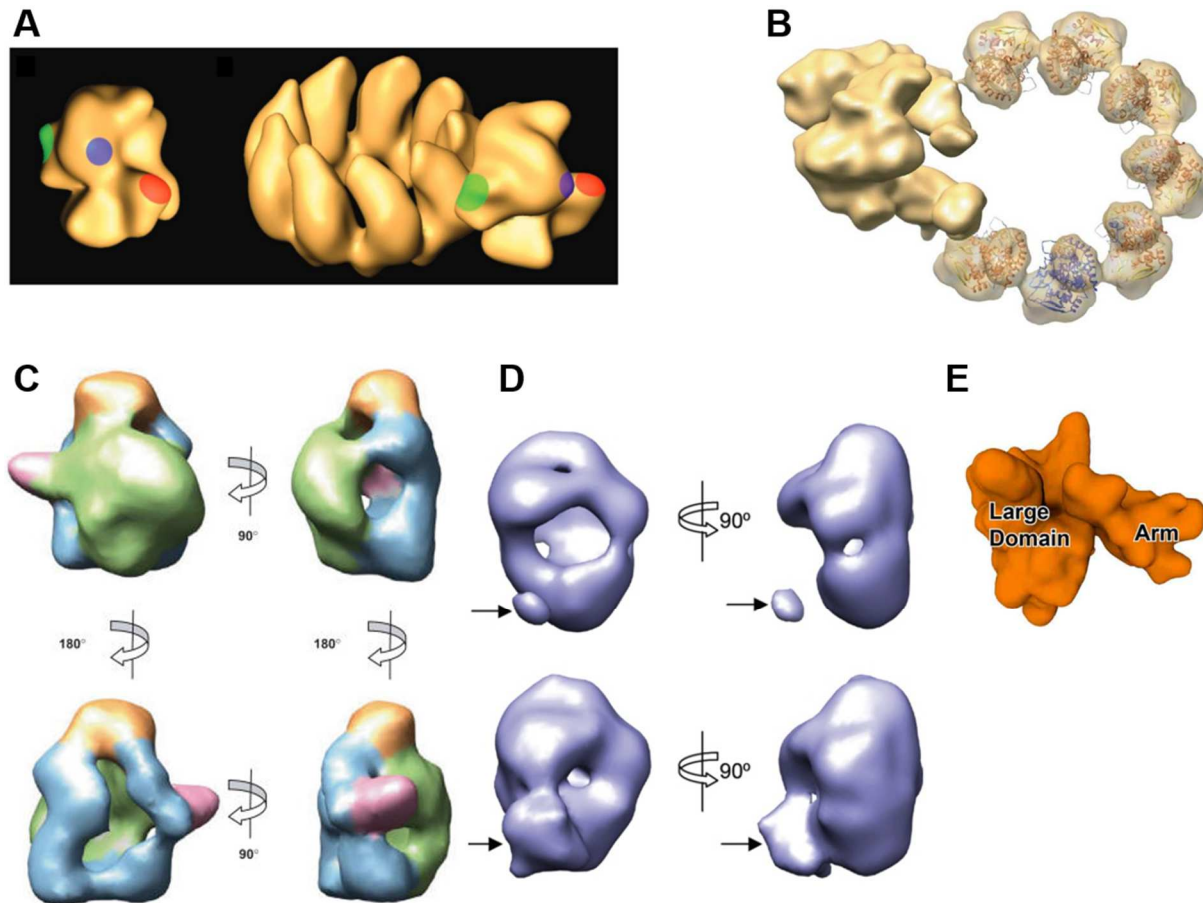


Figure 22 : Reconstructions 3D disponibles de l'ARN-polymérase. **A/** Reconstruction 3D de l'ARN-polymérase présente dans une mini-RNP (23 Å de résolution, coloration négative). Les aires colorées indiquent la position de chaque sous-unité identifiée grâce à des anticorps spécifiques. La région C-terminale de PA apparaît en vert, la région C-terminale PB1 en bleu et la région N-terminale de PB2 en rouge (Area et al., 2004). **B/** Reconstruction 3D d'une mini-RNP composée de neuf monomères de NP (12 Å de résolution) et d'une ARN-polymérase hétérotrimérique (18 Å de résolution) par cryo-ME. La structure cristallographique de NP a été ajustée dans la densité des 7 NP n'interagissant pas avec l'ARN-polymérase (Coloma et al., 2009). **C/** Reconstruction 3D d'une ARN-polymérase isolée soluble à 26 Å de résolution obtenue en coloration négative. Les aires structurales apparaissent en différentes couleurs pour faciliter la visualisation (Torreira et al., 2007). **D/** Reconstruction 3D d'une ARN-polymérase isolée soluble à 25 Å de résolution obtenue en coloration négative. (Resa-Infante et al., 2010). **E/** Reconstruction 3D d'une ARN-polymérase isolée soluble obtenue par cryo-ME d'une résolution estimée à 13 Å (Moeller et al., 2012).

L'ARN-polymérase est donc une enzyme multifonctionnelle et les différentes activités nécessaires à l'activité transcriptionnelle sont réparties sur les trois sous-unités :

- La sous-unité PA porte l'activité endonucléase impliquée dans le mécanisme de « vol de coiffe »,
- La sous-unité PB1 porte l'activité de synthèse d'ARN,
- La sous-unité PB2 porte le domaine de fixation de la coiffe située en 5' des ARNm cellulaires.

Etudié depuis de nombreuses années, l'hétérotrimère du virus influenza A dans son intégralité a été jusqu'à présent remarquablement difficile à produire. Ceci a conduit à opter pour une stratégie consistant au découpage de l'hétérotrimère en domaines isolés solubles. Depuis dix ans, cette stratégie a permis de commencer à décrypter les rôles de chacune des sous-unités (Figure 23).

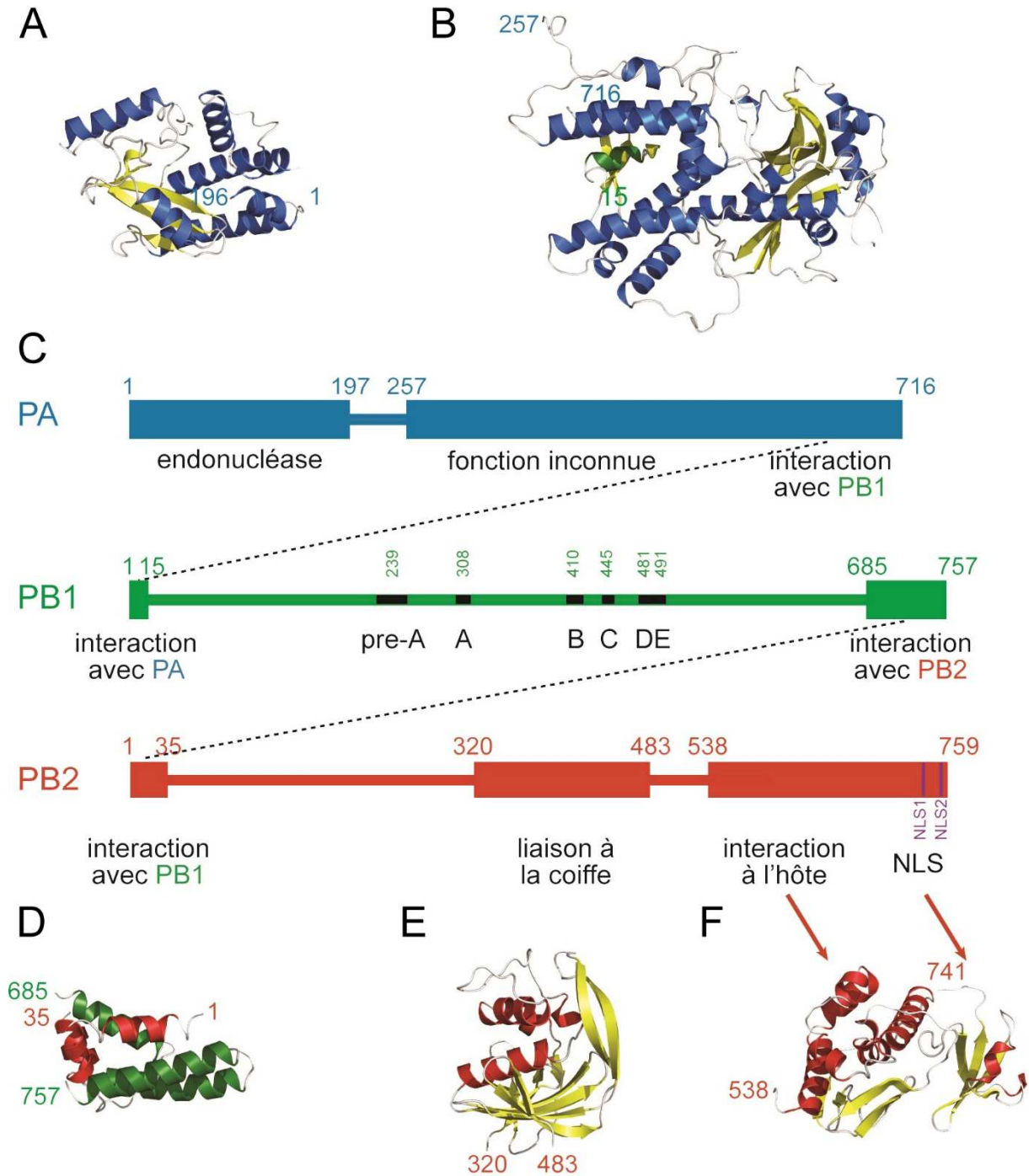


Figure 23 : Etat des connaissances structurales sur l'ARN-polymérase du virus de la grippe. **A/** Structure du domaine endonucléase de PA de la souche humaine H3N2 (PDB 2W69). Les hélices- α sont représentées en bleu et les feuillets- β en jaune. **B/** Structure du domaine C-terminal de PA de la souche aviaire H5N1 en complexe avec l'extrémité N-terminale de PB1 correspondant à l'hélice- α en vert (PDB 3CM8). Les hélices- α sont représentées en bleu et les feuillets- β en jaune. **C/** Diagrammes représentant les sous-unités PA (bleu), PB1 (vert) et PB2 (rouge) sur lesquels sont indiquées les régions de structures et de fonctions connues (parties épaisses). Les numéros correspondent aux limites exactes des domaines correspondant à ces régions. PB1 interagit avec PA par son extrémité N-terminale et avec PB2 par son extrémité C-terminale (pointillés). Elle porte les motifs caractéristiques des ARN-polymérases ARN-dépendantes (pré-A et A à E) dont les positions correspondent aux chiffres en vert. **D/** Structure du complexe entre les extrémités C-terminale de PB1 (hélices- α en vert) et N-terminale de PB2 (hélices- α en rouge) de la souche humaine H1N1 (PDB 3A1G). **E/** Structure du domaine de liaison à la coiffe de PB2 de la souche humaine H3N2 (PDB 2VQZ). Les hélices- α sont représentées en rouge et les feuillets- β en jaune. **F/** Structure du double domaine 627-NLS de PB2 de la souche humaine H3N2 (PDB 2VY6). Les hélices- α sont représentées en rouge et les feuillets- β en jaune.

1.4.4.A LA SOUS-UNITE PA, ACTIVITE ENDONUCLEASE

Des trois sous-unités de l'ARN-polymérase, PA est la seule qui peut être produite seule sous forme soluble en cellules d'insecte. La protéolyse ménagée de cette sous-unité libère deux fragments de 25 et 55 kDa (Hara et al., 2006). Le plus large des deux fragments correspond à la partie C-terminale de PA qui a été cristallisée par deux laboratoires en complexe avec un court peptide correspondant à la partie N-terminale de PB1 (He et al., 2008; Obayashi et al., 2008). La cavité dans laquelle vient se loger l'extrémité N-terminale de PB1 est formée de résidus hautement conservés au sein des différentes souches des virus influenza de type A. Le rôle du domaine C-terminal de PA reste inconnu. Les structures obtenues montrent une face chargée négativement comme attendu pour cette sous-unité acide. La face opposée présente à l'inverse un sillon chargé positivement contenant des résidus fortement conservés pouvant être une zone d'interaction avec l'ARN.

La partie N-terminale de PA a également été cristallisée par deux laboratoires (Dias et al., 2009; Yuan et al., 2009) (Figure 23.A). Sa structure est organisée autour d'un repliement similaire à celui des enzymes de restriction de type II et plus généralement à celui de la famille des endonucléases de type PD-(D/E)XK. Pour la majorité des enzymes de cette famille, le magnésium (Mg^{2+}) est utilisé comme co-facteur lors du processus catalytique de clivage. Il peut cependant être remplacé par d'autres ions divalents tels que le manganèse (Mn^{2+}). Le nombre d'ions divalents intervenant dans la catalyse reste incertain (Pingoud et al., 2014). Cette variabilité de présence des ions divalents a été observée lors de la cristallisation du domaine N-terminal de PA. Le domaine présente une surface globalement chargée négativement avec une cavité encore plus acide (Dias et al., 2009; Crepin et al., 2010).

Yuan et al. ont cristallisé le domaine en présence de magnésium (100 mM) et ont pu identifier un ion Mg^{2+} interagissant avec les résidus acides conservés présents dans cette cavité. Les études fonctionnelles menées en parallèle ont montré que la mutation de ces résidus conservés sur PA affecte spécifiquement l'activité de transcription mais pas celle de réplication.

Dias et al. ont cristallisé le domaine en présence de manganèse et ont mis en évidence la présence de deux ions Mn^{2+} dans la cavité. Un des ions occupe la même position que celle occupée par l'ion Mg^{2+} dans la structure de Yuan *et al.* Le second ion manganèse se trouve quant à lui dans un site localisé à 4 Å du premier. Ceci suggère un mécanisme catalytique impliquant les deux ions métalliques. Le second Mn^{2+} interagit avec une histidine présente dans la cavité acide. L'histidine est un résidu connu pour interagir de façon spécifique avec le manganèse ce qui explique l'absence du second Mg^{2+} dans la structure de Yuan *et al.*

Dias et al. ont également montré que ce domaine isolé possédait une activité endonucléase dépendante de la présence d'ions Mn^{2+} , Co^{2+} ou Mg^{2+} sur des ARN et ADN simples brins. Cette activité avait été décrite précédemment dans le cadre de la RNP (Doan et al., 1999). La mutation de chacun des résidus impliqués dans la stabilisation du manganèse a montré leur implication dans l'activité de dégradation de l'ARN (Crepin et al., 2010). La cavité acide à la surface du domaine correspondant au site actif est entourée de résidus chargés positivement qui pourraient être impliqués dans le positionnement du pré-ARNm cellulaire en vue du clivage de la coiffe (Dias et al., 2009; Crepin et al., 2010). Le déchiffrement des rôles portés par la sous-unité PA est le parfait exemple de l'alliance des études structurales et fonctionnelles.

1.4.4.B LA SOUS-UNITE PB1, ACTIVITE POLYMERASE

Si l'ARN-polymérase est le cœur du virus de la grippe, la sous-unité PB1 est la pièce maîtresse de l'hétérotrimère puisqu'elle interagit avec les deux autres sous-unités via son extrémité N-terminale avec

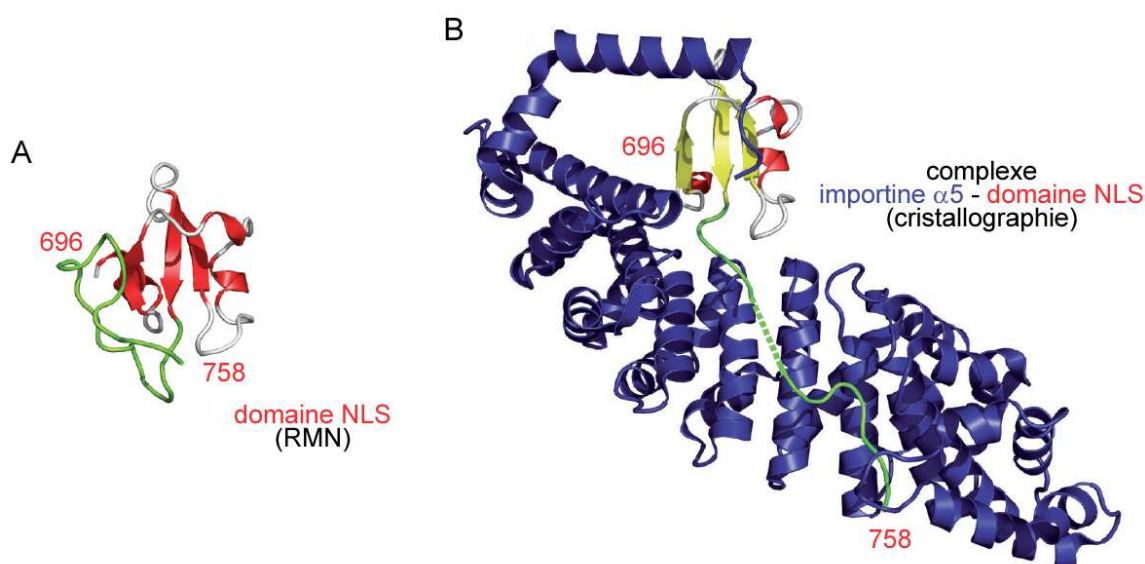
PA et via son extrémité C-terminale avec PB2. Seules ces zones d'interaction ont pu voir leurs structures résolues (12 % de la protéine).

Une courte hélice- α N-terminale (résidu 1 – 15) vient se loger dans la cavité présente au niveau du large domaine C-terminal de PA (He et al., 2008; Obayashi et al., 2008) (Figure 23.B). Du côté C-terminal, un ensemble de trois hélices- α (résidus 685 – 757) interagit avec les résidus 1 – 35 de PB2, également en hélice- α (Sugiyama et al., 2009) (Figure 23.D). Mis à part ces deux parties, aucune information structurale de PB1 n'est disponible.

Des mutations au niveau de ces régions d'interaction affectent drastiquement les activités transcriptionnelle et répliquative, ce qui témoigne de leur importance au sein de l'hétérotrimère. La région centrale de PB1 comporte les motifs conservés A-D spécifiques des ARN-polymérases ARN-dépendantes (Bruenn, 2003; Gorbalenya et al., 2002; Hansen et al., 1997; Poch et al., 1989) ainsi que le pré-motif A et le motif E. Ce dernier motif est spécifique des virus à ARN segmenté (Müller et al., 1994).

1.4.4.C LA SOUS-UNITE PB2, FIXATION DE LA COIFFE ET ADAPTATION A L'HÔTE

L'extrémité C-terminale de PB2 (résidus 686 – 759) a été le premier fragment de l'ARN-polymérase à voir sa structure résolue (Figure 23.F). Ce fragment a été nommé *Nuclear Localisation Signal* (NLS) car la structure a révélé qu'il contenait une séquence de localisation nucléaire bipartite. La structure de ce domaine a été obtenue par deux méthodes : par RMN, sous forme isolée en solution et par cristallographie, complexée à l'importine- $\alpha 5$ humaine (Tarendeau et al., 2007). Deux méthodes, deux structures et...des différences significatives : dans la structure obtenue par RMN (Figure 24.A), la séquence NLS est repliée contre le cœur globulaire du domaine alors que dans la forme complexée (Figure 24.B), cette séquence présente une conformation étendue se logeant dans le sillon présent à la surface de l'importine- α . Le couplage du domaine NLS à une sonde fluorescente (GFP) a permis de le suivre dans des cellules transfectées et de démontrer son implication dans le transport nucléaire de PB2. Des mutations ponctuelles de cette séquence NLS ont confirmé cette fonction en mettant en évidence l'inhibition de l'import nucléaire de PB2 (Tarendeau et al., 2007).



La structure du domaine central (Guilligay et al., 2008), résidus 320 – 483, a révélé un domaine possédant un repliement jamais décrit auparavant et impliqué dans la fixation de la coiffe de l'ARNm lors du processus de vol de coiffe (Figure 23.E). La structure, obtenue en présence de ^{7m}GTP (molécule analogue de la coiffe), a permis d'identifier les résidus impliqués dans la reconnaissance spécifique de la 7-méthyl-guanine. Ces résidus sont strictement conservés dans toutes les souches de virus de type A. La base méthylée chargée positivement du ^{7m}GTP est coincée entre les résidus aromatiques (His-357 et Phe-404) alors que la guanine est reconnue spécifiquement par les résidus Glu-361 et Lys-376. Le mode de reconnaissance de la coiffe présente des similitudes avec ceux précédemment décrits pour le complexe nucléaire *cap binding complex* (CBC) ou pour le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Mazza et al., 2002; Marcotrigiano et al., 1997). Néanmoins, dans le cas de PB2, l'affinité pour la coiffe est bien plus faible que celle observée dans le cas de ces protéines cellulaires. Un positionnement du substrat moins optimal pourrait expliquer ces différences. Ces observations structurales sont une fois de plus vérifiées *in cellulo*, dans le contexte d'une mini-RNP reconstituée, où la mutation de ces résidus clés abolit l'activité transcriptionnelle coiffe-dépendante mais pas l'activité répllicative.

Le troisième domaine de PB2 (résidus 538 – 678), dont la structure cristallographique a été résolue, présente également un nouveau repliement (Figure 23.F) (Tarendeau et al., 2008). Ce domaine contient le résidu 627 qui joue un rôle clé dans la spécificité du virus de la grippe pour son hôte. Chez les virus de type A humain, le résidu 627 est presque toujours une lysine (exception faite du virus pandémique A H1N1 de 2009) alors qu'il s'agit presque exclusivement d'un glutamate chez les virus de type A aviaires. En effet, la mutation E627K entraînerait une augmentation de l'activité polymérase dans les cellules de mammifère, en particulier à basse température. Ceci indique que cette mutation pourrait favoriser la réplication virale dans les voies aériennes supérieures chez l'homme, endroit du tractus respiratoire où la température est plus faible en comparaison au tractus digestif des oiseaux qui est le siège principal de la réplication virale (Naffakh et al., 2008). La lysine 627 est exposée au solvant en surface d'une région fortement chargée positivement. La mutation E627K perturbe également la surface électrostatique du domaine (Tarendeau et al., 2008). Une zone d'ombre entoure encore le mécanisme moléculaire sous-jacent de l'implication du résidu Lys / Glu 627 dans la prolifération virale (Naffakh et al., 2008).

La structure du double domaine 627-NLS a également été résolue et a montré que les deux domaines étaient connectés par une partie flexible s'étendant sur les résidus 678 – 685 (Tarendeau et al., 2008; Kuzuhara et al., 2009). La superposition de la structure du double domaine 627-NLS et de celle du domaine NLS en complexe avec l'importine- $\alpha 5$ révèle que l'orientation du domaine NLS par rapport au domaine 627 est incompatible avec celle observée lors de son interaction avec l'importine- $\alpha 5$. Cette constatation suggère qu'un réarrangement se produit lors de l'assemblage de l'ARN-polymérase. Les surfaces du domaine de fixation de la coiffe et du domaine 627-NLS sont toutes deux chargées positivement et sont donc susceptibles de participer à la fixation de l'ARN.

1.5 OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

L'ARN-polymérase est étudiée depuis de très nombreuses années pour les singularités qu'elle présente au sein d'un virus au fonctionnement complexe toujours mal compris. Elle constitue le cœur du virus de la grippe et joue le rôle principal dans le film de la prolifération virale. Par les motifs conservés entre les différentes souches qu'elle présente (motifs polymérases, zones d'interaction avec l'ARN), elle constitue une cible de choix pour le développement d'inhibiteurs potentiellement spécifiques. Obtenir sa structure cristallographique à haute résolution est donc primordiale pour la compréhension de son fonctionnement à l'échelle atomique et est indispensable à la fabrication de médicaments spécifiques. C'est pour ces raisons que de nombreux efforts ont été fournis pour son étude structurale.

La remarquable difficulté à obtenir l'ARN-polymérase dans sa totalité a conduit à son découpage en domaines isolés solubles (décrit dans le § 1.4.4, p 32). Cette stratégie a permis d'entamer l'étude fonctionnelle des activités portées par les différents fragments qui ont pu être produits et durant les huit dernières années, d'obtenir les structures cristallographiques de domaines indépendants couvrant approximativement la moitié de l'hétérotrimère :

- Les domaines d'interaction entre chaque sous-unité (He et al., 2008; Obayashi et al., 2008; Sugiyama et al., 2009).
- Le domaine endonucléase portée par PA dont l'activité a été décrite (Dias et al., 2009; Crepin et al., 2010).
- Une grande partie du reste de la sous-unité PA (He et al., 2008; Obayashi et al., 2008).
- Le domaine de fixation de la coiffe et le domaine d'adaptation à l'hôte sur PB2 (Tarendeau et al., 2007, 2008; Guilligay et al., 2008).

Cependant, la presque totalité de la sous-unité PB1 demeure inconnue.

Quelques reconstructions 3D par microscopie électronique de l'ARN-polymérase à basse et moyenne résolution sont disponibles (Figure 22) (Area et al., 2004; Coloma et al., 2009; Moeller et al., 2012; Resa-Infante et al., 2010; Torreira et al., 2007).

Une revue sur le complexe transcriptionnel et réplcatif des virus influenza intégrant les connaissances structurales actuelles sur l'ARN-polymérase ARN-dépendante a été rédigée (cf. partie Publications, p 183).

L'étude structurale de l'ARN-polymérase s'est donc heurtée à la difficulté d'obtenir ce complexe hétérotrimérique sous forme soluble et en grande quantité, deux conditions *sine qua non* imposées par la biologie structurale. Pour y parvenir, une nouvelle stratégie s'appuyant sur la combinaison des gènes codant pour les trois sous-unités en un seul gène de fusion a été développée. Cette stratégie a permis d'exprimer une première construction de l'hétérotrimère de l'ARN-polymérase tronquée à soixante-dix pour cent au niveau de la sous-unité PB2. C'est à partir de cette construction que les études biochimiques, fonctionnelles et structurales ont été initiées.

L'étude fonctionnelle s'est axée sur les activités présentes sur l'hétérotrimère tronqué et un accent particulier a été mis sur l'étude des interactions avec différents ARN viraux produits par transcription *in vitro*. La méthode utilisée dans ce projet pour la production d'ARN par transcription *in vitro* a fait l'objet d'un article (cf. partie Publications, p 183).

Dans le cadre de l'étude structurale, la structure macromoléculaire du complexe a été obtenue grâce à deux reconstructions 3D, avec et sans ARNv, par microscopie électronique à coloration négative

(respectivement à 20 Å et 25 Å de résolution) et à une troisième reconstruction 3D obtenue en cryo-microscopie électronique à 15 Å de résolution.

L'étude structurale par rayons-X constitue quant à elle le fil rouge du projet. S'il a été impossible d'obtenir des cristaux à partir de l'ARN-polymérase tronquée, des cristaux d'une construction minimale pour l'obtention de la sous-unité PB1 ont pu être obtenus. Malgré une longue stratégie d'optimisation de ces cristaux, le meilleur jeu de données collecté s'est limité aux environs de 8 Å. Le traitement de ces données est en cours au moment de l'écriture du manuscrit. Une enveloppe SAXS de cette construction a également pu être obtenue et sera confrontée à la structure cristallographique dès qu'elle sera résolue.

Le versant fonctionnel de ce projet a fourni des informations sur les activités catalytiques, en particulier sur l'importance des ions métalliques dans le processus répliatif. Pour aller plus en profondeur dans la complexité de cette mécanique, la distribution de ces ions dans la cellule infectée par le virus de la grippe a été étudiée par microscopie rayons-X. Cette étude s'est inscrite dans une démarche originale puisqu'à l'heure actuelle, cet aspect de l'infection est très peu documenté et a offert l'opportunité d'intégrer les données biochimiques et biophysiques à l'échelle de la cellule entière.

MATERIEL ET METHODES

2.1	STRATEGIE DE CLONAGE DE L'ARN-POLYMERASE POUR LE SYSTEME D'EXPRESSION EN BACULOVIRUS	42
2.2	EXPRESSION DE L'ARN-POLYMERASE EN CELLULES D'INSECTE	44
2.3	PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE	44
2.3.1	HETEROTRIMERE TRONQUE (PA-PB1-PB2NTER).....	44
2.3.2	PACTER-PB1 Δ CTER.....	44
2.3.3	PURIFICATION DES CONSTRUCTIONS EN PRESENCE D'ARN	45
2.3.4	FRACTIONNEMENT CYTOPLASMIQUE / NUCLEAIRE	45
2.4	WESTERN BLOT.....	46
2.5	PRODUCTION D'ARN_V PAR TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i>.....	46
2.5.1	TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i> PAR LA T7 POLYMERASE	47
2.5.1.A	CONCEPTION DES MATRICES ADN POUR LA TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i>	47
2.5.1.B	REACTION DE TRANSCRIPTION <i>IN VITRO</i>	47
2.5.2	PURIFICATION DE L'ARN PRODUIT SUR GEL DENATURANT	48
2.6	DIFFUSION DE LUMIERE LASER A ANGLES MULTIPLES ET REFRACTOMETRIE (SEC-MALLS-RI).....	50
2.7	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	50
2.7.1	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN COLORATION NEGATIVE	50
2.7.1.A	PREPARATION DES ECHANTILLONS	50
2.7.1.B	ACQUISITION ET TRAITEMENT DES IMAGES	50
2.7.2	CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	50
2.7.2.A	PREPARATION DES ECHANTILLONS	50
2.7.2.B	ACQUISITION ET TRAITEMENT DES IMAGES	50
2.7.2.C	METHODE GRAFIX.....	50
2.8	TEST DE STABILITÉ THERMIQUE : TSA (THERMAL SHIFT ASSAY)	51
2.9	DIFFUSION DES RAYONS-X AUX PETITS ANGLES (SAXS).....	51
2.10	CRISTALLOGRAPHIE RAYONS-X	52
2.11	ACTIVITE ENDONUCLEASE	52
2.12	ACTIVITE DE SYNTHÈSE D'ARN	52
2.13	MESURES DES AFFINITES ARN-POLYMERASE:ARN	52
2.13.1	ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	52
2.13.2	FILTER BINDING ASSAY (MESURE DES AFFINITES SUR FILTRE)	53
2.14	MICROSCOPIE RAYONS-X	54
2.14.1	PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE RAYONS-X.....	54
2.14.2	EXPERIENCE DE MICROSCOPIE RAYONS-X	55

Les travaux conduits par le laboratoire portent sur deux souches :

- Souche A/Victoria/3/1975 (H3N2)
- Souche A/VietNam/1203/2004 (H5N1)

Les gènes codant pour chaque sous-unité de l'ARN-polymérase employés pour cette étude, sont des gènes synthétiques optimisés pour l'expression en cellules d'insecte.

2.1 STRATÉGIE DE CLONAGE DE L'ARN-POLYMERASE POUR LE SYSTÈME D'EXPRESSION EN BACULOVIRUS

Différentes constructions de l'ARN-polymérase ont été réalisées. Chaque baculovirus recombinant codant pour une construction de l'ARN-polymérase a été réalisé au laboratoire suivant le protocole décrit dans Trowitzsch et al., 2010 et Garzoni et al., 2012 (Figure 25).

Les gènes codant pour chaque sous-unité sont combinés en un seul gène de fusion. Les gènes qui codent pour les sous-unités sont séparés par des liens du type GSGSG(**ENLYFQG**)AGSGSGSG avec, en leur centre (en gras) la séquence codant pour un site de clivage à la protéase TEV.

Le gène de fusion est cloné dans le vecteur pBac (Imre Berger, EMBL Grenoble) dans une cassette de clonage entre le gène codant pour la protéase TEV et celui codant pour une protéine rapporteur de l'expression protéique : la CFP (Cyan Fluorescent Protein, $\lambda_{\text{excitation}} = 430 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 450 - 550 \text{ nm}$). Les bactéries DH10EMBacY (Imre Berger, EMBL Grenoble) sont transformées avec le plasmide pBac recombinant. Elles contiennent le matériel génétique du baculovirus (EMBacY). Le pBac contenant le gène de fusion est intégré à l'ADN du baculovirus EMBacY via une transposition Tn7. Les clones positifs sont identifiés par une sélection blanc/bleu et validés par un nouvel isolement sur boîte LB agar Kanamycin / Tetracycline / Gentamycin / IPTG / BluOGal.

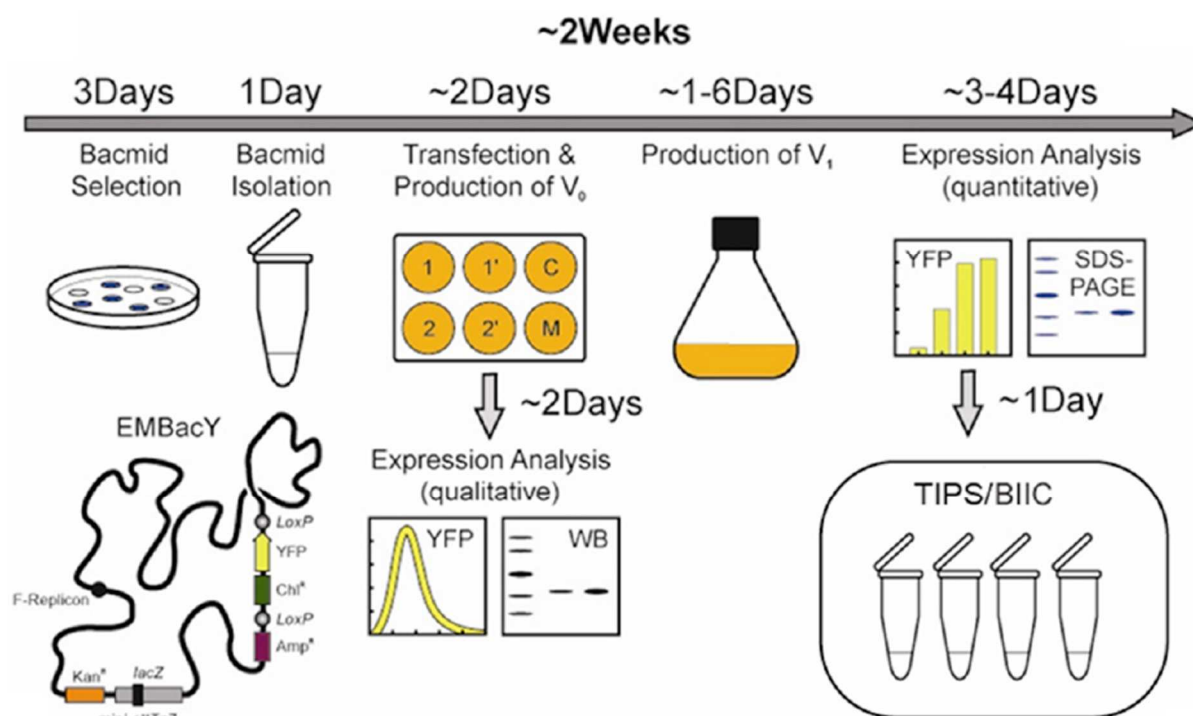


Figure 25 : Procédures standards d'expression en cellules d'insectes. Le plasmide pBac contenant le gène de fusion codant pour l'ARN-polymérase est intégré dans l'ADN du baculovirus EMBacY par transposition Tn7. Les clones positifs sont identifiés par une sélection blanc / bleu. L'ADN EMBacY recombinant est purifié (Bacmid isolation) et utilisé pour transfecter des cellules d'insecte (Transfection) en plaques six puits. Deux clones pour chaque construction sont manipulés en parallèle et en duplicata (1, 1' et 2, 2'). Un puits avec des cellules non-infectées (C) et un autre avec du milieu sans cellule (M) sont utilisés comme contrôle. Le baculovirus primaire (V₀) est collecté et amplifié (Production of V₁). Une analyse qualitative (Expression analysis, qualitative) du baculovirus primaire peut être réalisée par mesure du signal YFP et par Western Blot avec des anticorps spécifiques sur les cellules d'insecte ayant servi à sa production. 48 h après arrêt de la division cellulaire, le baculovirus amplifié (V₁) est récolté par centrifugation douce, les cellules sont resuspendues dans du milieu frais et le signal de YFP et de CFP est suivi jusqu'à obtention d'un plateau. La production d'ARN-polymérase est ensuite analysée sur gel de polyacrylamide et permet la validation du baculovirus qui sera utilisé pour l'expression à grande échelle. Des stocks de cellules d'insecte infectées par le baculovirus peuvent être préparés pour un stockage à long-terme des baculovirus (TIPS/BIIC) (Garzoni et al., 2012).

Après 3 jours, l'ADN EMBacY recombinant est purifié à partir d'une culture de 2 mL inoculée avec une seule colonie positive et utilisé pour transfecter des cellules d'insecte *Spodoptera frugiperda* (Sf21) adhérentes en plaques six puits cultivées en milieu Express Five SFM (Gibco, Life Technologies). 48 à 60 h après transfection, le milieu contenant le baculovirus virus primaire (V₀) produit est collecté et utilisé pour infecter une culture de 25 mL de Sf21 en Erlenmeyer : il s'agit de l'étape d'amplification du V₀ qui permet de produire une seconde génération de virus (V₁) à partir du (V₀). L'ADN du baculovirus EMBacY présente un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente, la YFP (Yellow Fluorescent Protein, $\lambda_{excitation} = 488$ et $\lambda_{émission} = 515 - 550$), dont le signal est le témoin de la prolifération du baculovirus. Du milieu frais est ajouté aux puits de la plaque et, deux jours plus tard, une première analyse qualitative de la production de protéines peut être effectuée après récolte des cellules, par mesure du signal de la YFP, et par Western Blot avec des anticorps spécifiques des sous-unités du complexe hétérotrimérique. Les 25 mL de culture sont quant à eux maintenus à 1.10^6 cellules.mL⁻¹ jusqu'à l'arrêt de la division cellulaire provoquée par l'infection par le baculovirus. 1 million de cellules sont prélevés toutes les 12 h pour mesurer le signal de fluorescence de la YFP. Le milieu contenant le virus amplifié (V₁) est collecté par centrifugation douce (100 rcf ; 3 min) environ 48 h après arrêt de la division cellulaire. Les cellules sont resuspendues délicatement dans du milieu frais et récoltées à l'obtention du plateau de YFP et de CFP. Cette dernière étape permet d'analyser la production de l'ARN-polymérase sur gel de polyacrylamide et de valider le baculovirus.

Le baculovirus V₁ est utilisable pour l'expression à grande échelle.

2.2 EXPRESSION DE L'ARN-POLYMERASE EN CELLULES D'INSECTE

Les cellules d'insecte *Trichopulsia ni* (Hi5) sont utilisées pour l'expression à grande échelle. Le métabolisme d'expression plus efficace des Hi5 est privilégié pour l'expression à grande échelle. Des cultures de 250 mL de cellules d'insecte Hi5 à $0,5 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹ cultivées en milieu Express Five SFM complété en L-Glutamine (Gibco, Life Technologies) sont infectées avec 0,2% de virus. Les cellules sont maintenues à $1 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹ jusqu'à l'arrêt de la division cellulaire. Les valeurs de YFP et de CFP sont mesurées au fluorimètre (Tecan Infinite M200 Pro) (λ excitation YFP = 488 nm et λ excitation CFP = 430 nm) toutes les 24h jusqu'à l'obtention d'un plateau. Elles sont respectivement les témoins quantitatifs de la prolifération du virus et de l'expression protéique. Au plateau de fluorescence, les cultures sont centrifugées (15 min ; 1000 g) et les culots stockés à -80°C. L'expression en cellules d'insecte nécessite une semaine avec des cellules Hi5 (ce temps peut être plus long avec d'autres types de cellules d'insecte). En effet, il est nécessaire, en amont de l'infection, de préparer suffisamment de cellules à la concentration adéquate. L'expression se déroule sur trois ou quatre jours selon les performances du baculovirus.

2.3 PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE

Les protocoles de purification pour chaque construction réalisée sont décrits dans cette partie.

2.3.1 HETEROTRIMERE TRONQUE (PA-PB1-PB2NTER)

La purification de cette construction se déroule en deux étapes successives : une chromatographie d'affinité sur résine nickel, suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille.

1^{ère} étape : Chromatographie d'affinité sur résine nickel

Les culots sont repris dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; 0.1% NP40 ; 1 mM β -mercaptoéthanol + complete EDTA-free (ROCHE)). Les cellules sont lysées par deux cycles de congélation (azote liquide) / décongélation (27°C). Après centrifugation, le surnageant est récupéré et la protéine est purifiée sur résine nickel (Ni-NTA Superflow, Quiagen). L'élution est réalisée avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; 0.1% NP40 ; 5 mM β -mercaptoéthanol ; 300 mM imidazol. Les fractions d'élution de 500 μ l sont récoltées en tubes eppendorf contenant 500 μ l d'un tampon de stabilisation 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; 30% glycérol ; 5 mM β -mercaptoéthanol. Des tests préliminaires de stabilité (48 conditions de solubilisation) ont en effet montré que le complexe était stabilisé dans ~ 15 % glycérol. Un gel SDS-PAGE 12% est réalisé pour le suivi et l'échantillon est concentré.

2^{ème} étape : Chromatographie d'exclusion de taille

Une chromatographie par tamisage moléculaire (Superdex 200, 125 mL, GE Healthcare ; débit 0,4 mL.min⁻¹ ; vol. de fraction 1ml) est ensuite réalisée. La colonne est équilibrée avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; 10% glycérol ; 5 mM β -mercaptoéthanol. Un gel SDS-PAGE 12% est réalisé et l'échantillon est concentré.

2.3.2 PACTER-PB1 Δ C_{TER}

La purification de cette construction se déroule en trois étapes successives : une chromatographie d'affinité sur résine nickel suivie d'une chromatographie sur héparine et d'une chromatographie d'exclusion de taille.

1^{ère} étape : Chromatographie d'affinité sur résine nickel

Les culots sont repris dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 2 mM β -mercaptoéthanol + complete EDTA-free (ROCHE)). Les cellules sont lysées par deux cycles de congélation (azote liquide) / décongélation (27°C). Après centrifugation, le surnageant est récupéré et la protéine est purifiée sur résine nickel (Ni-NTA Superflow, Qiagen). L'élution est réalisée avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM β -mercaptoéthanol ; 300 mM imidazole. Un gel SDS-PAGE 12% est réalisé pour le suivi de la purification et l'échantillon est concentré.

2^{ème} étape : Chromatographie sur héparine

La colonne héparine (5 mL, GE Healthcare) est lavée avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 1 M NaCl ; 5 mM β -mercaptoéthanol puis équilibrée dans le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM β -mercaptoéthanol jusqu'à ce que la valeur de conductimétrie soit stable. L'échantillon est chargé sur la colonne puis élué par un gradient linéaire de concentration en NaCl réalisé grâce aux deux tampons mentionnés ci-dessus. Un gel SDS-PAGE 12 % est réalisé pour le suivi de la purification et l'échantillon est concentré.

3^{ème} étape : Chromatographie d'exclusion de taille

Une chromatographie par tamisage moléculaire (Superdex 200, 125 mL, GE Healthcare ; débit 0,4 mL.min⁻¹ ; vol. de fraction 1 mL) est ensuite réalisée. La colonne est équilibrée avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM β -mercaptoéthanol. Un gel SDS-PAGE 12% est réalisé et l'échantillon est concentré.

2.3.3 PURIFICATION DES CONSTRUCTIONS EN PRESENCE D'ARN

Les protocoles de purification propre à chaque construction protéique sont suivis. L'ARN est ajouté en excès (rapport molaire protéine:ARN 1:5 à 1:10) dans les fractions d'élution lors de la chromatographie d'affinité. Pour la construction de l'hétérotrimère tronqué, l'ARN est ajouté avant le tampon de stabilisation dans chaque fraction d'élution.

2.3.4 FRACTIONNEMENT CYTOPLASMIQUE / NUCLEAIRE

Extraction cytoplasmique

Un culot de cellules correspondant à 380 mL de culture est repris dans 40 mL tampon de lyse 100 mM KCl ; 50 mM Tris pH 7,4 ; 0,1 % NP40 ; 5 mM MgCl₂. Les cellules sont lysées en agitant violemment et par aspiration / refoulement avec une pipette pendant 2 min. Après une centrifugation (4000 RPM, 5 min), le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est récupéré avec précaution. Cette première étape de lyse est répétée cinq fois. Le surnageant est directement placé dans un tube contenant 2 mL de résine nickel (NiNTA Superflow, Qiagen) et placé sur une roue d'agitation à 4 °C durant 1 h. L'élution est réalisée avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; 5 mM β -mercaptoéthanol ; 300 mM imidazole. Les fractions d'élution de 500 μ L sont récoltées en tubes eppendorf contenant 500 μ L d'un tampon de stabilisation 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; 30% glycérol ; 5 mM β -mercaptoéthanol et déposées sur gel SDS-PAGE 12 %.

Extraction nucléaire

Les culots contenant les noyaux sont resuspendus dans le tampon 400 mM KCl ; 50 mM Tris pH 7,4 ; 5 mM MgCl₂ et agités violemment. L'excès de mousse (NP40) est retiré et 45 μ L de Leupeptine à 1 mg.mL⁻¹, 45 μ L de Pepstatine A à 1 mM et 9 μ L de β -mercaptoéthanol à 14,3 M sont ajoutés. L'échantillon est ensuite placé sur une roue d'agitation à 4 °C durant 3 h. L'extraction protéique se fait graduellement, l'échantillon prenant un aspect gélatineux. Après centrifugation (4000 rpm, 10 min à 4 °C), le surnageant est placé dans un nouveau tube et centrifugé 20 min à 15000 rpm à 4 °C. Le surnageant contient la

fraction protéique nucléaire. Le protocole d'élution est identique à celui suivi pour la fraction cytoplasmique.

2.4 WESTERN BLOT

Les échantillons sont déposés sur gel polyacrylamide. Après migration, les protéines dans le gel sont transférées sur membrane de PVDF (Polyvinylidène Difluoride) dans un tampon 191 mM glycine ; 25 mM Tris ; 1 % SDS ; 10 % éthanol (1h ; 100V ; 4°C). La membrane est saturée dans du PBS-Tween 0,1% ; 5% lait pendant 1h. Une fois saturée, la membrane est incubée pendant 1h dans la solution de saturation contenant un ou plusieurs anticorps primaire(s) (Tableau 2) puis lavée dans du PBS-Tween 0,1%. Le Western Blot est révélé par la mise en présence d'anticorps secondaires fluorescents (Tableau 2) visualisés grâce à un scanner spécifique (Typhoon Trio Phosphorimager, Amersham Biosciences).

Tableau 2 : Liste et caractéristiques des anticorps utilisés. Les anticorps dirigés contre les sous-unités PA, PB1 et PB2 ont été fournis par Juan Ortín, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Espagne

Anticorps primaires	Origine et caractéristiques
Anti-PA	Lapin, issus de sérum
Anti-PB1	Souris, monoclonal
Anti-PB2	Lapin, issus de sérum
Anticorps secondaires	
Alexa Fluor 532 (Life technologies)	Chèvre ; anti-souris IgG (H+L) ; $\lambda_{\text{excitation}} = 531$; $\lambda_{\text{émission}} = 554$
Alexa Fluor 633 (Life technologies)	Chèvre, anti-lapin IgG (H+L) ; $\lambda_{\text{excitation}} = 632 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 647 \text{ nm}$

2.5 PRODUCTION D'ARN_V PAR TRANSCRIPTION *IN VITRO*

Toutes les manipulations sont réalisées dans des conditions « RNase-free ».

La réaction de transcription est basée sur le protocole décrit dans Price et al., 1995.

Cette méthode a fait l'objet d'une publication : Dégut, C., Monod, A., Brachet, F., Crépin, T., and Tisné, C. (2014). *In vitro / in vivo* production of tRNA for X-ray studies (*soumis*) (cf. partie Publications, p 183).

La méthode de transcription *in vitro* consiste à fournir à une ARN-polymérase tous les substrats nécessaires à la synthèse d'une molécule d'ARN :

- matrice ADN
- nucléotides
- tampon avec les sels et les ions indispensables au fonctionnement de l'enzyme

Bien qu'assez ancienne (fin des années 80), cette méthode demeure très efficace et peut permettre d'obtenir jusqu'à 5 à 10 mg d'ARN pur à 99 % après un cycle de transcription.

L'ARN-polymérase du bactériophage T7 est souvent utilisée pour la production d'ARN par transcription *in vitro* (Studier and Moffatt, 1986). Elle utilise un promoteur spécifique (5'TAATACGACTCACTATA3') derrière lequel la matrice ADN codant pour la séquence d'ARN à transcrire est clonée.

2.5.1 TRANSCRIPTION *IN VITRO* PAR LA T7 POLYMERASE

Pour obtenir une transcription efficace, le premier nucléotide du transcrit ARN doit être une guanosine. L'efficacité catalytique de l'ARN-polymérase T7 dépend en effet de la nature de la base en position +1. La guanosine est la base préférentielle d'initiation et l'efficacité transcriptionnelle décroît suivant l'ordre $G > C > A > U$. Cette particularité provient des préférences de l'enzyme pour amorcer la réaction. L'élongation de la chaîne se fait dans le sens $5' \rightarrow 3'$. Seul le brin antisens (-) de l'ADN est complémentaire de l'ARN néo-synthétisé. Cela implique que le brin antisens (-) sert de matrice à la polymérase pour synthétiser le brin sens (+). Le mécanisme de la réaction correspond à l'attaque nucléophile de la fonction $3'OH$ de la base N de l'ARN sur le phosphate α de la base N+1. La réaction produit en plus de l'ARN du pyrophosphate (PPi), à raison d'une molécule de PPi par base incorporée.

2.5.1.A CONCEPTION DES MATRICES ADN POUR LA TRANSCRIPTION *IN VITRO*

La matrice ADN codant pour l'ARN est conçue de façon identique pour chaque ARN. Elle est générée par assemblage d'oligonucléotides aux extrémités cohésives. La séquence ADN codant pour l'ARN à transcrire est suivie du site de restriction de l'enzyme Earl (New England BioLabs) en 3' qui sera utilisé pour la linéarisation du plasmide. Ce site de clivage permet de générer un clivage juste derrière la dernière base codant pour la séquence ARN désirée. L'ensemble est flanqué aux extrémités 3' et 5' par les sites de restriction aux enzymes HindIII et EcoRI respectivement (New England BioLabs). La séquence codante pour l'ARN à transcrire est clonée dans le plasmide pUC19 entre les sites de restrictions HindIII et EcoRI (New England BioLabs) (Figure 26).

2.5.1.B REACTION DE TRANSCRIPTION *IN VITRO*

1 mg de plasmide pUC19 contenant la séquence d'ADN à transcrire est linéarisé par l'enzyme de restriction Earl (New England BioLabs) durant 2h à $37^\circ C$ (Figure 26). La réaction est vérifiée sur gel d'agarose et doit être totale. L'enzyme de restriction ainsi que les RNases éventuellement présentes sont éliminées par deux extractions au phénol / chloroforme. L'ADN est précipité à l'éthanol et la réaction de transcription à grande échelle est effectuée durant 4 h à $37^\circ C$ dans un volume de 10 mL contenant 40 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 5 mM DTT ; 1 mM Spermidine ; 0,01 % Triton X-100 ; 30 mM $MgCl_2$; 0,1 mg.mL⁻¹ DNA ; 4 mM NTPs ; 40 $\mu g.mL^{-1}$ T7 RNA-polymérase. Un volume de tampon de charge (TBE 1X ; 8 M urée ; 0,01 % bleu de xylene cyanol et de bromophénol) est ajouté à un volume de réaction de transcription pour stopper la réaction. Les réactions peuvent être stockées à $-20^\circ C$.

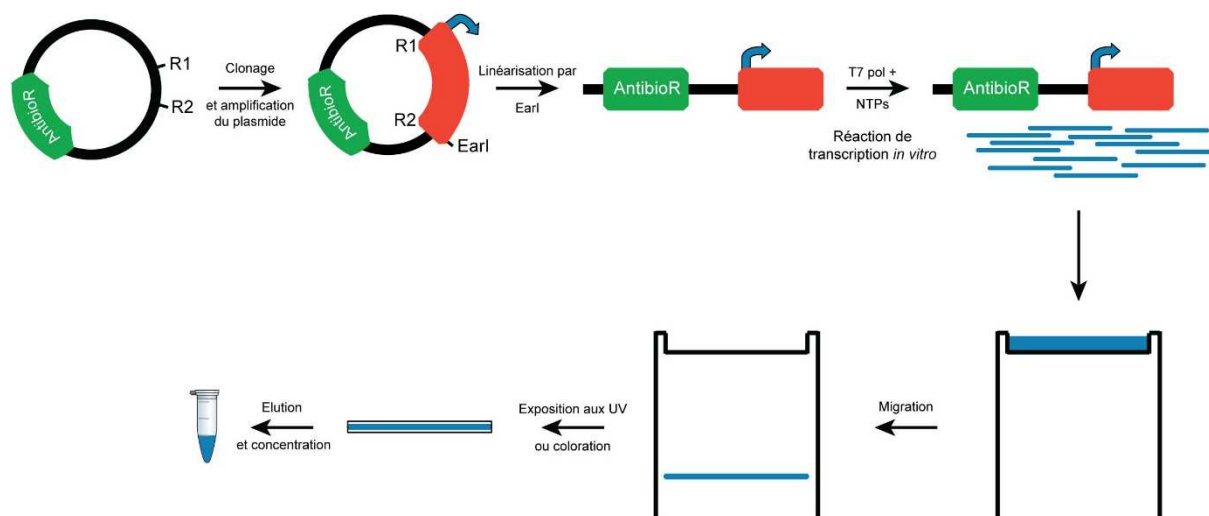


Figure 26 : Résumé des étapes de production d'ARN par transcription *in vitro*.

2.5.2 PURIFICATION DE L'ARN PRODUIT SUR GEL DENATURANT

L'homogénéité d'un échantillon est cruciale pour la cristallisation. Un désavantage de la production d'ARN par transcription *in vitro* repose sur la tendance qu'a l'ARN-polymérase T7 à ajouter un ou plusieurs nucléotides (le plus souvent des adénosines) à l'extrémité 3' des transcrits ARN. Elle peut également générer des transcrits abortifs. Ces erreurs sont imputables aux changements du milieu réactionnel lors de la réaction qui entraînent une baisse de la fidélité de l'enzyme. Ceci conduit à une hétérogénéité des transcrits ARN au niveau de leur extrémité 3' (Figure 27.A, flèches orange). La purification sur gel de polyacrylamide / urée (Figure 26) permet d'atteindre un niveau de résolution à l'échelle du nucléotide et ainsi d'isoler les ARN correctement transcrits à l'extrémité 3' (Figure 27.B).

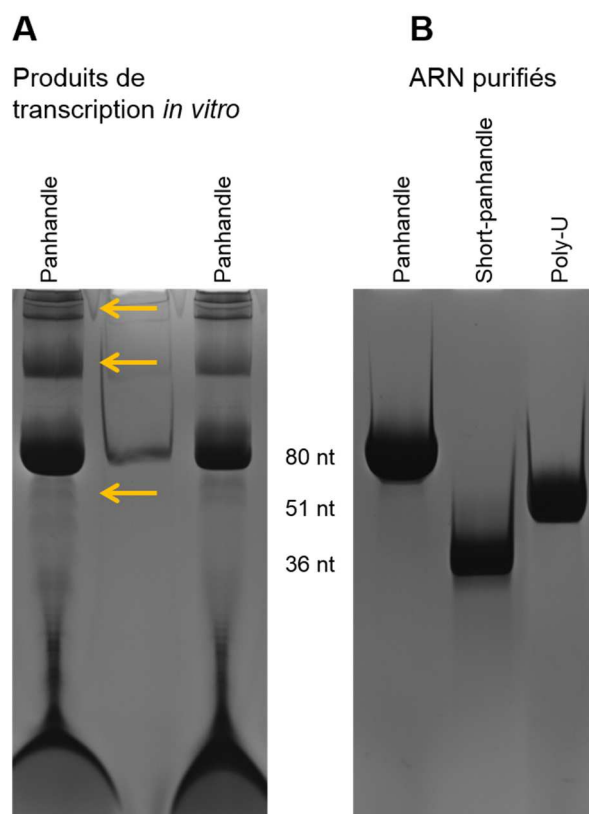


Figure 27 : ARN produits par transcription *in vitro* avant purification (A) et après purification sur gel 15 % polyacrylamide 8 M urée (B).

Le produit de transcription est vérifié sur un gel de polyacrylamide (polyacrylamide:Bis-acrylamide 19:1) dénaturant 8 M urée avant d'être purifié sur un grand gel (420 x 330 x 3,5 mm ; type gel de séquençage) préalablement préchauffé durant 2 h dans le tampon de migration TBE 1X. Le pourcentage d'acrylamide 19:1 approprié a été déterminé selon la taille de la molécule d'ARN à purifier (Tableau 3). La migration dure de 6 à 8 h selon le pourcentage d'acrylamide du gel.

Tableau 3 : Pourcentages des gels d'acrylamide:Bis-acrylamide 19:1 en fonction de la taille de l'ARN à purifier. Pour chaque pourcentage, les volumes d'acrylamide:Bis-acrylamide 19:1 sont indiqués pour préparer une solution de gel de 10, 50 ou 300 mL.

Molécule d'ARN (nucléotides)	Acrylamide 19:1 (%)	Gel de 10 mL (mL)	Gel de 50 mL (mL)	Gel de 300 mL (mL)
< 50	15	3,75	18,75	112,5
50	12	3	15	90
100	10	2,5	12,5	75
> 100	8	2	10	60

Deux méthodes peuvent être utilisées pour visualiser la bande correspondant à l'ARN :

- I) Par exposition aux UV sur une plaque de silice, « UV-shadowing ». Le gel est retiré du système, emballé dans un film plastique, placé sur une plaque de silice et exposé aux UV (longueur d'onde proche de 254 nm). La silice reflète les UV alors que l'ARN les absorbe. L'ombre qui est alors observée correspondant à la bande d'ARN.
- II) Par coloration au bleu de méthylène. Une fine bande est découpée sur la longueur du gel, colorée avec une solution de bleu de méthylène 0,2 % et décolorée dans l'eau. Dans ce cas, une petite quantité d'ARN est perdue par comparaison avec la première méthode.

La bande correspondant à l'ARN est excisée avec une lame de scalpel et placée dans un tube falcon de 50 mL. Le gel est ensuite broyé avec une spatule métallique. L'ARN est élué par diffusion dans 40 mL d'une solution 0,3 M acétate de sodium pH 5,2 sur une roue rotative d'agitation durant plusieurs heures. Le temps nécessaire dépend de la taille de l'ARN, du pourcentage en acrylamide du gel et de la taille des particules broyées. L'éluat est filtré sur système Millipore 0,2 µm. Les particules de gel sont récupérées avec une cuillère en plastique et placées dans le même tube Falcon pour une deuxième élution. Cette étape peut encore être répétée une fois de plus.

L'éluat (dans 0,3 M acétate de sodium) est concentré sur résine DEAE sépharose. Une petite colonne est reliée via un petit tube plastique à une seringue de 50 mL qui sert de réservoir. Avant usage, le système est nettoyé avec 1 M NaOH et abondamment rincé avec de l'eau distillée. 1 mL de résine est placé dans la colonne et équilibré avec le tampon 0,3 M NaOAc pH 5,2. L'échantillon est déposé sur la colonne et le système est lavé avec 10 mL de tampon 0,3 M NaOAc pH 5,2. L'ARN est finalement élué avec 7 mL de tampon 3 M NaOAc pH 5,2 et précipité par l'ajout de 21 mL d'éthanol froid. L'échantillon est ensuite placé à -80 °C.

Après précipitation à l'éthanol et centrifugation (30 min à 4 °C, 16000 rpm), le surnageant est retiré, le culot est séché à l'air libre et resuspendu dans 2,5 mL d'eau. Les 2,5 mL d'échantillons sont ensuite dessalés sur colonne PD10 (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec de l'eau. L'ARN élué avec 3,5 mL d'eau est réparti dans deux tubes eppendorf de 2 mL et concentré par évaporation par centrifugation sous vide (SpeedVac) jusqu'à la concentration désirée. Les ARN purifiés sont enfin déposés sur gel polyacrylamide 8 M urée pour vérifier leur qualité.

2.6 DIFFUSION DE LUMIÈRE LASER À ANGLES MULTIPLES ET REFRACTOMETRIE (SEC-MALLS-RI)

La colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Superdex S200, 25 mL, GE Healthcare) et l'appareillage de MALLS (Biophysical Platform, UVHCL-PSB Grenoble) sont équilibrés avec le tampon de la protéine durant la nuit. La colonne est couplée à un réfractomètre Optilab T-rEX (Wyatt Technology) et à un système de diffusion de lumière à multi-angles DAWN HELEOS-II (Wyatt Technology). 50 µl de protéine (concentration > 1 mg.mL⁻¹) sont injectés (débit : 0,5 mL.min⁻¹).

2.7 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

2.7.1 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE EN COLORATION NÉGATIVE

Les clichés de microscopie électronique ont été pris grâce aux microscopes disponibles sur la plateforme de microscopie électronique (IBS, Grenoble).

2.7.1.A PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de protéine à 0,1 mg.mL⁻¹ sont préparés selon la technique de flottaison du carbone et colorés grâce à une solution de Sodium Silico Tungstate (SST) à 2 % (Franzetti et al., 2002; Schoehn and Ruigrok, 2008).

2.7.1.B ACQUISITION ET TRAITEMENT DES IMAGES

Les grilles sont visualisées avec les microscopes Phillips CM12 et FEI Tecnai12 120 kV LaB6. Les images sont enregistrées sur caméra CCD Orius 1000 (Gatan). La suite de programmes SPIDER (Frank et al., 1996) a été utilisée pour le traitement des images et la reconstruction en 3D.

2.7.2 CRYO-MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

2.7.2.A PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

3 µL d'échantillon à 2 mg.mL⁻¹ sont appliqués sur la face carbonée d'une grille à trous Quantifoil R2/2 (Quantifoil, <http://www.quantifoil.com/>) ou « Lacey carbon grid » (<http://www.agarscientific.com/>) préalablement rendues hydrophile par un processus de bombardement ionique (glow discharge). L'excès de liquide est ensuite drainé à l'aide de papiers filtres pour ne laisser qu'une très fine couche d'échantillon dans les trous (« blotting »), enfin la grille est vitrifiée dans un bain d'éthane liquide. Un automate (Vitrobot MARK IV, FEI) permet de préparer les grilles en contrôlant température, humidité et temps de drainage. Les grilles sont stockées dans de l'azote liquide avant d'être transférées dans le microscope.

2.7.2.B ACQUISITION ET TRAITEMENT DES IMAGES

L'acquisition des images en cryo-microscopie électronique est réalisée au microscope électronique FEI Tecnai POLARA 300 kV FEG en mode faible dose (pour limiter au maximum les dommages d'irradiation). Les images sont enregistrées sur film KODAK SO-163. Les films, une fois développés, sont scannés avec un pas de 7 µm au scanner Intergraph et les images sont traitées pour la reconstruction en 3D grâce à la suite de programmes SPIDER (Frank et al., 1996).

2.7.2.C MÉTHODE GRAFIX

Ce protocole permet la stabilisation des complexes macromoléculaires et a été établi selon la méthode GraFix (Kastner et al., 2008; Stark, 2010). Le principe est décrit dans le 4.1.2.C, p 80.

Le glutaraldéhyde utilisé dans ce protocole réticule les amines primaires. Le tampon Tris présentant une fonction amine primaire dans sa structure chimique ne peut donc pas être utilisé et a été remplacé par de l'HEPES à un pH et à une concentration molaire équivalente.

Les gradients de glycérol sont réalisés dans des tubes de 5 mL Ultra-Clear (#344057, Beckman Coulter). Un système à double chambre pour la préparation de gradients en combinaison avec une pompe péristaltique est utilisé pour obtenir un gradient de densité continue de 10 à 30 %. Deux tampons 50 mM HEPES pH 8 ; 5 mM $MgCl_2$; 300 mM NaCl ; sont préparés avec respectivement 10 % et 30 % de glycérol. Le glutaraldéhyde est ajouté à la solution la plus dense juste avant le remplissage du système à double chambre. Un gradient sans glutaraldéhyde est réalisé comme contrôle pour vérifier que la présence du glutaraldéhyde ne modifie pas la sédimentation de la particule. Environ 200 pmol d'ARN-polymérase dans un volume maximum de 400 μ L sont déposés au sommet de chacun des gradients qui sont centrifugés 16 h à 45000 RPM sur rotor à nacelles SW55Ti (Beckman Coulter) en ultracentrifugeuse Beckman Coulter Optima XPN-80. Les vitesses et temps de rotation ont été paramétrés pour que les macromolécules sédimentent aux deux tiers du gradient. Après centrifugation, les gradients sont fractionnés. Des fractions de 180 μ L sont collectées à partir du fond du gradient grâce à un capillaire rattaché à une pompe péristaltique. Le glutaraldéhyde résiduel est inactivé dans chaque fraction par ajout de Tris à une concentration finale de 80 mM. L'efficacité de la réticulation est vérifiée en déposant les fractions sur gel 5 % SDS-PAGE. Les fractions contenant le complexe réticulé sont rassemblées et chargées sur colonne d'échange de tampon (PD MiniTrap G-25, GE Healthcare) pour éliminer le glycérol en vue de la cryo-microscopie électronique.

2.8 TEST DE STABILITÉ THERMIQUE : TSA (THERMAL SHIFT ASSAY)

Le principe du TSA est décrit dans le 4.2.2.B, p 90. Les essais sont réalisés dans un appareil de RT-PCR (Mx3005P Q-PCR, Stratagene) avec 2 à 3 μ M d'ARN-polymérase dans le tampon désiré avec 1 μ L de la sonde (Sypro Orange 5000X concentré dans du DMSO, Invitrogen) comme décrit dans Ericsson et al., 2006 (volume total = 50 μ L). La sonde fluorescente est excitée à 490 nm et l'émission lumineuse est enregistrée à 575 nm pendant que la température est augmentée par palier de 1°C par minute de 25°C à 95°C. Les contrôles sont réalisés en absence de protéine ou de sonde pour vérifier qu'il n'y a pas de fluorescence enregistrée.

2.9 DIFFUSION DES RAYONS-X AUX PETITS ANGLES (SAXS)

Les données de diffusion de lumière aux petits angles (SAXS, Small Angle X-ray Scattering) ont été collectées sur la ligne BM29 à l'ESRF. Cette ligne de lumière est équipée d'un système HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) sur laquelle une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (S200, 10 mL, GE Healthcare) peut être branchée en amont de la ligne pour obtenir une homogénéité optimale de l'échantillon. PACter-PB1 Δ Cter a été injectée à 15 mg.mL⁻¹. Les données ont été collectées dans l'intervalle Q 0,01 – 0,50 Å⁻¹, où $Q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, 2θ est l'angle de diffusion et $\lambda = 1,03$ Å la longueur d'onde des rayons-X. Le détecteur est un pilatus 1M. Les données de diffusion correspondant au pic d'éluion ont été rassemblées et la diffusion du tampon seul a été soustraite en utilisant le programme PRIMUS (Konarev et al., 2003). Le rayon de giration R_g a été calculé par l'analyse de Guinier. La fonction de distribution de la distance $p(r)$ a été calculée en utilisant le programme GNOM (Svergun, 1992). Le programme DAMMIF (Franke and Svergun, 2009) a été utilisé pour générer 20 reconstructions à basse résolution *ab initio* avec une symétrie P2 imposée. Le volume de la particule est issu de DAMMIF. La moyenne de ces modèles a été calculée par le programme DAMAVER (Volkov and Svergun, 2003) et le

modèle final a été affiné via le programme. DAMMIN (Svergun, 1999) à partir du fichier *damstart* généré par DAMAVER. Les figures ont été réalisées grâce au programme PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6 Schrödinger, LLC). L'estimation de la masse moléculaire a été calculée grâce à la méthode décrite dans Rambo and Tainer, 2013.

2.10 CRISTALLOGRAPHIE RAYONS-X

Le criblage initial en gouttes assises a été réalisé à 4°C grâce un robot haut-débit de cristallisation disponible au sein du PSB (HTX, EMBL Grenoble) en mélangeant 100 nL de la solution de protéine (18 mg.mL⁻¹) à 100 nL de la solution de précipitant. Les données de diffraction des cristaux ont été collectées à 100 K sur la ligne ID23-2 à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble) grâce à un détecteur Pilatus 2M. Les données de diffraction des rayons-X ont été traitées et mises à l'échelle dans le groupe d'espace P6 avec la suite XDS (Kabsch, 1993, 2010a, 2010b). La structure tridimensionnelle à basse résolution est en cours de résolution.

2.11 ACTIVITE ENDONUCLEASE

Les tests sont réalisés avec un ARN poly-uridine (poly-UC) non structuré de 52 nucléotides (Saito et al., 2008; Dias et al., 2009). L'ARN-polymérase à une concentration d'environ 12 µM est incubée avec l'ARN poly-UC (10 µM) à 37°C durant 2 h dans le tampon de réaction 50 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 25 mM KCl ; 2,5 mM NaCl ; 10 mM β-mercaptoéthanol avec ou sans 1 mM MnCl₂ (volume final = 30 µl). L'inhibition de l'activité endonucléase par l'acide 2,4-dioxo-4-phenylbutanoïque (DPBA) est réalisée dans les mêmes conditions. Parce que le DPBA est peu soluble dans l'eau, une solution stock de DPBA à 60 mM est préparée dans 50 % éthanol et 1 µL de cette solution est ajouté au volume réactionnel pour obtenir une concentration finale de 2 mM. L'addition d'éthanol ne change pas le pH du mélange réactionnel et l'ajout d'éthanol seul à la même concentration n'a aucune influence sur l'activité endonucléase. La réaction est arrêtée par addition d'EGTA à une concentration finale de 20 mM. Les produits de la réaction sont déposés sur gel d'urée 15% polyacrylamide et révélés par coloration au bleu de méthylène.

2.12 ACTIVITE DE SYNTHÈSE D'ARN

Les tests d'activité de synthèse d'ARN sont effectués à 37°C dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 200 nM d'ARN-polymérase, 500 nM d'ARN (Panhandle ; 80 nt), 0,5 mM ApG, 0,5 mM GTP, 0,5 mM CTP, 1 mM ATP, 0,05 mM UTP, 125 µCi d'UTP [α -³²P]-3000Ci/mmol-10mCi/ml-500 µCi dans un tampon de la composition suivante : 50 mM Tris pH 8,5, 25 mM KCl, 2,5 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM MnCl₂, 1 mM DTT. Les réactions sont stoppées par addition de 20 mM d'EGTA et chargées sur gel de polyacrylamide / 8M urée. Le gel est exposé contre un écran radiosensible (BAS Storage Phosphor Screen, GE Healthcare). L'écran est révélé après une nuit d'exposition grâce à un scanner spécifique (Typhoon Trio Phosphorimager, Amersham Biosciences).

2.13 MESURES DES AFFINITÉS ARN-POLYMERASE:ARN

2.13.1 ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

Le principe de l'anisotropie de fluorescence est décrit dans le 5.3.2.A, p 120. Les ARN utilisés pour les tests d'anisotropie de fluorescence sont marqués soit à leur extrémité 3' soit à leur extrémité 5' par la 6-fluorescéine amidite (6-FAM) (Eurofins Genomics). Les séquences ARN utilisées sont identiques à celles

utilisées pour les tests de FBA et les mesures sont réalisées dans 600 µL dans le même tampon 50 mM HEPES pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM β- mercaptoéthanol ; 2 mM MgCl₂. L'ARN marqué, à une concentration constante (8 nM < K_d), est titré avec des concentrations croissantes d'ARN-polymérase et la fixation est suivie grâce au changement du signal d'anisotropie lors de la formation des complexes ARN-polymérase:ARN. Le signal d'anisotropie de fluorescence est mesuré grâce à un fluorimètre (PTI) à température ambiante. Une mesure de base est réalisée sans ajouter d'ARN-polymérase puis 2 µL d'ARN-polymérase sont ajoutés avant chaque mesure. Après chaque addition, l'échantillon est laissé pendant 2 min dans le compartiment de mesure du fluorimètre pour permettre d'arriver à l'équilibre avant la mesure d'anisotropie. 12 mesures sont réalisées. Les volumes d'ARN-polymérase ajoutés par rapport au volume total réactionnel permettent de limiter le facteur de dilution (< 5 %).

Le signal d'anisotropie de base est soustrait à chaque valeur mesurée pour obtenir le signal spécifique de la formation des complexes ARN-polymérase:ARN. Les données sont analysées selon une régression non linéaire sans facteur de pente imposé avec le logiciel GraphPad Prism selon l'équation :

$$y = \frac{B_{max} \times x^h}{K_d^h + x^h}$$

Avec x la concentration de protéine, y la fraction d'ARN liée spécifique, B_{max} le maximum de fixation (égal à 1) dans la même unité que y , K_d la constante de dissociation dans la même unité que x , h le facteur de pente (« hill slope ») non imposé dans le calcul effectué. L'équation suit la loi d'action de masse à l'équilibre avec une très faible fraction de ligand fixé, la concentration de ligand (protéine) libre étant très proche de celle ajoutée avant fixation.

2.13.2 FILTER BINDING ASSAY (MESURE DES AFFINITÉS SUR FILTRE)

L'affinité de l'ARN-polymérase pour les ARNv est mesurée par la méthode de « Filter Binding Assay (FBA) » à double filtre (Wong and Lohman, 1993) en présence d'ARN marqué en 5' par un phosphate radioactif (P³²).

Préparation de l'ARN pour le Filter Binding Assay

L'ARN produit par transcription *in vitro* (cf. § 2.5, p 46) est déphosphorylé durant 2h à 37 °C dans un volume réactionnel de 50 µL contenant 50 µM ARN ; 10 U de phosphatase alcaline de crevette (Shrimp Alkaline Phosphatase, rSAP ; New England BioLabs) ; tampon rSAP 1X. La rSAP est inactivée par chauffage à 65 °C pendant 5 min et l'ARN est purifié par deux extractions au phénol / chloroforme. Le marquage radioactif par le P³² est réalisé par une réaction phosphorylation de 50 µL durant 2h à 37 °C contenant le tampon T4 PNK 1X ; 0,3 - 1 µM ARN ; 1,5 µL ATP (γ P³²), 6000 Ci/mmol, 150 Ci/mL ; 20 U T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK ; New England BioLabs). La T4 PNK est inactivée par chauffage à 65 °C pendant 20 min. L'ARN est enfin purifié par deux extractions phénol / chloroforme. Le résultat du marquage est visualisé sur gel polyacrylamide 8 M urée (Figure 79, p 123).

Filter Binding Assay

Dans un volume de 200 μL , l'ARN marqué à une concentration constante ($< 0,1 \text{ nM}$) est incubé avec des concentrations croissantes d'ARN-polymérase dans le tampon 50 mM HEPES pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 5 mM β - mercaptoéthanol ; 2 mM MgCl_2 durant 15 min à température ambiante. 180 μL des volumes réactionnels sont déposés dans les puits du système de filtration 96 puits (Whatman Minifold I 96 well dot-blot) qui contient 2 membranes :

- une membrane de rétention des protéines (Protran BA 85, Whatman)
- suivie d'une membrane de rétention des acides nucléiques en nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences) chargée positivement.

Les membranes sont équilibrées avec le tampon de la réaction durant une heure avant utilisation. Avant et après l'application des volumes réactionnels, les membranes sont lavées avec 180 μL de tampon de lavage pendant que l'aspiration est appliquée au système via une pompe à vide. Les membranes sont séchées à l'air libre durant 15 min et placées dans une cassette d'exposition contre un écran radiosensible (BAS Storage Phosphor Screen, GE Healthcare). L'écran est révélé après une nuit d'exposition grâce à un scanner spécifique (Typhoon Trio Phosphorimager, Amersham Biosciences). L'intensité des points est lue grâce au logiciel ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) et les données sont analysées selon une régression non linéaire sans facteur de pente imposé avec le logiciel GraphPad Prism selon l'équation :

$$y = \frac{B_{\max} \times x^h}{K_d^h + x^h}$$

Avec x la concentration de protéine, y la fraction d'ARN liée spécifique, $B_{\max}$ le maximum de fixation (égal à 1) dans la même unité que y , K_d la constante de dissociation dans la même unité que x , h le facteur de pente (« hill slope ») non imposé dans le calcul effectué. L'équation suit la loi d'action de masse à l'équilibre avec une très faible fraction de ligand fixé, la concentration de ligand (protéine) libre étant très proche de celle ajoutée avant fixation.

Seule la fixation spécifique (y) est analysée. Les interactions non spécifiques sont soustraites en calculant le ratio :

$$y = \frac{\text{Protéine} - \text{ARN}^*}{\text{Protéine} - \text{ARN}^* + \text{ARN}^*}$$

Avec $\text{Protéine} - \text{ARN}^*$ le signal de l'ARN marqué en complexe avec la protéine, ARN^* le signal de l'ARN marqué libre.

2.14 MICROSCOPIE RAYONS-X

2.14.1 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE RAYONS-X

Des cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549) sont cultivées sur des supports spécifiques pour la microscopie rayons-X en nitrure de silicium (Si_3N_4) répondant aux caractéristiques suivantes : taille de membrane : 1,5 mm x 1,5 mm ; épaisseur de membrane : 500 nm ; taille du cadre : 5,0 mm x 5,0 mm ; épaisseur du cadre : 200 μm ; non traitées à l'acide chlorhydrique (HCl). Les cellules, stockées en azote liquide, sont décongelées et cultivées en présence ou non de 10 μM d'acétate de manganèse tétrahydraté ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) pendant un mois. Les cellules sontensemencées la veille de l'infection à $1,5 \cdot 10^5$ cellules/puits en boîtes de culture 12 puits avec le support placé au fond du puits. Après 24h, les cellules sont lavées deux fois en milieu DMEM froid et sont infectées avec le virus influenza A/WSN/33 à une MOI de 10 pfu/cellule. Après une adsorption virale de 2h à 4°C et deux lavages avec du milieu DMEM

préchauffé, 1 ml de DMEM 2% sérum de veau fœtal (SVF) complémenté ou non avec 10 μ M d'acétate de manganèse tétrahydraté ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) sont ajoutés et les cellules sont incubées à différents temps après infection (30 min, 1h, 2h, 4h, 6h) à 37°C. Des cellules non-infectées sont utilisées comme contrôle aux temps $t=0$, $t=30$ min et $t=6$ h et sont traitées de la même manière que les cellules infectées. A chaque temps correspondant, les supports sont lavés deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS) et les échantillons sont fixés au paraformaldéhyde (PFA) 4%. Ils sont à nouveau lavés deux fois dans du PBS puis déshydratés progressivement par des bains successifs de 5 min d'acétone de concentration croissante (10 % - 25 % - 50 % - 75 % - 100 %). Les supports sont ensuite soumis au procédé de dessiccation par la méthode du point critique. Ils sont introduits avec le milieu de déshydratation (acétone 100 %) dans l'enceinte du dessiccateur (Balzers, CDP 030). Le milieu (acétone) est échangé contre le fluide de substitution (CO_2) et la phase de séchage est amorcée par une montée en température de l'enceinte jusqu'à obtention du point critique du CO_2 (31 °C et 73,8 bar). Les supports sont enfin retirés de l'enceinte et placés dans un tube 0,5 ml en polypropylène pour leur conservation à température ambiante.

2.14.2 EXPERIENCE DE MICROSCOPIE RAYONS-X

Les expériences de microscopie rayons-X ont été menées sur la ligne ID21 de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble. Les mesures ont été effectuées à une énergie de 7,2 keV et une taille de faisceau de 400 x 900 nm. L'analyse bi-dimensionnelle de la distribution de chaque élément a été réalisée sur des aires de 100 x 100 μm et cartographiées par pas de 500 nm. Les photons de fluorescence sont collectés par le détecteur (Silicon Drift Diode, SDD, XFLASH 5100, Bruker, Germany) et la totalité du spectre de fluorescence est enregistrée pour chaque pixel de la cartographie obtenue.

Une photodiode située en amont de l'échantillon enregistre le signal de fluorescence de base proportionnel au rayonnement-X incident I_0 avant chaque mesure. Cet enregistrement appelé « iodet » est utilisé pour normaliser les cartes de chaque élément après déconvolution grâce au logiciel PyMca (Solé et al., 2007). La quantification des éléments est réalisée par comparaison avec la cartographie d'un standard d'extrait de foie de bœuf précisément calibré en différents éléments (National Institute of Standards and Technology, bovine liver, référence 1577c).

EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE DU VIRUS DE LA GRIPPE

3.1	SYSTEME D'EXPRESSION EN CELLULES D'INSECTE.....	58
3.2	BILAN DES CONSTRUCTIONS REALISEES	60
3.3	FRACTIONNEMENT NUCLEAIRE / CYTOPLASMIQUE	62
3.4	PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE	63
3.4.1	EXPRESSION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE	63
3.4.2	PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE.....	63
3.4.3	CARACTERISATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE.....	65
3.4.3.A	EXPERIENCE DE DIFFUSION DE LUMIERE LASER A ANGLES MULTIPLES ET REFRACTOMETRIE	65
3.4.3.B	EFFET DE L'ARN SUR L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE	67
3.4.4	PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE EN PRESENCE D'ARN	68
3.5	PURIFICATION DE PACTER-PB1ΔCTER	70
3.5.1	EXPRESSION DE PACTER-PB1 Δ CTER.....	70
3.5.2	PURIFICATION DE PACTER-PB1 Δ CTER	70
3.5.3	CARACTERISATION DE PACTER-PB1 Δ CTER PAR SEC-MALLS-RI.....	71
3.6	DISCUSSION ET CONCLUSION	73

Pour progresser dans la compréhension du fonctionnement de l'ARN-polymérase, le grand défi à relever était de parvenir à exprimer et à purifier le complexe hétérotrimérique de l'ARN-polymérase sous forme soluble et en grande quantité. Les études sur le transport vers le noyau des sous-unités néosynthétisées de l'ARN-polymérase ne décrivent jamais la sous-unité PB1 seule (Fodor and Smith, 2004; Huet et al., 2010; Hutchinson et al., 2011). Le modèle de référence veut qu'elle soit transportée en formant un dimère avec PA. Ces résultats suggèrent qu'une expression conjointe de PB1 et de PA serait nécessaire pour leurs stabilisations. A la lumière de ces observations, une nouvelle stratégie a été mise au point pour obtenir le complexe. Cette stratégie utilise le système d'expression en cellules d'insecte infectées par le baculovirus (EEF platform, Imre Berger, EMBL Grenoble). Elle consiste à exprimer les trois sous-unités du complexe sous la forme d'une unique protéine de fusion qui va être maturée en cours de traduction.

3.1 SYSTEME D'EXPRESSION EN CELLULES D'INSECTE

Beaucoup de complexes protéiques ne peuvent pas être produits en bactéries. Ceci est dû en particulier à des besoins spécifiques en protéines chaperones (repliements particuliers) ou en modifications post-traductionnelles qui n'existent pas chez la bactérie. L'expression de tels complexes nécessite donc un système d'expression eucaryote. Le système d'expression en cellules d'insecte, a récemment progressé de manière significative pour l'expression des complexes protéiques (Trowitzsch et al., 2010). Les méthodes et les vecteurs pour la génération de baculovirus recombinants pour infecter des cultures de cellules d'insecte ont émergé en 1983 (Smith et al., 1983). Ces virus permettent d'introduire le gène codant pour la protéine / complexe à produire dans des cultures de cellules d'insecte. De nombreux essais ont été réalisés en cellules d'insecte mais aussi en cellules de mammifère pour produire le complexe en grande quantité dans sa totalité mais ils ont tous fourni un faible rendement pour l'hétérotrimère (Martín-Benito et al., 2001; Mena et al., 1994; St Angelo et al., 1987; Zhang et al., 2010).

Le gène codant pour la protéine de fusion PA-PB1-PB2 est cloné dans une cassette de clonage entre le gène codant pour la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) et celui codant pour une protéine fluorescente (Cyan Fluorescent Protein, CFP) (Figure 28). L'ensemble de cette cassette d'expression (TEV-PA-PB1-PB2-CFP) est à son tour clonée dans un plasmide spécifique pBac (Imre Berger, EMBL Grenoble). Les vecteurs pBac recombinants obtenus sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes EMBAcY (Trowitzsch et al., 2010) qui contiennent le matériel génétique du baculovirus ou bacmide. Dans les bactéries qui ont été transformées, le plasmide pBac contenant le gène de fusion est intégré au bacmide par transposition. Le bacmide recombinant est purifié et utilisé pour transfecter des cellules d'insecte pour générer un baculovirus (le protocole d'obtention des baculovirus est détaillé dans le paragraphe 2.1, p 42 du CHAPITRE 2 Matériel et méthodes). Ce baculovirus contient le gène de fusion codant pour l'ARN-polymérase en plus de son propre matériel génétique et sera utilisé pour infecter des cellules d'insecte qui exprimeront alors la protéine de fusion.

La stratégie d'expression présente une dernière subtilité qui permet de séparer les sous-unités qui sont liées les unes aux autres à travers la protéine de fusion. Entre chaque sous-unité se trouve la séquence codant pour un site de clivage à la protéase TEV (Figure 28). Durant la traduction, la TEV exprimée clive la protéine de fusion entre chaque sous-unité au niveau de ces sites spécifiques. Ainsi, chaque sous-unité est séparée de la précédente après le clivage. Cette stratégie permet d'exprimer des quantités stœchiométriques de chacune des sous-unités et d'éviter l'accumulation de l'une d'entre elles qui pourrait être préjudiciable à l'obtention des autres. Dans la construction, au moins une étiquette poly-histidine est placée sur une des sous-unités pour permettre la première étape de purification par chromatographie d'affinité sur résine nickel.

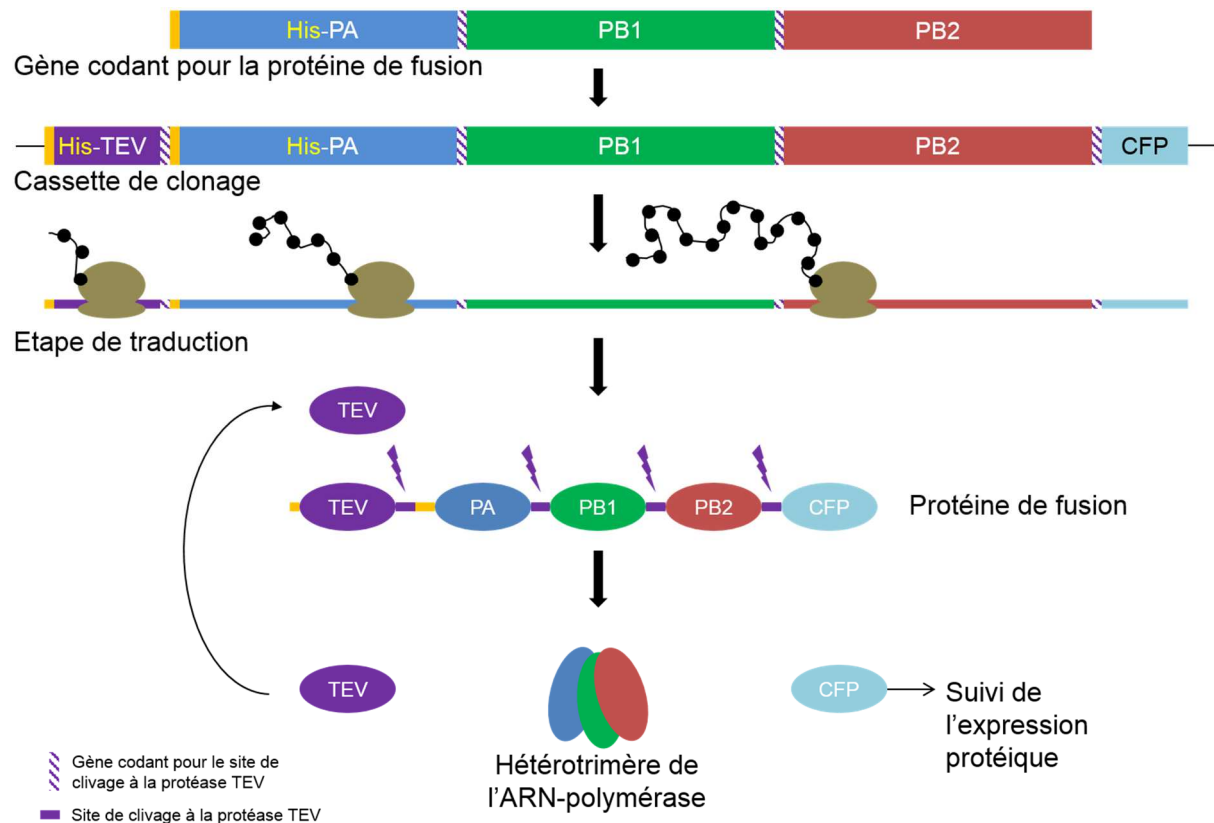


Figure 28 : Stratégie d'expression de l'ARN-polymérase hétérotrimérique du virus influenza. Le système permet de produire chaque sous-unité en quantités stœchiométriques.

Dans ce système, deux protéines rapportrices fluorescentes permettent d'évaluer respectivement l'expression globale de la protéine et la prolifération du baculovirus. La protéine fluorescente CFP située à l'extrémité C-terminale de la protéine de fusion (Figure 28) rapporte l'expression globale de la protéine de fusion. Le génome du baculovirus présente quant à lui le gène codant pour la protéine fluorescente YFP (Yellow Fluorescent Protein). Cette dernière est le témoin de la prolifération du baculovirus.

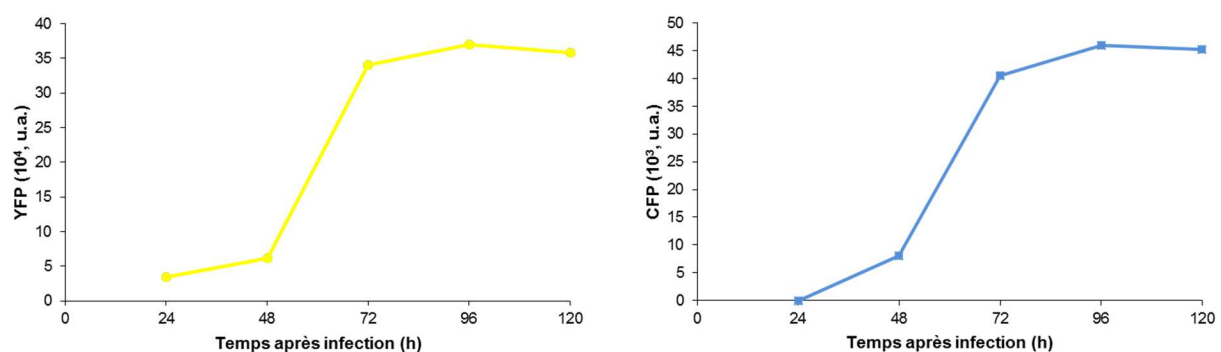


Figure 29 : Exemple de suivi de la production des gènes rapporteurs YFP et CFP au cours de l'infection par le baculovirus. Les valeurs de YFP (courbe jaune) et de CFP (courbe bleue) sont respectivement les témoins de la prolifération virale et de l'expression de la protéine de fusion. L'obtention d'un plateau pour ces deux valeurs correspond au moment où l'expression est arrivée à son terme.

Le suivi des valeurs de YFP et de CFP au fluorimètre est journalier et permet de déterminer le moment idéal pour l'arrêt des cultures au moment de l'obtention d'un plateau de fluorescence (Figure 29). Le rapport des mesures de YFP et de CFP permet de rationaliser l'expression de la protéine de fusion et de comparer différentes cultures.

3.2 BILAN DES CONSTRUCTIONS REALISEES

Remarque préliminaire : plusieurs constructions visées ci-après sont en cours de dépôt de brevet, c'est pourquoi, conformément aux dispositions légales relatives à la protection des brevets, les bornes des constructions ne sont pas détaillées.

Dans un premier temps, la construction de la protéine de fusion a été réalisée avec les gènes complets des trois sous-unités (PA-PB1-PB2 ; Figure 30.B). Cette construction ne s'exprimait pas correctement. Le rendement d'expression était très faible, seules les sous-unités PA et PB1 étaient produites et PB2 n'était pas détectée. L'expression des sous-unités PA et PB1 semblait indiquer que les difficultés d'expression de l'hétérotrimère provenaient de la sous-unité PB2. Les données concernant l'expression des domaines isolés avaient montré que la sous-unité PB2 était exprimée en cellules d'insecte mais restait insoluble (PB2 ; Figure 30.A). L'ensemble de ces résultats suggéraient donc que PB2 pouvait être à l'origine des problèmes d'expression rencontrés. Différentes stratégies ont été envisagées pour essayer d'inclure des parties de la sous-unité PB2 à défaut de pouvoir l'inclure totalement dans la construction.

Par le passé, la structure du domaine de reconnaissance de la coiffe (CBD, pour Cap Binding Domain) porté par PB2 a été résolue (Guilligay et al., 2008). Pour cela, ce domaine a été produit seul, en bactérie, sous forme soluble. L'expression du CBD de façon isolée a suggéré qu'il n'était pas à l'origine des problèmes d'expression rencontrés pour l'hétérotrimère complet. Il fut donc envisagé de concevoir une construction incluant la partie N-terminale de PB2 jusqu'à la fin du domaine de reconnaissance de la coiffe (Figure 30.F). L'objectif de cette construction était double : le premier était de vérifier si la partie C-terminale de PB2 était à l'origine des problèmes d'expression. Le second objectif était de générer un hétérotrimère minimal possédant les trois activités spécifiques au mécanisme de vol de coiffe : les activités endonucléase (PA), de synthèse d'ARN (PB1) et de reconnaissance de coiffe (PB2). En parallèle, la même construction a été réalisée avec la partie N-terminale de PB2 jusqu'au résidu 322 correspondant au premier résidu du CBD (Figure 30.E). Cette construction visait à étudier l'effet de cette partie de PB2 sur l'expression et la stabilité de l'hétérotrimère. Comme pour l'hétérotrimère complet, seules les sous-unités PA et PB1 étaient produites et ce, pour les deux constructions réalisées. Aucune détection de PB2 n'a été observée et le rendement d'expression restait faible. L'allongement de PB2 jusqu'à la fin du domaine de reconnaissance de la coiffe n'améliore en aucun point l'expression de l'hétérotrimère recombinant. Les résultats obtenus suggéreraient donc que l'inter-domaine entre la région N-terminale d'interaction avec PB1 et le domaine de reconnaissance de la coiffe était responsable des problèmes d'expression observés.

Une nouvelle construction a alors été conçue pour observer l'effet de l'ajout du CBD sur l'expression en absence de l'inter-domaine (Figure 30.G). Elle se compose des sous-unités PA et PB1 et d'une courte partie N-terminale de PB2, excluant l'inter-domaine, reliée par une courte séquence peptidique de 8 acides aminés au CBD. Le choix de conserver la séquence polypeptidique N-terminale de PB2 dans la construction s'est fondé sur des résultats positifs d'expression et de solubilité de cette région (An et al., 2011). Il convient de noter que cette construction ne reflète aucune réalité biologique et n'a été réalisée qu'à titre de test d'expression. Cette construction s'exprime correctement et est soluble indiquant que le CBD n'était pas impliqué dans les problèmes d'expression. La même construction a été réalisée en parallèle incluant la fin de la sous-unité PB2 à la suite du CBD (Figure 30.H). Cette construction s'est aussi exprimée correctement confirmant que la partie C-terminale n'était pas à l'origine des problèmes d'expression. L'ensemble des résultats obtenus lors des essais de constructions convergent pour indiquer que l'interdomaine en amont du CBD sur PB2 semble être à l'origine des problèmes d'expression

rencontrés. Des travaux pour identifier plus précisément la raison de ces problèmes sont actuellement réalisés au laboratoire (travaux de Christopher Swale, UVHCI Grenoble).

L'intégration de PB2 se révélant donc impossible, ces résultats ont conduit à la production d'un hétérotrimère minimal : PA-PB1-PB2Nter (Figure 30.c) composé des sous-unités PA et PB1 entières et d'une courte partie N-terminale de PB2. La sous-unité PB2 est tronquée à 70 % mais l'objectif principal était d'obtenir une stabilisation maximale de PB1 qui est la seule sous-unité à être inconnue structuralement. L'expression et la purification de cette construction a été mise en place avec succès permettant ainsi pour la première fois d'obtenir un complexe recombinant de l'ARN-polymérase en quantité suffisante pour mener des études structurales et fonctionnelles à grande échelle. Une étiquette poly-histidine est placée à l'extrémité N-terminale de PA. La protéine de fusion finale est donc la suivante : His-PA-PB1-PB2Nter et sera nommée ARN-polymérase tronquée dans le reste du manuscrit pour simplifier la lecture. Cette construction présente l'activité endonucléase sur PA et l'activité de synthèse d'ARN sur PB1. La même construction (Figure 30.d) présentant la mutation E80A au niveau du domaine endonucléase a été réalisée en parallèle. Cette mutation rend le domaine endonucléase inactif. L'activité endonucléase est abordée dans le paragraphe 5.1, p 102.



Figure 30 : Représentation schématique des constructions de l'ARN-polymérase du virus influenza A qui ont été testées. Les données concernant leur expression et leur solubilité sont indiquées à droite. Les activités présentes sur chaque construction sont indiquées par des cercles de couleur claire. Etant soumis à brevet, le détail des constructions n'est pas indiqué.

Plusieurs essais de cristallogénèse ont été menés sur l'ARN-polymérase tronquée. Malgré plus de 11000 conditions testées grâce à la plateforme de cristallisation haut-débit (HTX, EMBL, Grenoble) disponible au sein du PSB (Partnership for Structural Biology) de Grenoble, les essais sont restés infructueux.

Un des objectifs principaux reste de cristalliser la sous-unité PB1 qui demeure structuralement inconnue. Dans cette optique, une construction dédiée à l'étude cristallographique a été conçue : PACter-PB1 Δ Cter (Figure 30.I). PB1 n'étant pas soluble seule, cette construction représente la construction minimale pour permettre la stabilisation de la sous-unité PB1. Elle se compose de la partie C-terminale de PA et de la sous-unité PB1 tronquée de la région correspondant au domaine d'interaction avec PB2. La séquence de PA permettant la stabilisation de PB1 a été déterminée de manière empirique en tronquant la sous-unité PA jusqu'à obtenir la taille minimale permettant de maintenir la stabilité de PB1. Des cristaux de cette construction ont été obtenus et leur étude est présentée dans le CHAPITRE 4 (cf. § 4.2.2, p 89). Pour faciliter la lecture, cette construction sera nommée PACter-PB1 Δ Cter dans le reste du manuscrit.

L'ensemble des constructions réalisées a fait l'objet d'un dépôt de brevet.

3.3 FRACTIONNEMENT NUCLEAIRE / CYTOPLASMIQUE

Dans la cellule hôte, les sous-unités néosynthétisées de l'ARN-polymérase sont importées dans le noyau (Fodor and Smith, 2004; Huet et al., 2010; Hutchinson et al., 2011). Pour déterminer dans quel compartiment est stockée l'ARN-polymérase lors de l'expression en cellules d'insecte, un fractionnement nucléaire / cytoplasmique a été réalisé. Cette technique permet d'isoler successivement la fraction cytoplasmique et la fraction nucléaire et d'extraire les protéines contenues dans chacune des fractions séparément. Deux tampons différents sont utilisés pour la lyse spécifique des membranes cytoplasmiques et des membranes nucléaires.

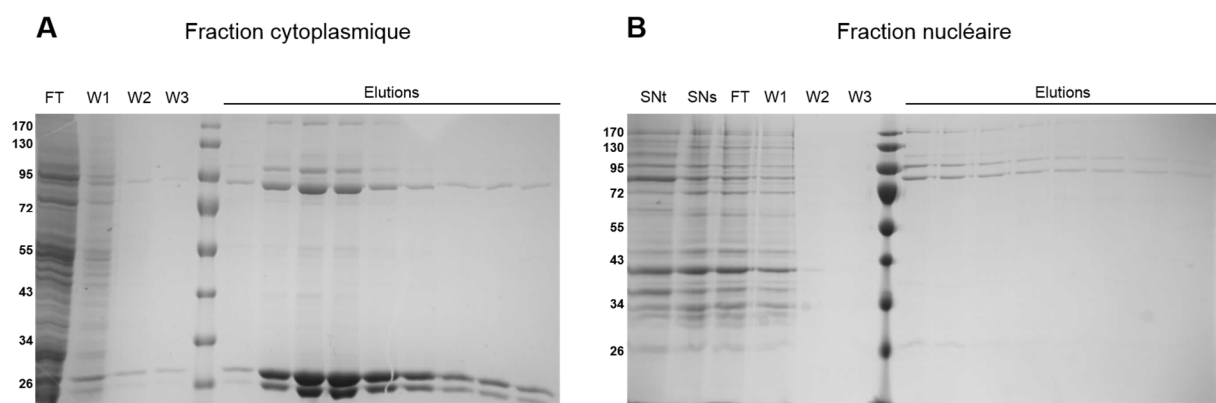


Figure 31 : Résultat du fractionnement nucléaire / cytoplasmique. A/ Isolement de l'ARN-polymérase tronquée issue du cytoplasme. B/ Isolement de l'ARN-polymérase tronquée issue du noyau. Avec SNt, surnageant total ; SNs, surnageant soluble ; FT, fraction non retenue ; W 1 à 3, lavages 1 à 3.

Il apparaît que l'ARN-polymérase tronquée est largement cytoplasmique (Figure 31.A). De légères traces des sous-unités PA et PB1 (la sous-unité PB2 tronquée n'est pas visible) sont visibles dans la fraction nucléaire (Figure 31.B). Le protocole de purification ne nécessite pas de modifications spécifiques pour la lyse nucléaire puisque le complexe est presque exclusivement cytoplasmique.

3.4 PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE

3.4.1 EXPRESSION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE

L'ARN-polymérase tronquée est exprimée à partir de 250 mL de culture de cellules d'insecte infectées avec 0,2 % de baculovirus. L'expression protéique et la prolifération du baculovirus sont suivies respectivement par mesure des valeurs de la CFP et de la YFP au fluorimètre (Figure 32.A).

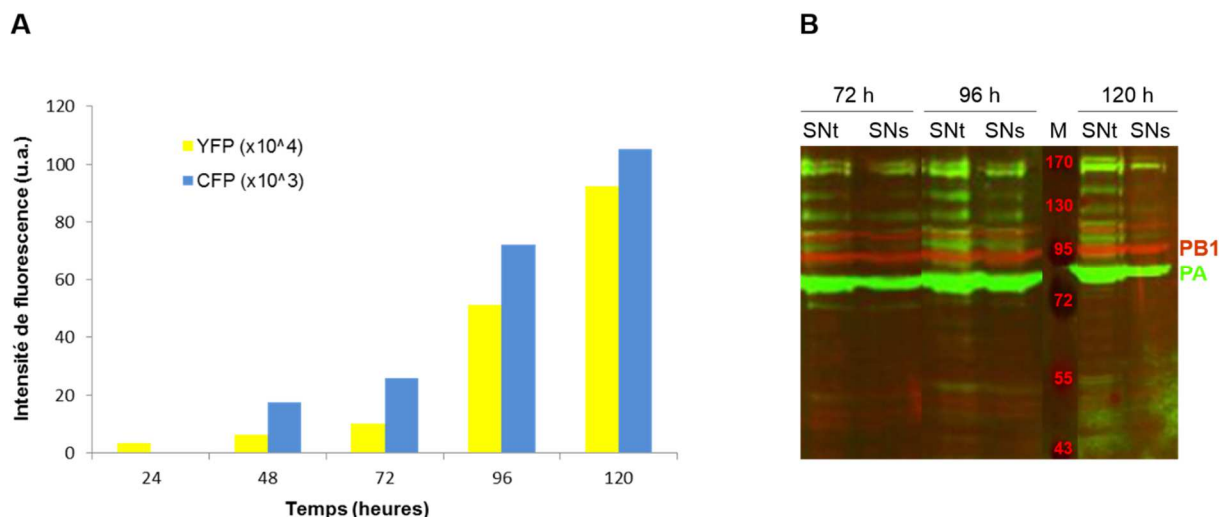


Figure 32 : Suivi de l'expression en cellules d'insecte de l'ARN-polyérase tronquée. **A/** Les valeurs de YFP et de CFP sont suivies chaque jour à partir de l'infection jusqu'à obtention d'un plateau de fluorescence. **B/** Les fractions totales (Snt) et solubles (Sns) sont déposées sur gel SDS-polyacrylamide 12% et révélées par Western Blot avec des anticorps spécifiques de PB1 (rouge) et de PA (vert).

L'expression de l'ARN-polymérase durant la culture a été vérifiée par Western Blot avec des anticorps spécifiques de PB1 et de PA après sonication des cellules (Figure 32.B). Les bandes correspondant à la sous-unité PB1 (rouge) et PA (vert) sont retrouvées aux poids moléculaires attendus (~88 kDa pour PB1 et ~86 kDa pour His-PA). Compte-tenu de son poids moléculaire (~15 kDa), la sous-unité PB2 n'est pas visible sur ce gel 12 % polyacrylamide. Les bandes de plus haut poids moléculaire qui apparaissent marquées correspondraient à des formes non clivées ou mal clivées de la protéine de fusion.

3.4.2 PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE

Les cellules provenant de quatre culots ont été lysées. Une première étape de purification par chromatographie d'affinité sur résine nickel a été réalisée et les fractions déposées sur gel 12 % polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS) (Figure 33.A). Les bandes correspondant aux deux sous-unités PB1 (~88 KDa) et PA (~86 KDa) sont clairement identifiables. La protéase TEV qui, comme PA, possède une étiquette poly-histidine est également retrouvée au niveau du marqueur de poids de 25 KDa sous forme d'une double bande. La bande inférieure correspond à une forme tronquée de la protéase TEV consécutive à une autoprolyse de sa partie C-terminale (Kapust et al., 2001; Parks et al., 1995). La sous-unité PB1 est retrouvée dans les fractions d'élution or seule la sous-unité PA possède une étiquette poly-histidine. C'est donc bien le complexe de l'ARN-polymérase qui est purifié : PB1 est éluée avec PA parce qu'elle forme un complexe avec elle. Une fois déposées sur gel en conditions dénaturantes, les sous-unités apparaissent séparément. Sur ce gel 12 % polyacrylamide (Figure 33.A), la sous-unité PB2 n'est pas visible.

La stabilité du complexe exige qu'il soit élué dans du tampon contenant du glycérol (Figure 33.A). Un criblage préliminaire de 48 conditions de solubilisation a en effet montré que le complexe était stable dans

15 % glycérol en sortie de chromatographie d'affinité alors que la présence de glycérol en début de purification était délétère pour le complexe. Par la suite, une concentration constante de 10 % glycérol doit être maintenue lors de la seconde étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique.

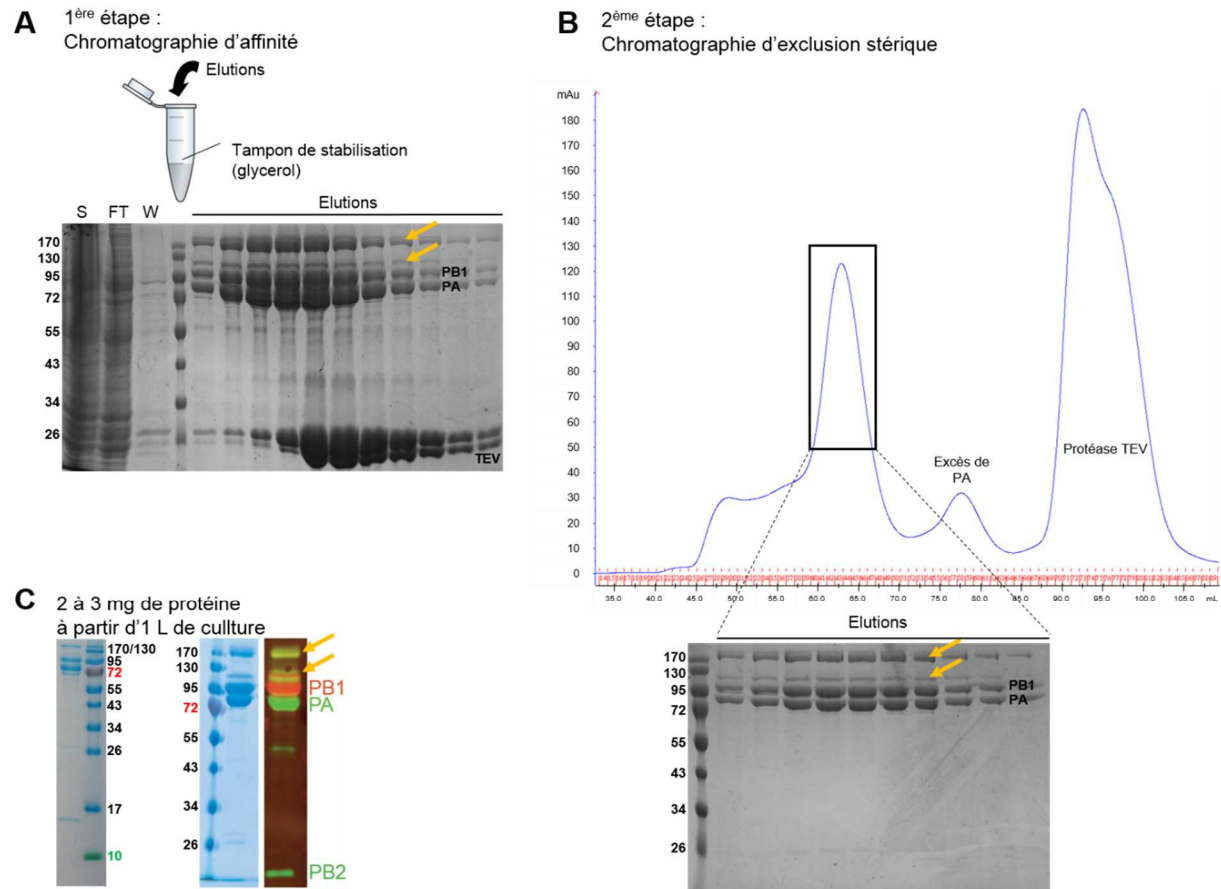


Figure 33 : Etapes de purification de l'ARN-polymérase tronquée du virus influenza. La première étape de purification par chromatographie d'affinité (A) est suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique (B). Les fractions d'élution correspondant à chaque étape de purification ont été déposées sur gel 12 % polyacrylamide SDS : échantillon injecté (L), fraction non retenue (FT), lavage (W), éluions. Le profil d'élution de la chromatographie d'exclusion stérique (B) présente trois pics : le premier pic correspond à l'ARN-polymérase tronquée, le deuxième pic correspond à la sous-unité PA produite en excès et le troisième pic correspond à la protéase TEV. La protéine purifiée est déposée sur gel 18 % polyacrylamide pour vérifier la présence de la partie N-terminale de PB2 (C, à gauche) et la présence des trois sous-unités est vérifiée par Western Blot avec des anticorps spécifiques dirigés contre chaque sous-unité (C, à droite) (les anticorps ont été fournis par Juan Ortin, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Espagne)

Les fractions d'élution contenant la protéine ont été rassemblées puis injectées sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Superdex 200, 125 mL, GE Healthcare). Un gel SDS-PAGE 12 % a été réalisé (Figure 33.B). Les bandes correspondant aux sous-unités PB1 et PA sont retrouvées aux poids moléculaires espérés et sont obtenues en quantités stœchiométriques. Là encore, il s'agit d'un gel 12 % et la sous-unité PB2 n'est pas visible. Sa présence a été vérifiée sur un gel 18 % polyacrylamide (Figure 33.c). Il convient de noter que la protéase TEV est totalement éliminée des fractions obtenues après chromatographie d'exclusion de taille. Le profil de chromatographie (Figure 33.B) présente un petit pic entre les pics correspondant respectivement au complexe et à la TEV. Ce pic correspond à un excès de la sous-unité PA explicable par le fait qu'elle porte l'étiquette poly-histidine. Deux bandes fléchées en orange (Figure 33.A et B) sont observables au niveau de poids moléculaire 170 kDa et juste au-dessus de la bande correspondant à PB1. Elles semblent correspondre à des formes non clivées ou mal clivées de la protéine de fusion. Les fractions d'élution contenant la protéine sont rassemblées. Un western blot, réalisé avec

des anticorps polyclonaux dirigés contre les différentes sous-unités, valide leur présence dans l'échantillon final.

L'échantillon d'ARN-polymérase tronquée présente donc une homogénéité dans sa composition. Une faible partie de la protéine de fusion reste néanmoins non clivée (flèches orange ; Figure 33.A et B). Après une période d'optimisation (pH, tampons, additifs), il est désormais possible de purifier de 2 à 3 mg du complexe tronqué à partir d'un litre de culture de cellules d'insecte. La stabilité du complexe impose une concentration de glycérol de 10 %. La présence d'une telle concentration de glycérol dans l'échantillon présente plusieurs désavantages qui seront abordés dans la suite du manuscrit en particulier pour l'étude structurale en cryo-microscopie électronique.

Différentes analyses biophysiques et biochimiques préliminaires ont été réalisées pour caractériser le complexe tronqué.

3.4.3 CARACTERISATION DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE

3.4.3.A EXPERIENCE DE DIFFUSION DE LUMIERE LASER A ANGLES MULTIPLES ET REFRACTOMETRIE

Le système de diffusion de lumière à angles multiples (SEC-MALLS-RI ; Size Exclusion Chromatography – Multi Angle Laser Light Scattering – Refractive Index) disponible au sein de la plateforme de Biophysique du PSB (UVHCI, Grenoble) a été utilisé pour vérifier la masse moléculaire du complexe hétérotrimérique ainsi que son état oligomérique.

Le MALLS est une technique conçue pour la détermination de la masse moléculaire absolue d'une molécule se basant sur la manière dont celle-ci diffracte la lumière. La mesure de MALLS se fait en calculant la quantité de lumière diffusée à chaque angle. Le système comprend une colonne de chromatographie d'exclusion de taille couplée à un détecteur de lumière à angles multiples et à un réfractomètre (Figure 34). Le détecteur permet de mesurer l'intensité de la lumière diffusée à différents angles. Quant au réfractomètre, il permet une mesure précise de la concentration en protéine, l'indice de réfraction de l'échantillon variant en fonction de la concentration en protéine.

En 1871, Rayleigh observa que lorsqu'une lumière polarisée traversait un solvant contenant des macromolécules, l'excès de lumière diffusée par la molécule à travers un angle par rapport à la lumière incidente était directement proportionnel à la masse de la molécule (Oliva et al., 2004; Wyatt, 1991, 1993). Le calcul de la masse moléculaire est basé sur l'intensité de lumière diffractée à chaque angle et sur la concentration de l'échantillon (Figure 35) (Wyatt, 1991, 1993).

L'expérience de SEC-MALLS-RI présente un pic unique à un volume d'élution d'environ 10 mL dont l'estimation de la masse moléculaire associée s'élève à 450 kDa (Figure 36, courbe bleue). Cette masse moléculaire estimée ne correspond pas à la masse molaire attendue (~200 kDa) et représente environ le double de celle-ci suggérant que l'ARN-polymérase tronquée purifiée se comporte comme un dimère d'hétérotrimère tronqué. L'association en dimères a été confirmée par microscopie électronique en coloration négative et une reconstruction 3D a été obtenue à une résolution de 25 Å (cf. § 4.1.1 ; Figure 42, p 78).

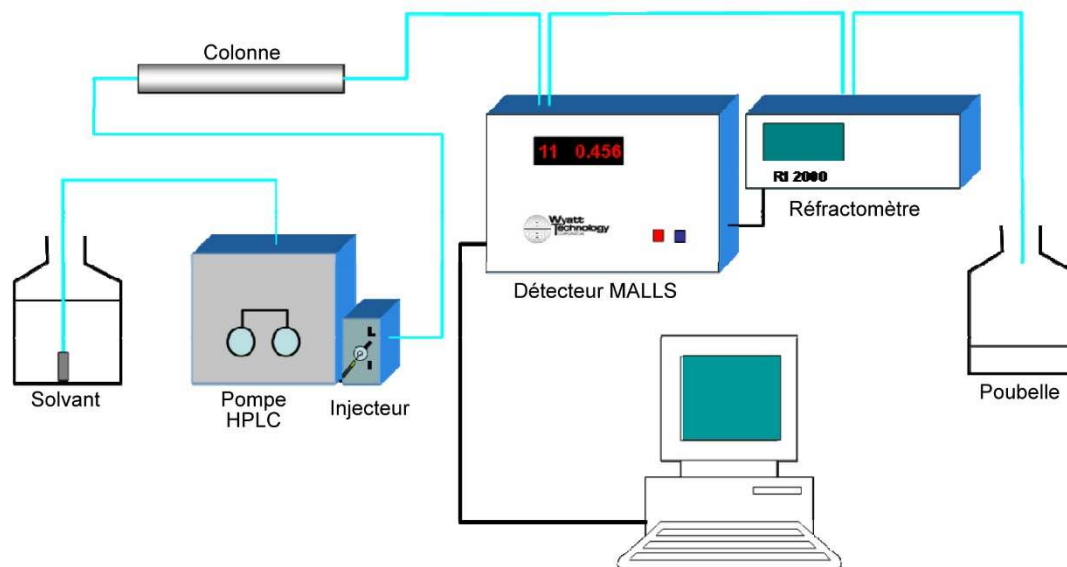


Figure 34 : Représentation schématique du dispositif de SEC-MALLS-RI. Le système de pompe ainsi que la colonne de chromatographie d'exclusion de taille sont équilibrés avec le tampon de la protéine durant une nuit. L'échantillon circule dans le détecteur de diffusion de lumière à angles multiples (MALLS) et dans le réfractomètre pour les mesures d'intensité de lumière diffusée et de concentration respectivement. L'ensemble des données est enfin compilé sur un ordinateur.

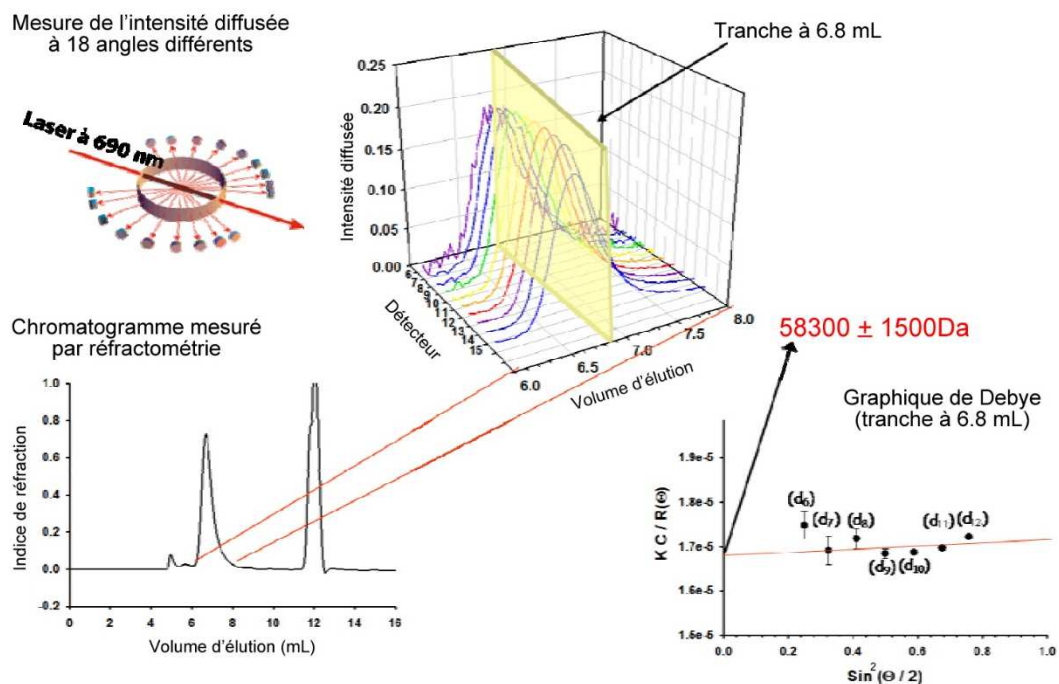


Figure 35 : Principe général des mesures de la masse moléculaire lors d'une expérience de SEC-MALLS-RI. Le schéma illustre schématiquement le passage de l'échantillon dans la cellule d'un détecteur de lumière diffusée à angles multiples. La lumière entrant dans la cellule est diffusée par l'échantillon dans différentes orientations et collectée par de multiples détecteurs placés à différents angles. L'intensité de diffusion est ainsi enregistrée. Le passage de l'échantillon dans le réfractomètre permet de calculer la concentration de l'échantillon en fonction de l'indice de réfraction mesuré. Les mesures d'intensité de la lumière diffusée à chaque angle et la concentration de l'échantillon mesurée au fur et à mesure de l'élution sont couplées pour déterminer la masse moléculaire qui est calculée en pratique à partir du graphique de Debye (ou Zimm) des paramètres de diffusion ($KC/R(\theta)$) en fonction de l'angle ($\sin^2(\theta/2)$).

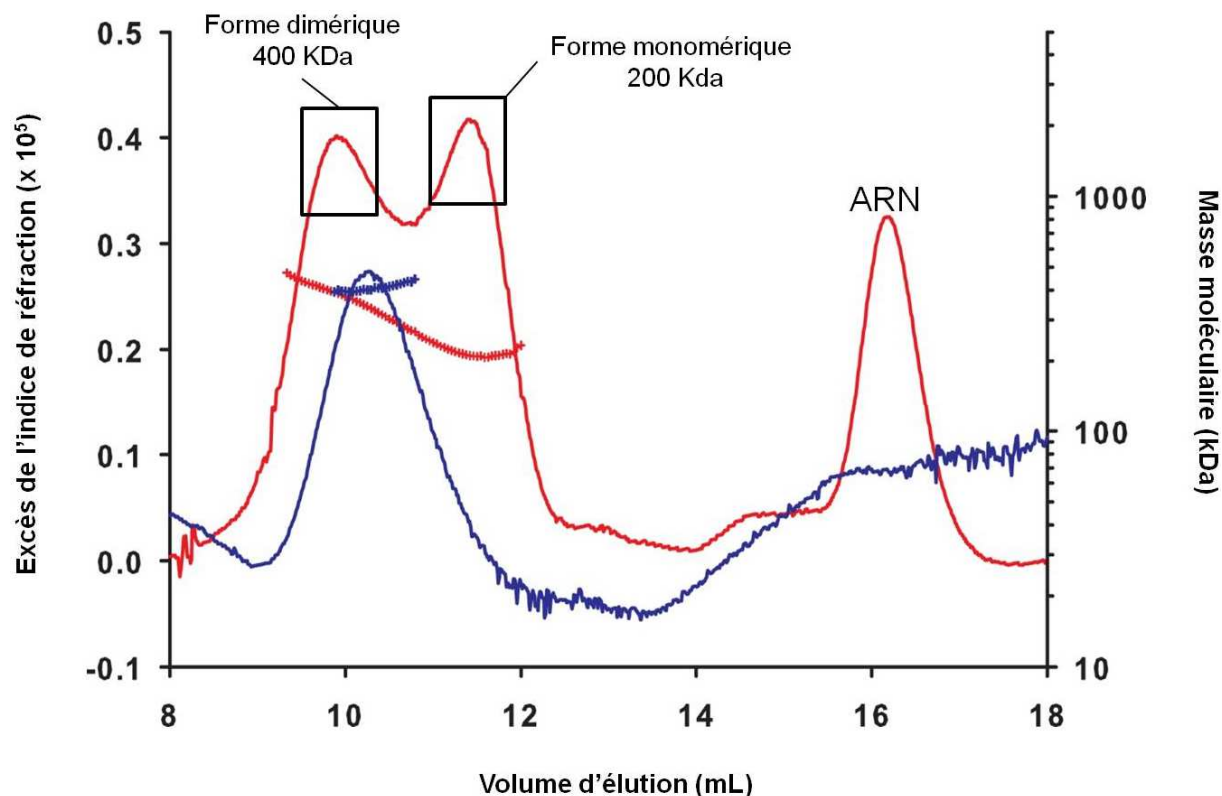


Figure 36 : Effet de l'ARN sur l'ARN-polymérase tronquée visualisé par une expérience de SEC-MALLS-RI. L'ARN-polymérase tronquée est injectée seule (courbe bleue) et en présence d'ARN (courbe rouge) dans un rapport molaire protéine:ARN 1:5. L'indice de réfraction est représenté par les courbes en traits fins et la masse moléculaire par les courbes en traits épais.

3.4.3.B EFFET DE L'ARN SUR L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE

Dans le cadre de la RNP, l'ARN-polymérase et l'ARNv ne font qu'un. Il était donc naturel qu'en tête des premières questions soulevées vienne celle de l'effet de l'ARN sur le complexe tronqué.

Pour étudier l'interaction entre l'ARN-polymérase et l'ARN, différents ARNs mimant les ARNv sont produits en routine par transcription *in vitro*. Le principe de production et de purification est décrit dans le CHAPITRE 2 Matériel et méthodes (cf. § 2.5, p 46) et a fait l'objet d'une publication (cf. partie Publications, p 183).

Pour tenter d'apporter une réponse à cette question, une première expérience de SEC-MALLS-RI (cf. principe dans le paragraphe 3.4.3.A ; p 65) a été conduite avec l'ARN-polymérase tronquée purifiée seule (Figure 36, courbe bleue). Le profil d'élution ne présente qu'un seul pic à un volume d'élution de 10 mL et une masse molaire associée estimée à 450 kDa qui correspond à la masse molaire espérée pour le dimère d'hétérotrimère tronqué (2 x 200 kDa). Une seconde expérience a été conduite avec le complexe tronqué pré-incubé avec de l'ARNv (Short Panhandle ; 36 nt) (Figure 36, courbe rouge). Le profil d'élution présente désormais trois pics. Le troisième pic correspond à l'ARN Short-Panhandle en excès. Le premier pic correspond au dimère d'hétérotrimère avec une masse molaire associée estimée à 400 kDa et le deuxième pic possède une masse molaire estimée deux fois plus petite : 200 kDa. Ceci suggère la présence d'hétérotrimères tronqués n'évoluant pas en dimères. Les clichés de microscopie électronique en coloration négative confirment la présence d'hétérotrimères non dimériques. L'ARN utilisé a donc pour effet de dissocier les dimères d'ARN-polymérase et permet d'obtenir l'hétérotrimère non dimérique. Un protocole de purification en présence d'ARN a donc été mis en place.

3.4.4 PURIFICATION DE L'ARN-POLYMERASE EN PRESENCE D'ARN

Pour purifier l'ARN-polymérase en présence d'ARN, le même protocole de purification est suivi. L'ARN est ajouté dans un ratio ARN-polymérase:ARN 1:5 dans chaque fraction d'élution lors de la chromatographie d'affinité sur résine nickel avant l'ajout du tampon de stabilisation. L'ordre de ces étapes est primordial pour l'obtention de l'ARN-polymérase sous sa forme non dimérique. Les purifications successives réalisées dans des conditions différentes ont en effet montré que le contact avec l'ARN devait se faire avant l'ajout du tampon de stabilisation contenant le glycérol. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées puis injectées sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique et déposées sur gel polyacrilamide 12 % (Figure 37.B).

Les deux sous-unités, PB1 et PA sont clairement identifiables. Le profil de chromatographie (Figure 37.A) obtenu présente deux pics et reproduit les résultats obtenus lors de l'expérience de SEC – MALLS – RI. Les fractions correspondant à chaque pic sont vérifiées par microscopie électronique en coloration négative. Les images obtenues (Figure 37.C) montrent pour le premier pic un échantillon hétérogène de dimères d'hétérotrimères et d'hétérotrimères avec une majorité de dimères. Sous cette forme, l'ARN-polymérase apparaît sous forme de petits bâtonnets allongés. Les images correspondant au second pic montrent un échantillon homogène composé d'hétérotrimères non dimériques se présentant sous la forme de particules sphériques. Les sous-unités PA et PB1 sont obtenues en quantités stœchiométriques. Les bandes contaminantes correspondant aux formes mal clivées de la protéine de fusion sont retrouvées. Cependant, les fractions du second pic correspondant à l'hétérotrimère non dimérique apparaissent moins contaminées. Le contaminant à 100-110 KDa semblerait être uniquement associé à la forme dimérique. Il est donc possible de purifier l'hétérotrimère sous une forme non dimérique en ajoutant de l'ARN lors de la purification. Cependant, d'après le profil d'élution et les fractions déposées sur gel, la quantité d'hétérotrimères non dimériques obtenue par rapport à celle de dimères n'est que de 50 %. La dissociation des dimères n'est donc pas totale même en condition saturante d'ARN.

Une forte interaction de l'ARN-polymérase avec l'ARN a depuis longtemps été montrée. La présence de l'ARN au sein du complexe de l'ARN-polymérase est vérifiée par une lecture de DO au spectrophotomètre à 260 nm. La valeur du ratio 260 / 280 mesurée sur l'ARN-polymérase purifiée en présence d'ARN après chromatographie d'exclusion stérique plaide pour une co-purification de l'hétérotrimère et de l'ARN. De plus, les tests d'affinités avec l'ARN décrits dans la partie 5.3 (p 118) ont montré une très haute affinité pour l'ARN. D'après tous ces éléments, il est raisonnable de penser que l'hétérotrimère non dimérique purifié en présence d'ARN est bien complexé avec l'ARN. Quant à la stabilité de cette forme non dimérique, l'ARN ajouté ne remplace malheureusement pas le glycérol qui reste essentiel à la même concentration (10 %).

Des essais de cristallisation ont été menés sur la forme monomérique en complexe avec l'ARN et sur la forme dimérique. Malgré plus de 11000 conditions de cristallogénèse testées au total entre les deux formes oligomérique grâce à la plateforme de cristallisation haut-débit disponible au sein du PSB de Grenoble (HTX, EMBL Grenoble), la cristallisation est restée sans succès. C'est pourquoi une construction spécifiquement dédiée à la cristallographie a été conçue : PACTer-PB1ΔCter. Sa purification est détaillée dans la partie qui suit.

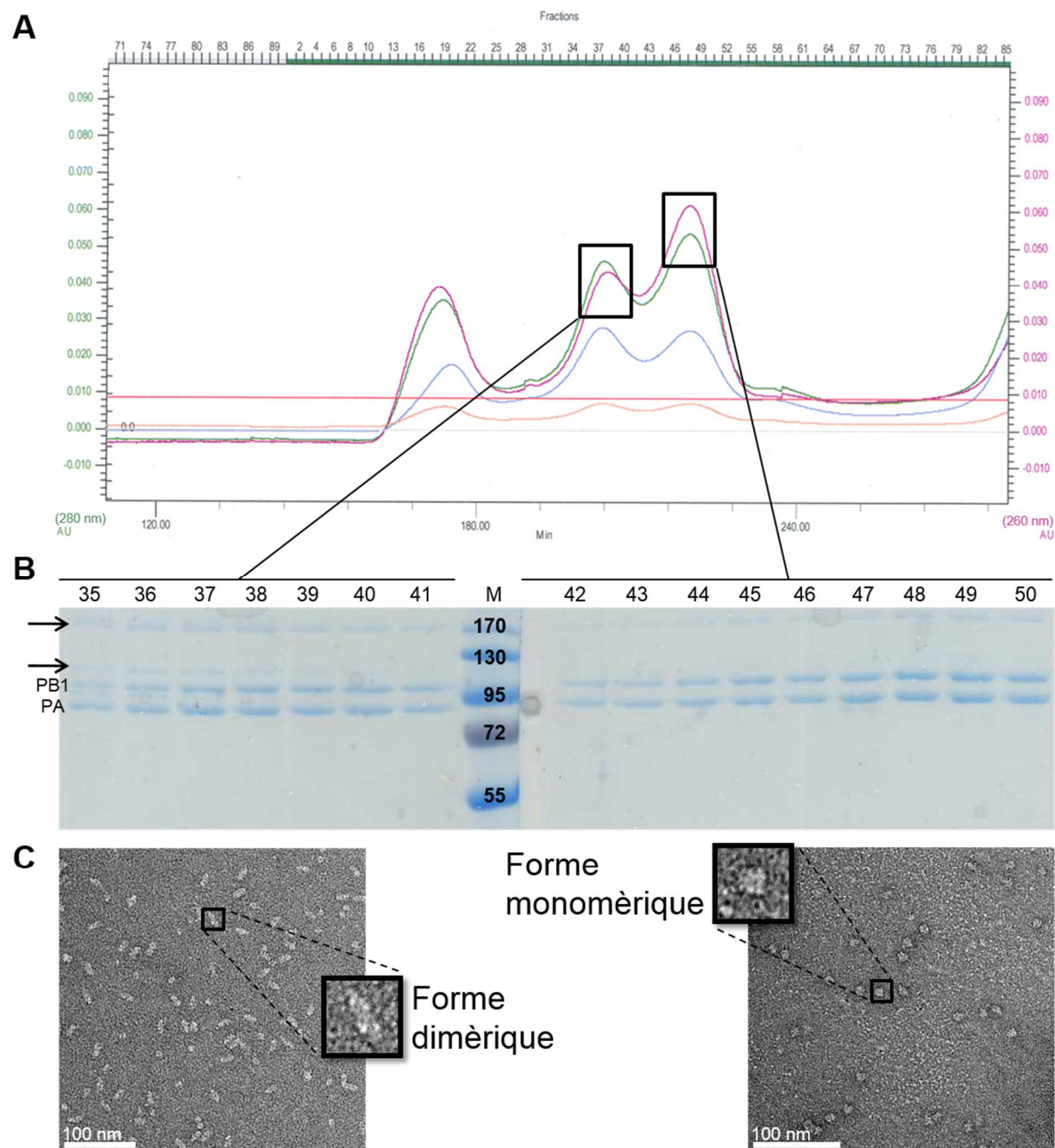


Figure 37 : Purification de l'ARN-polymérase tronquée sous sa forme monomérique. A/ Profil d'élution obtenu par chromatographie d'exclusion de taille en présence d'ARN. L'absorbance à 280 nm est représentée par la courbe verte alors que celle à 260 nm est représentée par la courbe en violet. **B/** Les fractions d'élution sont déposées sur gel SDS-polyacrylamide 12 % et révélées par coloration au bleu de Coomassie. **C/** Clichés de microscopie électronique en coloration négative du complexe purifié sous forme dimérique (à gauche) et sous forme monomérique (à droite).

3.5 PURIFICATION DE PACter-PB1 Δ Cter

3.5.1 EXPRESSION DE PACter-PB1 Δ Cter

Le protocole d'expression de PACter-PB1 Δ Cter est identique à celui suivi pour l'ARN-polymérase tronquée. La construction a été réalisée dans une cassette de clonage optimisée, différente de celle utilisée pour la construction de l'ARN-polymérase tronquée. Cette optimisation concerne les régions de connections flanquant les sites de clivage à la protéase TEV. Ces régions ont été allongées pour faciliter l'accès à la protéase permettant d'éviter les formes mal clivées ou non clivées qui étaient observées lors de la purification de l'ARN-polymérase tronquée.

3.5.2 PURIFICATION DE PACter-PB1 Δ Cter

La purification de la construction PACter-PB1 Δ Cter suit aussi un protocole de purification en deux étapes composé d'une chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique. A l'issue de la chromatographie d'affinité, les fractions d'élution sont déposées sur gel 12 % polyacrylamide SDS (Figure 38.A). Les deux bandes correspondant à PACter et PB1 sont visibles ainsi que les deux bandes correspondant à la protéase TEV. Les fractions d'élution contenant la protéine ont été rassemblées et injectées sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique.

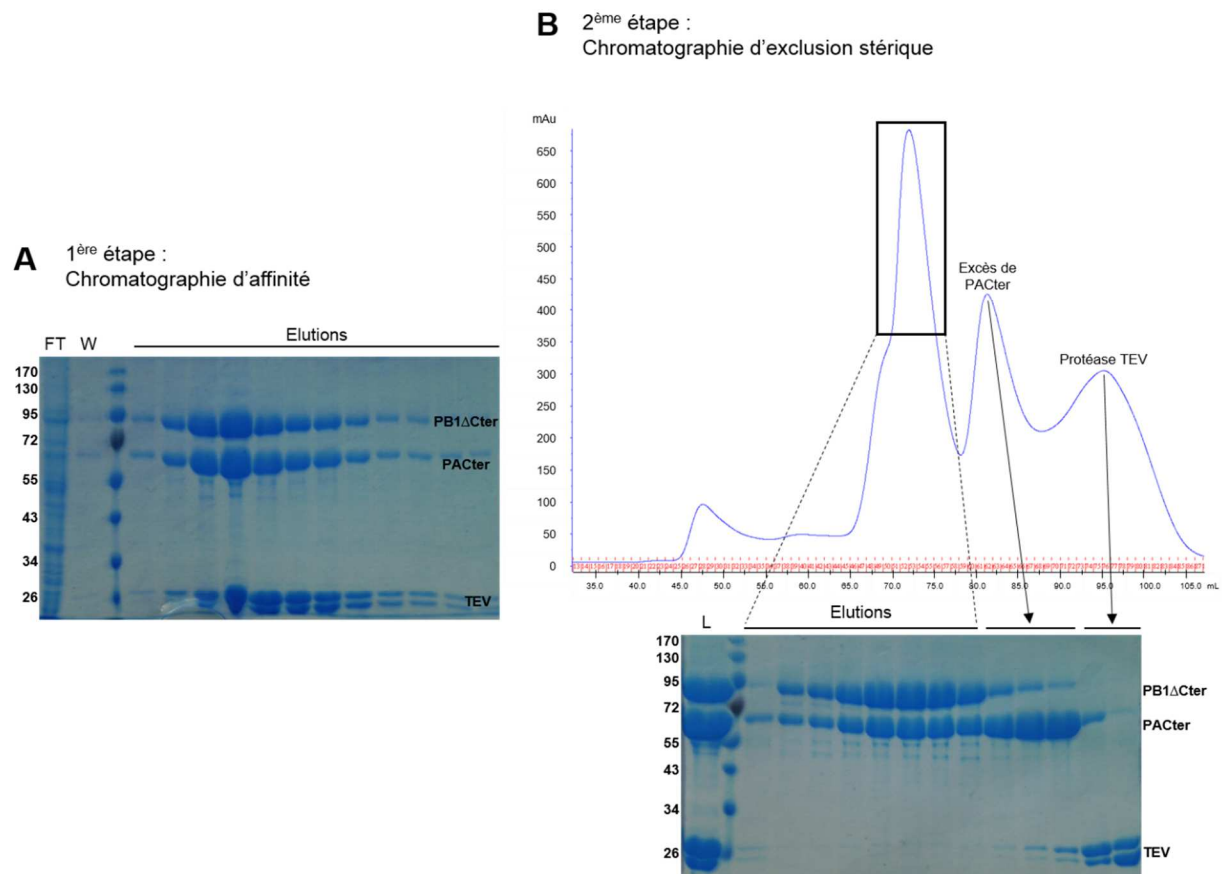


Figure 38 : Etapes de purification de PACter-PB1 Δ Nter. L'étape de chromatographie d'affinité (**A**) est suivie d'une étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille (**B**). Les fractions correspondant à chaque étape de purification sont déposées sur gel 12 % polyacrylamide SDS : échantillon injecté (L), fraction non retenue (FT), lavage (W), éluions. Sur le profil de chromatographie, le pic correspondant à l'excès de la partie C-terminale de PA s'intercale entre celui correspondant à PACter-PB1 Δ Cter et celui correspondant à la protéase TEV.

Le passage sur colonne d'exclusion de taille (Figure 38.B) élimine totalement la protéase TEV et fournit un échantillon homogène du complexe PACter-PB1 Δ Cter qui peut être utilisé directement pour les essais de cristallogénèse. Cependant, un passage sur colonne héparine avant l'étape de chromatographie d'exclusion de taille permet de se débarrasser de l'excès de PACter (Figure 39). Cette étape supplémentaire permet de s'affranchir d'une éventuelle contamination par un excès de PACter et de sélectionner les complexes viables, théoriquement capable de lier l'ARN. Elle permet également d'exclure toute contamination par des acides nucléiques. Cette étape intermédiaire a donc été ajoutée au protocole de purification pour améliorer la qualité de l'échantillon pour les tests de cristallisation.

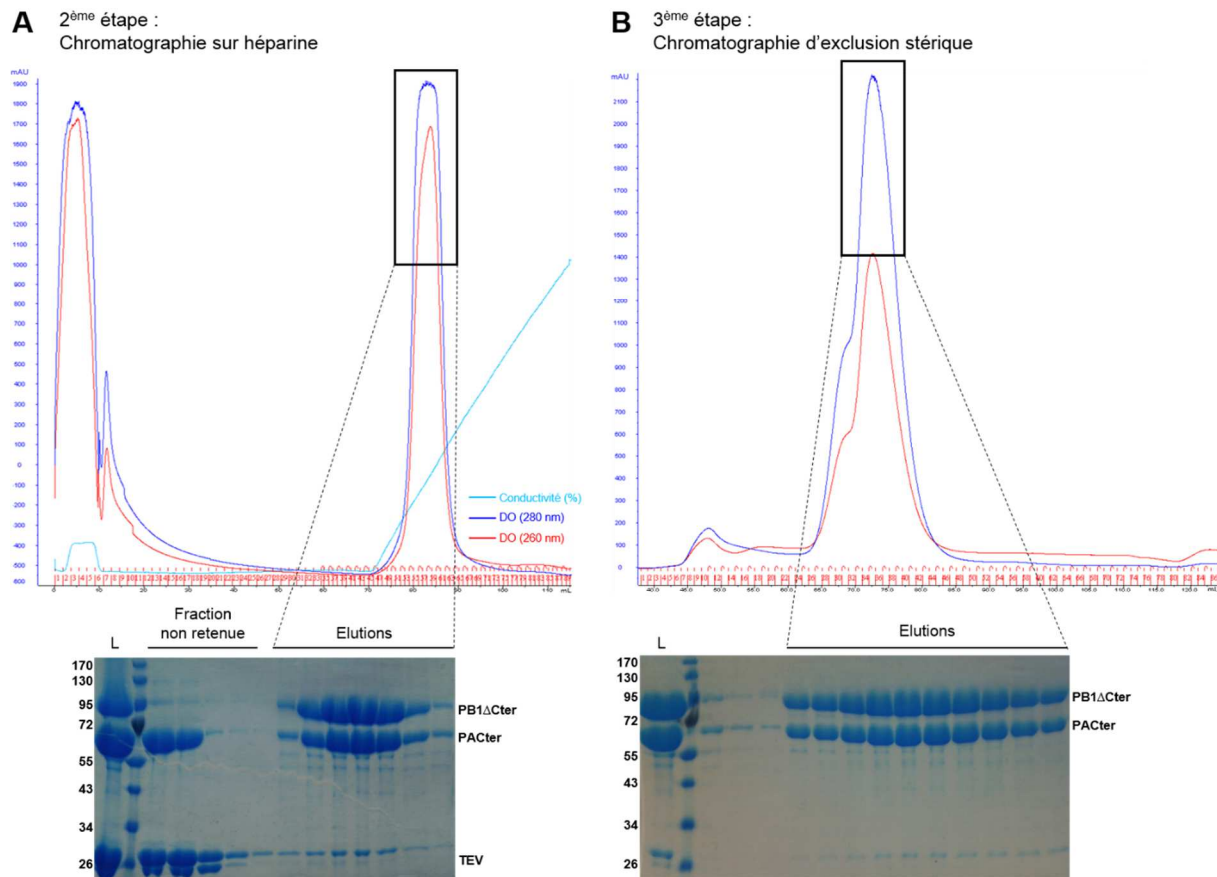


Figure 39 : La chromatographie sur Héparine permet d'éliminer l'excès de PACter et de sélectionner les complexes viables pour la fixation de l'ARN. L'échantillon est injecté sur colonne héparine (A) avant la dernière étape de purification sur chromatographie d'exclusion de taille (B). Les fractions d'élution sont déposées sur gel 12 % polyacrylamide SDS après chaque étape de purification. L : échantillon injecté.

Le rendement de production de cette construction est beaucoup plus élevé que celui de l'ARN-polymérase tronquée puisqu'il est possible d'obtenir plus de 20 mg de protéine à partir d'un litre de culture de cellules d'insecte.

3.5.3 CARACTERISATION DE PACter-PB1 Δ Cter PAR SEC-MALLS-RI

Une expérience de SEC-MALLS-RI (cf. principe § 3.4.3.A, p 65) a été réalisée pour vérifier la masse moléculaire attendue du complexe hétérotrimérique et ainsi que son état oligomérique (Figure 40). La protéine a été injectée à une concentration de 15 mg.mL⁻¹ correspondant à la concentration utilisée lors des tests de cristallisation. Dans les conditions de tampon standard à 300 mM NaCl, le profil d'élution présente un pic principal à un volume d'élution de 10,7 mL dont la masse molaire associée est estimée à 280 kDa ce qui correspond au double de la masse molaire attendue (140 kDa). Le pic majoritaire est suivi

d'un petit pic dont la masse molaire associée est estimée à 147 kDa ce qui correspond à la masse molaire espérée pour le complexe PACter-PB1 Δ Cter. Contre toute attente, ces résultats montrent qu'à cette concentration en sel (300 mM) et à cette concentration (15 mg.mL⁻¹), le complexe PACter-PB1 Δ Cter se comporte en dimère en solution.

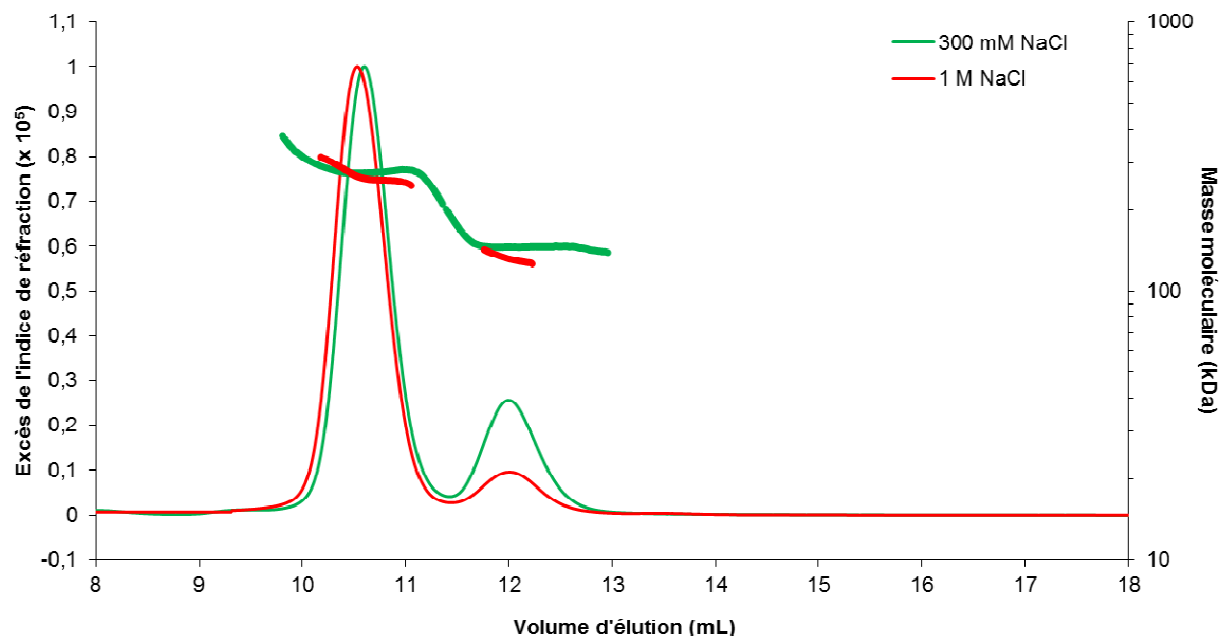


Figure 40 : Le complexe PACter-PB1 Δ Cter se comporte en dimère. PACter-PB1 Δ Cter est injecté en présence de 300 mM NaCl (courbe verte) ou de 1 M NaCl (courbe rouge). L'indice de réfraction est représenté par les courbes en traits fins et la masse moléculaire par les courbes en traits épais.

Cette construction étant destinée à l'étude cristallographique, l'échantillon doit impérativement être le plus homogène possible. La dimérisation du complexe laisse craindre que l'échantillon soit dynamique dans sa composition. Différentes concentrations en sel (NaCl) ont été testées pour voir s'il était possible de déstabiliser le dimère et de fixer la forme monomérique. A de fortes concentrations en sel (1 M NaCl) à la même concentration en protéine, le profil de MALLS obtenu est identique à celui observé à 300 mM. A une plus faible concentration en sel (100 mM), la grande majorité du complexe précipite (courbe non montrée). Les différentes concentrations en sel testées n'ont pas permis la dissociation du dimère. Contrairement au cas l'ARN-polymérase tronquée, l'ajout d'ARN, avant ou après purification, ne permet pas davantage de rompre la dimérisation.

Des essais de cristallisation ont tout de même été initiés et ont conduit à l'obtention de cristaux exploitables pour l'étude cristallographique qui est décrite dans le CHAPITRE 4 (cf. § 4.2, p 85). En parallèle, une enveloppe SAXS de cette construction a été obtenue.

3.6 DISCUSSION ET CONCLUSION

La stratégie d'expression mise en place a permis pour la première fois d'exprimer une ARN-polymérase recombinante en quantité suffisante pour des études structurales à grande échelle. Étonnamment, l'ARN-polymérase produite se comporte comme un dimère d'hétérotrimère. Les données obtenues en MALLS ont montré que l'ajout d'ARN a pour effet de provoquer la dissociation du dimère d'ARN-polymérase tronquée. Le protocole de purification en présence d'ARN qui découle de ces observations a permis d'obtenir l'hétérotrimère de l'ARN-polymérase tronquée sous sa forme monomérique. Selon la stratégie de purification employée, il est donc possible de purifier l'ARN-polymérase tronquée sous deux états d'oligomérisation. Ces résultats ont constitué le point de départ dans la caractérisation de l'interaction du complexe de l'ARN-polymérase avec l'ARN. La présence de l'ARN ne remplace pas le glycérol qui reste nécessaire pour éviter l'agrégation du complexe.

Les résultats présentés ici montrent l'effet de l'ARN Short-panhandle sur la dissociation du dimère d'ARN-polymérase. Cet ARN a une longueur de 36 nt et présente les extrémités 3' et 5' conservées des ARNv. Il serait intéressant de tester l'effet d'autres ARN de différentes longueurs et surtout l'effet des extrémités 3' et 5' indépendamment l'une de l'autre sur la dissociation.

Avant l'obtention de l'ARN-polymérase tronquée, la stratégie adoptée s'est heurtée à de nombreux problèmes d'expression. La comparaison des résultats d'expression de plusieurs constructions ont montré que les difficultés d'expression rencontrées étaient liées à la présence de PB2 et plus particulièrement à une région de PB2, située entre la région d'interaction avec PB1 et le domaine de reconnaissance de la coiffe. Dans le cas du virus influenza humain A/H3N2 utilisé, plus la longueur de cette partie de PB2 est augmentée, plus les taux d'expression diminuent. Des constructions identiques sur une souche aviaire ont conduit à la même constatation. L'excision de cette région de PB2 permet de rétablir des niveaux d'expression corrects. Les raisons précises de ces problèmes d'expression sont à identifier et des travaux sont menés au laboratoire (Christopher Swale, UVHCI) au moment de l'écriture de ce manuscrit pour tenter de localiser avec plus de précision la région de PB2 à l'origine des problèmes d'expression.

Il ne semble pas que PB2 soit toxique pour la cellule d'insecte puisque la sous-unité s'exprime bien seule mais est totalement insoluble. PB2 semble fortement impliquée dans des phénomènes de dérégulation cellulaire en interagissant notamment avec des protéines de la mitochondrie (Graef et al., 2010) et d'autres facteurs cellulaires (Tafforeau et al., 2011). Il n'est donc pas à exclure que la sous-unité PB2 puisse interagir avec des facteurs transcriptionnels ou traductionnels. À ce niveau, pour essayer de trouver l'origine du problème, il a été envisagé de suivre la production d'ARNm par PCR quantitative lors d'un cycle d'expression pour savoir si le problème vient de l'étape de transcription et de celle de traduction.

ETUDE STRUCTURALE

4.1	ETUDE DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	76
4.1.1	COLORATION NEGATIVE.....	76
4.1.1.A	PRINCIPE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	76
4.1.1.B	RECONSTRUCTIONS 3D OBTENUES EN COLORATION NEGATIVE	77
4.1.2	CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	79
4.1.2.A	PRINCIPE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	79
4.1.2.B	RECONSTRUCTION 3D DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE NON DIMERIQUE	79
4.1.2.C	CRYO-ME SUR LE DIMERE D'HETEROTRIMERES.....	80
4.1.3	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	83
4.2	ETUDES PAR LES RAYONS-X	85
4.2.1	ETUDE PAR SAXS DE PACTER-PB1 Δ CTER.....	85
4.2.1.A	PRINCIPE	85
4.2.1.B	TRAITEMENT DES DONNEES SAXS OBTENUES	86
4.2.1.C	ENVELOPPE SAXS DE PACTER-PB1 Δ CTER.....	88
4.2.2	ETUDE PAR CRISTALLOGRAPHIE RAYONS-X DE PACTER-PB1 Δ CTER	89
4.2.2.A	PRINCIPE DE LA CRISTALLOGENESE	89
4.2.2.B	CRISTALLOGENESE INITIALE AVEC ET SANS ARN	90
4.2.2.C	PRODUCTION DES CRISTAUX DE PACTER-PB1 Δ CTER	92
4.2.2.D	VERIFICATION DE LA COMPOSITION DES CRISTAUX OBTENUS	93
4.2.2.E	DIFFRACTION INITIALE.....	94
4.2.2.F	STRATEGIE D'AMELIORATION DES CRISTAUX.....	94
4.2.2.G	ACQUISITION DES DONNEES	98
4.2.2.H	STRUCTURE DE PACTER-PB1 Δ CTER.....	100
4.2.3	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	100

A l'issue des caractérisations préliminaires décrites dans le CHAPITRE 3, la construction de l'ARN-polymérase tronquée a été utilisée pour les études structurales et fonctionnelles qui se sont déroulées en parallèle. Il était en effet essentiel de mener les études structurales sur une protéine fonctionnelle dans le but de garantir pertinence et signification biologique.

4.1 ETUDE DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les progrès de la microscopie électronique au cours des dernières années ont permis l'étude de particules aussi petites que l'ARN-polymérase du virus de la grippe (~270 kDa) et plusieurs reconstructions 3D sont disponibles. Parmi elles, trois reconstructions ont été obtenues à partir d'ARN-polymérases isolées solubles (Figure 22.C, D et E, p 33). Les autres ont été réalisées à partir d'une ARN-polymérase en complexe avec des NP et de l'ARN dans le contexte d'une RNP (Figure 22.A et B, p 33).

La nouvelle stratégie d'expression de l'ARN-polymérase tronquée a permis d'obtenir de grandes quantités solubles d'un échantillon homogène. Grâce à cela, il a été possible d'augmenter la résolution de la reconstruction 3D de l'ARN-polymérase tronquée en cryo-microscopie électronique (cryo-ME) à 15 Å.

4.1.1 COLORATION NEGATIVE

4.1.1.A PRINCIPE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les protéines se composent essentiellement d'atomes légers (carbone, hydrogène, oxygène...) qui possèdent un faible pouvoir diffuseur conduisant à un faible contraste au niveau des images. Pour augmenter le contraste, des agents contrastants (« colorants ») composés d'atomes lourds sont utilisés. Les échantillons sont préparés selon la technique de flottaison du carbone (Figure 41).

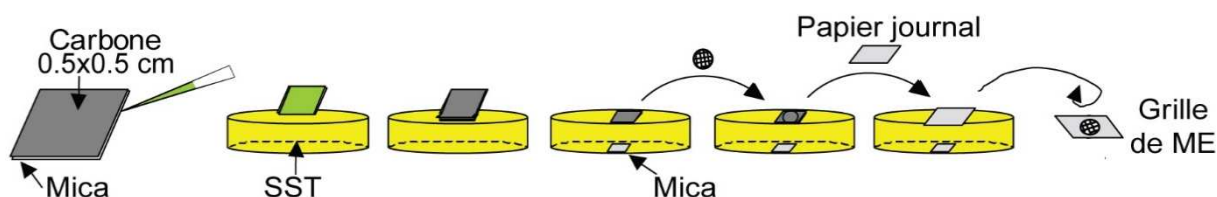


Figure 41 : Les différentes étapes de la coloration négative. A l'aide d'une pipette, 1 à 2 μL d'échantillons sont placés à l'interface carbone-mica d'une petite pièce de mica recouverte d'une fine couche de carbone. La surface extérieure du carbone est hydrophobe mais à l'interface avec le mica, le carbone est propre et hydrophile, l'échantillon, est alors aspiré entre les couches de carbone et de mica et s'adsorbe sur la couche de carbone. L'ensemble est placé dans une coupelle contenant un colorant (Sodium Silico Tungstate, SST par exemple). Les deux couches sont alors séparées par flottaison : le mica, plus lourd, va tomber au fond de la coupelle alors que la fine couche de carbone va rester à la surface avec l'échantillon adsorbé. Une grille en cuivre est placée sur la couche de carbone flottante et l'ensemble carbone plus grille est récupéré grâce à un petit morceau de papier journal posé au-dessus de la grille. En s'hydratant, le papier journal va permettre de récupérer la grille et l'excédent du film carbone autour, en évitant qu'il ne se replie sur celle-ci. La grille recouverte de carbone est placée sur un papier absorbant et séchée à l'air libre durant 5 min avant d'être insérée dans le microscope (Schoehn and Ruigrok, 2008).

Les atomes lourds vont se fixer préférentiellement autour des particules protéiques adsorbées sur le carbone. La particule n'est donc pas colorée, elle est entourée d'un colorant qui met son contour en évidence en créant une empreinte des particules dans le colorant. Un fort contraste est ainsi généré entre les zones riches en métaux lourds et la particule qui apparaît plus claire que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative. Sur les images, la particule apparaît blanche sur fond sombre.

Dans le cas de l'ARN-polymérase, le choix du colorant s'est tourné vers le Sodium Silico Tungstate (SST). Il s'agit d'un colorant chimiquement inerte à pH neutre. Il présente l'avantage de rester très proche du film de carbone et d'entourer uniquement les parties de la protéine en contact avec le film carbone. Pour cette raison il est très souvent utilisé pour colorer les protéines de petite taille.

La coloration négative présente l'avantage de permettre la visualisation de petites protéines (60 kDa) et la détermination rapide de leur état oligomérique ce qui en fait une méthode parfaite pour les contrôles qualité effectués lors de la purification et des études biochimiques de l'ARN-polymérase. La principale limitation de cette technique réside dans l'étape de séchage à l'air après coloration qui engendre des

forces de tensions importantes sur l'objet biologique, en particulier sur les complexes protéiques fragiles qui peuvent se dissocier et / ou s'aplatir. Il convient également de noter que la phase d'adsorption des protéines sur le film carbone peut induire des changements conformationnels.

4.1.1.B RECONSTRUCTIONS 3D OBTENUES EN COLORATION NEGATIVE

La structure macromoléculaire de l'ARN-polymérase tronquée a pu être renseignée par deux reconstructions en trois dimensions obtenues par microscopie électronique en coloration négative. La première reconstruction à 25 Å de résolution concerne l'hétérotrimère sous forme dimérique (**Figure 42.A**).

Une seconde reconstruction à 20 Å de résolution de l'hétérotrimère en complexe avec l'ARN a été obtenue (**Figure 42.B**). L'ARN (cf. § 3.4.4, p 68) n'est pas visible dans la structure à cette résolution et la localisation des sous-unités est impossible. Ces deux structures donnent une idée de la forme générale de l'ARN-polymérase tronquée et confirme l'étroite association des sous-unités, malgré la troncation de l'une d'entre elles, pour former une structure compacte.

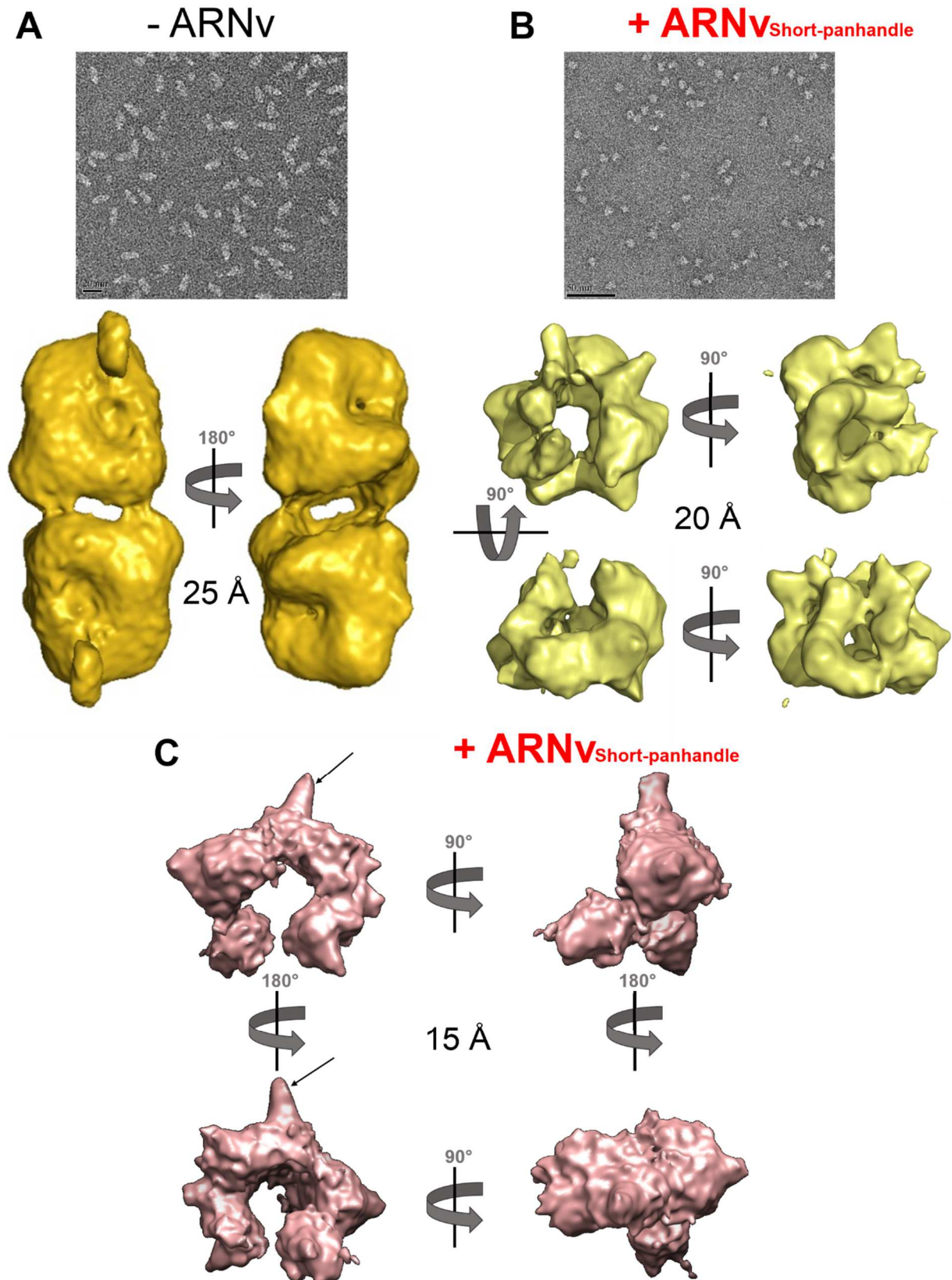


Figure 42 : Reconstructions de l'ARN-polymérase tronquée du virus influenza obtenues en microscopie électronique. **A/** Image et reconstruction 3D du dimère d'hétérotrimères à 25 Å de résolution obtenue par ME en coloration négative à partir de 10 300 particules. La barre d'échelle représente 20 nm. **B/** Image et reconstruction 3D de l'hétérotrimère en complexe avec l'ARN Short-panhandle mimant l'ARN viral à 20 Å de résolution obtenue par ME en coloration négative à partir de 8470 particules. La barre d'échelle représente 50 nm. **C/** Reconstruction 3D de l'hétérotrimère en complexe avec l'ARN Short-panhandle mimant l'ARN viral obtenue en cryo-ME. Les flèches indiquent une densité en forme d'épave pouvant correspondre à la tige-boucle de l'ARN Short-Panhandle.

4.1.2 CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

4.1.2.A PRINCIPE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La préparation des échantillons pour la cryo-ME consiste à congeler très rapidement dans de l'éthane liquide des échantillons hydratés de façon à les figer dans une glace amorphe (vitrification). La congélation est si rapide qu'elle empêche la formation de cristaux de glace qui détruiraient la structure de l'échantillon. La glace amorphe est transparente aux électrons et grâce à l'absence de cristaux de glace, l'échantillon est figé dans son état natif sans être déformé.

L'échantillon est déposé sur une grille de cuivre recouverte d'un film à trous, spécifique pour la cryo-ME. Cette particularité de la technique implique une concentration de l'échantillon plus forte que celle nécessaire en coloration négative. Pour améliorer l'adsorption de l'échantillon et potentiellement réduire cette concentration, la grille peut être recouverte d'une fine couche de carbone.

Contrairement à la coloration négative, cette technique s'affranchit donc de l'utilisation de colorant ce qui permet non seulement de préserver la structure de l'échantillon mais aussi d'accéder à sa structure interne. Elle permet ainsi d'éviter les problèmes liés aux artefacts de coloration et aux étapes de séchage rencontrés en coloration négative. Cependant, en raison de l'absence d'atomes lourds, les images obtenues possèdent un très faible contraste rendant l'analyse d'image indispensable.

Cette technique est beaucoup plus lourde à mettre en place que celle de coloration négative. Une fois congelé, l'échantillon doit être conservé à très faible température ($< 160\text{ }^{\circ}\text{C}$) pour éviter la formation irréversible de cristaux de glace qui provoquerait la destruction de la structure de l'échantillon. Cette très faible température doit être également maintenue lors de l'insertion des grilles dans le microscope rendant l'utilisation d'un matériel cryogénique spécifique obligatoire et la manipulation délicate.

4.1.2.B RECONSTRUCTION 3D DE L'ARN-POLYMERASE TRONQUEE NON DIMERIQUE

En raison de la présence de 10 % glycérol dans le tampon de l'échantillon d'ARN-polymérase tronquée non dimérique, sa préparation pour la cryo-microscopie électronique requiert quelques subtilités. Le glycérol présente en effet l'inconvénient de fortement réduire le contraste en microscopie électronique. Si la concentration de 10 % n'a pas posé trop de problèmes lors de la technique de coloration négative, elle réduit très fortement le contraste des images jusqu'à rendre les particules invisibles en cryo-ME. De plus, la cryo-ME nécessite des concentrations plus importantes en protéine, il est donc nécessaire de concentrer la protéine. Or, lors de la concentration de la protéine, la concentration en glycérol a aussi tendance à augmenter dans le concentrateur. Pour contourner ce problème, la technique préparatoire suivante a été appliquée.

Une goutte de quelques microlitres est déposée sur la grille en cuivre de cryo-ME. Avant congélation, pour éliminer le glycérol, la grille est rapidement lavée à la surface d'une goutte de tampon sans glycérol. Pour cela, la grille est maintenue à la surface de la goutte et le glycérol, plus dense, tombe au fond de la goutte (Figure 43). La chute du glycérol, formant des volutes, est facilement visible et témoigne de l'efficacité du lavage.

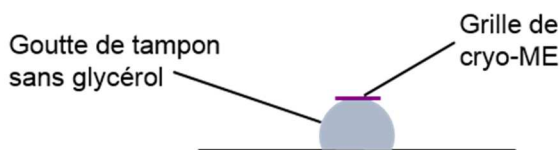


Figure 43 : Méthode de trempage pour retirer le glycérol de l'échantillon. La grille de cryo-ME est placée à la surface d'une goutte de tampon sans glycérol. Plus lourd, le glycérol tombe au fond de la goutte.

Cette technique a permis d'obtenir des images exploitables qui ont conduit à une reconstruction 3D à environ 15 Å de résolution de l'hétérotrimère non dimérique en complexe avec l'ARN. Au niveau de sa forme générale, la structure macromoléculaire obtenue semble similaire à celle obtenue à plus basse résolution en coloration négative. A cette résolution, il reste impossible de localiser les trois sous-unités. Une protubérance est cependant visible (Figure 42.C, flèches noires) sur la reconstruction. Elle pourrait correspondre à la tige-boucle libre de l'ARN.

4.1.2.C CRYO-ME SUR LE DIMERE D'HETEROTRIMERES

Un travail identique a été entamé sur le dimère d'hétérotrimères. Il présente plusieurs avantages :

- Il constitue une particule deux fois plus grosse. Sa plus grande taille peut permettre d'améliorer la résolution.
- Il présente une symétrie dans son assemblage qui facilite non seulement l'orientation des particules lors du traitement des images et de la reconstruction, mais nécessite deux fois moins d'images.

La technique de lavage rapide de la grille utilisée précédemment pour retirer le glycérol n'a pas pu être appliquée. En effet, lors du lavage, la disparition du glycérol entraîne la déstabilisation du dimère et son désassemblage. L'échantillon sur la grille n'est plus alors composé que d'une majorité d'hétérotrimères non dimériques.

Pour contourner ce problème, le dimère a été stabilisé via un agent chimique de pontage (ou agent réticulant). La méthode GraFix a été appliquée (Kastner et al., 2008; Stark, 2010). Elle consiste à utiliser un gradient de glycérol couplé à un gradient d'un agent chimique de pontage (glutaraldéhyde) pour stabiliser les complexes macromoléculaires (Figure 44). Le glutaraldéhyde réticule les amines primaires entre elles.

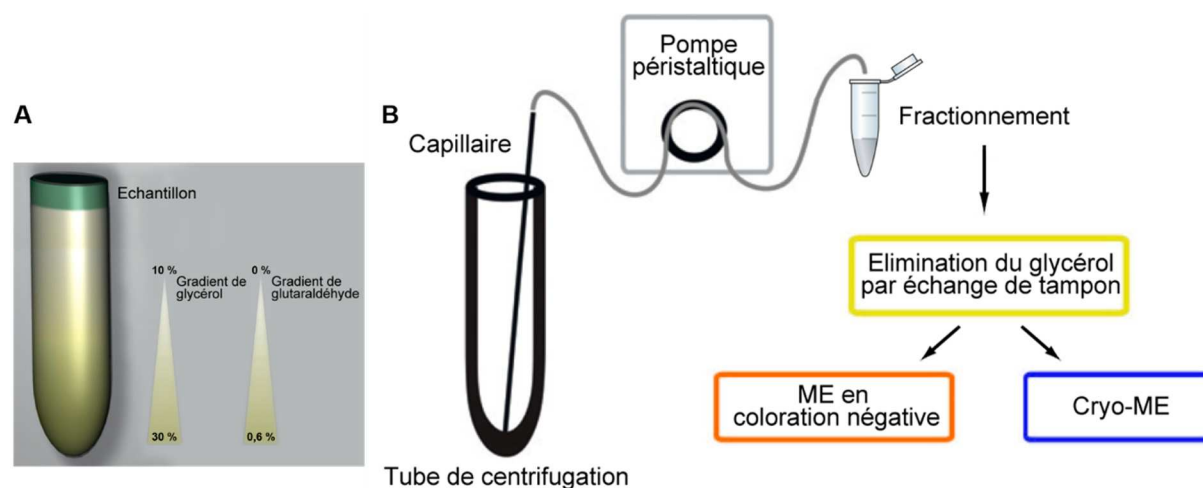


Figure 44 : Principe de la méthode GraFix utilisée pour la stabilisation du dimère d'hétérotrimères. A/ L'échantillon est déposé sur un gradient de glycérol (10 à 30 %) couplé à un gradient de glutaraldéhyde (0 à 0,6 %) qui permet la stabilisation du complexe. B/ Après centrifugation, les gradients sont fractionnés et le glycérol est éliminé des fractions contenant le complexe stabilisé pour l'étude en cryo-ME (Figures adaptées de Stark, 2010).

Les échantillons de dimères d'hétérotrimères sont déposés sur les gradients et centrifugés à 45000 RPM pendant 16 h. La quantité de matériel déposé (200 pmol) sur chaque gradient est ajustée pour permettre la stabilisation de chaque complexe individuellement en évitant les réticulations inter-complexes. La pression exercée sur les complexes durant l'ultracentrifugation limite les phénomènes d'agrégation en exposant les complexes individuellement à l'agent réticulant.

Un gradient de glycérol sans glutaraldéhyde est effectué comme contrôle dans les mêmes conditions (Figure 45.A). Les gradients sont récupérés en fractions de 180 μ L déposées sur gel 5 % polyacrylamide-SDS pour vérifier l'efficacité de la réticulation (Figure 45.B). La réticulation forme des liaisons covalentes irréversibles et les protéines du complexe ne se dissocient plus en conditions dénaturantes et par chauffage. Il est donc impossible de vérifier la composition du complexe par électrophorèse sur gel polyacrylamide. L'unique bande de haut poids moléculaire visible (espérée à environ 380 KDa) et les conditions dénaturantes du gel valident la réticulation. Les fractions contenant le complexe réticulé sont rassemblées et le glycérol est éliminé par un passage sur colonne échangeuse de tampon (Figure 45.C). L'état oligomérique des échantillons réticulés est contrôlé par microscopie électronique en coloration négative.

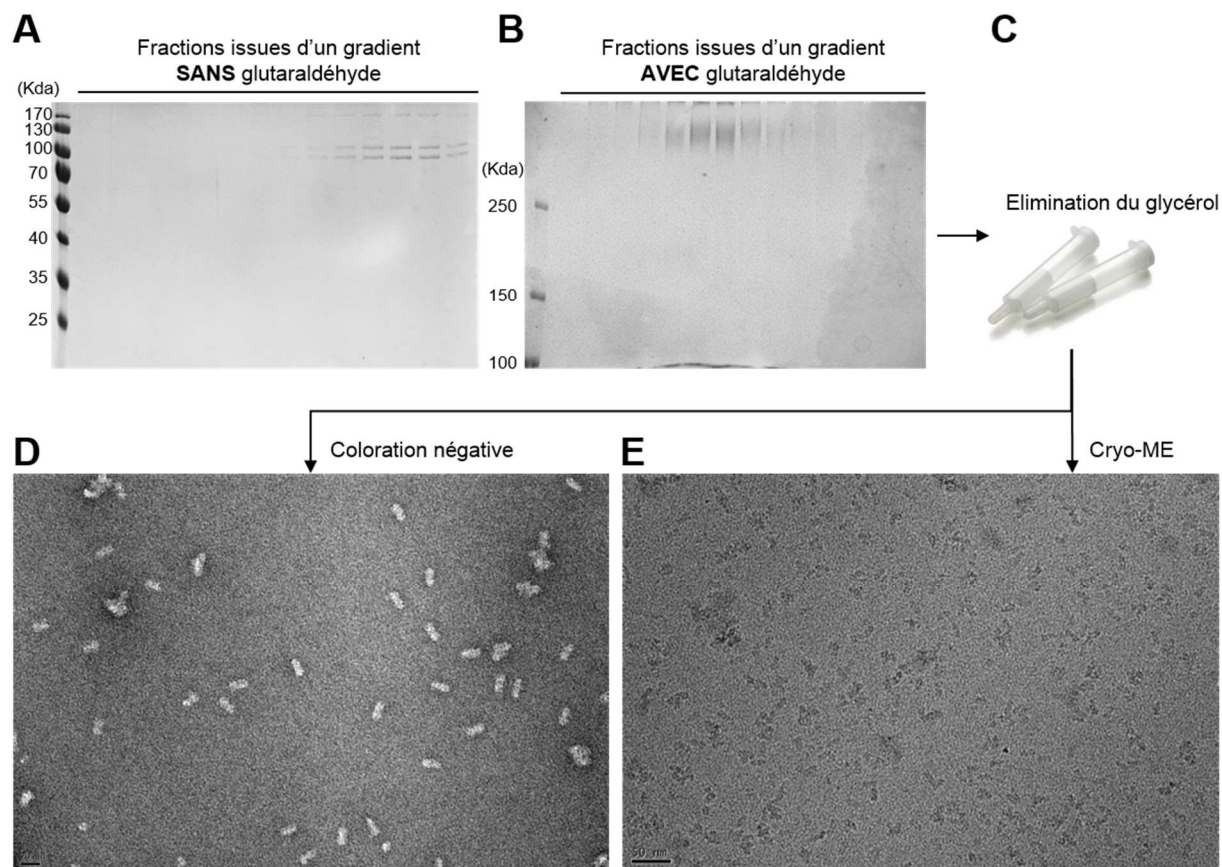


Figure 45 : Echantillon d'ARN-polymérase tronquée sous forme dimérique obtenu par la méthode GraFix. A/ Fractions provenant d'un gradient de glycérol témoin sans glutaraldéhyde déposées sur gel SDS-polyacrylamide 12 %. **B/** Fractions provenant d'un gradient de glycérol couplé à un gradient de glutaraldéhyde déposées sur un gel SDS-polyacrylamide 6 %. **C/** Les fractions contenant le dimère d'ARN-polymérase réticulé sont rassemblées et chargées sur colonne échangeuse de tampon pour éliminer le glycérol en vue de la cryo-microscopie électronique. **D/** Image en coloration négative du dimère d'ARN-polymérase obtenu par GraFix. La barre d'échelle représente 20 nm. **E/** Image en cryo-ME du dimère d'ARN-polymérase obtenu par GraFix. La barre d'échelle représente 50 nm.

Les images obtenues en coloration négative montrent un échantillon homogène composé d'une large majorité de dimères d'hétérotrimères (Figure 45.D). Les particules apparaissent bien contrastées et présentent un contour net.

Les grilles dédiées à la cryo-microscopie électronique ont ensuite été réalisées. Quelques microlitres d'échantillon sont déposés sur la grille. L'excès de liquide est retiré et l'échantillon est vitrifié par une procédure robotisée à 20 °C, 100 % d'humidité avec temps de « blotting » (drainage par papier filtre) de 2 secondes. Si les complexes préparés par la méthode GraFix s'adsorbent parfaitement sur les grilles dédiées à la coloration négative, ce n'est pas le cas sur les grilles dédiées à la cryo-ME. Très peu de

zones tapissées de particules sont visibles sur les grilles et leur faible nombre ne permet pas d'envisager une collecte d'images. Pour améliorer l'adsorption, différentes stratégies ont été employées :

- Deux références de grilles dédiées à la cryo-ME ont été testées (Quantifoil et Lacey). Les grilles Quantifoil présentent un carbone plus épais alors que les grilles Lacey sont composées d'un carbone plus fin. Aucune différence d'adsorption n'a été constatée.
- L'ajout d'un film carbone supplémentaire sur les grilles n'a pas non plus eu d'effet positif sur l'adsorption.
- Le « glow discharge » (processus de « décharge ionique »), utilisé pour rendre les grilles plus hydrophiles n'a pas entraîné d'amélioration de l'adsorption, que la grille soit recouverte ou non d'un film carbone.
- Différents temps de « blotting » s'étendant de 1 à 6 secondes couplés à différentes forces de « blotting » ont été testés en faisant varier les paramètres déjà cités ci-dessus. Le « blotting » correspond à l'étape durant laquelle l'excès de liquide provenant de la goutte d'échantillon est retiré. La force avec laquelle est appliqué le papier absorbant peut être modulée.
- Le temps et la manière d'incuber l'échantillon ont également été pris en compte. Des temps d'incubation de quelques secondes à plusieurs heures ont été testés en variant la façon dont l'échantillon était placé sur la grille. Deux méthodes d'application de l'échantillon sur la grille ont été utilisées :
 - I) Une goutte d'échantillon a été déposée sur la grille pour l'incubation. Cette méthode a l'avantage de permettre l'augmentation naturelle de la concentration en particule de la goutte par évaporation. En effet, sur des temps longs, la goutte va s'évaporer et permettre la concentration des particules à la surface de la grille. Si l'évaporation est trop importante, une nouvelle goutte doit être déposée sur la grille pour éviter qu'elle ne sèche complètement. Un séchage complet entraînerait une dégradation des protéines. Le point négatif de cette méthode est lié à la concentration en sel qui augmente lors de l'évaporation ce qui peut poser un problème pour la cryo-ME. En effet, la concentration en sels de l'échantillon est à l'origine de 300 mM et peut, lors de l'évaporation, rapidement dépasser les 500 mM, concentration au-delà de laquelle des problèmes de contraste peuvent apparaître en cryo-ME. Comme pour le glycérol, plus la quantité de sel augmente, plus la densité augmente, se rapprochant alors de celle des protéines (1,3 g/cm³), ce qui provoque une baisse du contraste.
 - II) A l'inverse, la grille a été posée à la surface d'un puit d'une plaque en téflon où se trouvent quelques dizaines de microlitres d'échantillon. Il est alors possible de laisser la grille en contact avec l'échantillon sur des temps très longs.

Les stratégies employées sont restées sans succès. Quelques images ont été obtenues (Figure 45.E) sur grille Quantifoil recouverte d'un film carbone après 1 h 30 d'incubation sur plaque téflon et un temps de « blotting » réalisé par automate de 5 secondes (force 6). Le faible nombre de zones couvertes de particules n'a toutefois pas permis d'envisager une collecte.

Deux paramètres resteraient éventuellement à tester. Le premier serait d'effectuer un « blotting » manuel sur le côté de la grille par capillarité pour éviter de décoller les particules qui semblent peu adsorbées à la surface de la grille. Lors de l'étape de « blotting », un autre type de papier buvard pourrait éventuellement être testé en seconde option (nitrocellulose par exemple).

4.1.3 DISCUSSION ET CONCLUSION

Malgré l'absence de soixante-dix pour cent de la sous-unité PB2, la forme générale des reconstructions obtenues semble similaire à celles existantes (Figure 46). En particulier la forme des hétérotrimères de l'ARN-polymérase sous forme dimérique semble très proche de celle des reconstructions de l'ARN-polymérase complète. Ceci suggère que PB2 n'a pas un rôle essentiel dans le repliement du complexe PA-PB1. Un effet de la dimérisation des hétérotrimères ne peut cependant pas être exclu. L'absence de PB2 pourrait être à l'origine de cette dimérisation qui permettrait la stabilisation de chaque hétérotrimère conduisant à la structure fermée observée.

La structure de l'ARN-polymérase tronquée non dimérique en présence d'ARN semble plus ouverte que celle des reconstructions déjà obtenues en coloration négative de l'hétérotrimère complet (Figure 46) (Resa-Infante et al., 2010; Torreira et al., 2007). Ce degré d'ouverture plus important est bien visible sur la reconstruction obtenue en cryo-ME. La structure forme un anneau ouvert à l'image de « deux pinces de crabe » se rejoignant sans se toucher. En plus de permettre la rupture de la dimérisation, le changement conformationnel entraîné par la fixation de l'ARN, conduirait donc à l'adoption d'une structure plus ouverte.

Une stabilisation du complexe hétérotrimérique de l'ARN-polymérase après fixation d'un promoteur ARNv avait été décrite (Brownlee and Sharps, 2002). En présence d'ARN, une conformation plus fermée de la polymérase tronquée était donc attendue. Là encore, l'absence de PB2 pourrait expliquer la configuration plus ouverte de la structure en présence d'ARN par rapport à celle du dimère d'hétérotrimères obtenue sans ARN. Le rôle de PB2 dans la stabilisation globale du complexe hétérotrimérique a d'ailleurs été décrit à travers des interactions additionnelles qui s'établissent entre la partie N-terminale de PA et PB2 (Hemerka et al., 2009).

La comparaison avec la reconstruction 3D obtenue en cryo-ME de l'ARN-polymérase entière est plus délicate (Figure 46.B, cryo-ME) (Moeller et al., 2012). La structure est décrite par un large domaine, duquel se détache un bras plus petit, assez éloigné de ce grand domaine. L'ensemble donne une structure qui semble plus ouverte que celles obtenues en coloration négative (Figure 46.B, coloration négative). Par sa plus faible compacité, cette reconstruction se rapproche donc de celle de l'ARN-polymérase tronquée avec ARN obtenue en cryo-ME. Cependant, les auteurs (Moeller et al., 2012) indiquent que le ratio 260/280 nm de l'échantillon purifié et utilisé pour cette reconstruction est égal à 1, la valeur de ce rapport indiquant une contamination partielle du complexe par des acides nucléiques. Il est donc impossible de conclure quant à la présence ou à l'absence d'ARN dans la structure et quant à son effet sur la conformation. Par conséquent il est tout autant impossible de conclure sur le lien qui pourrait exister entre la conformation ouverte et la présence d'ARN et de confirmer le changement conformationnel observé pour l'ARN-polymérase tronquée complexée en présence d'ARN.

Les données de microscopie électronique pourront être comparées à de futures données cristallographiques en ajustant les structures cristallographiques dans les densités des reconstructions obtenues en microscopie.

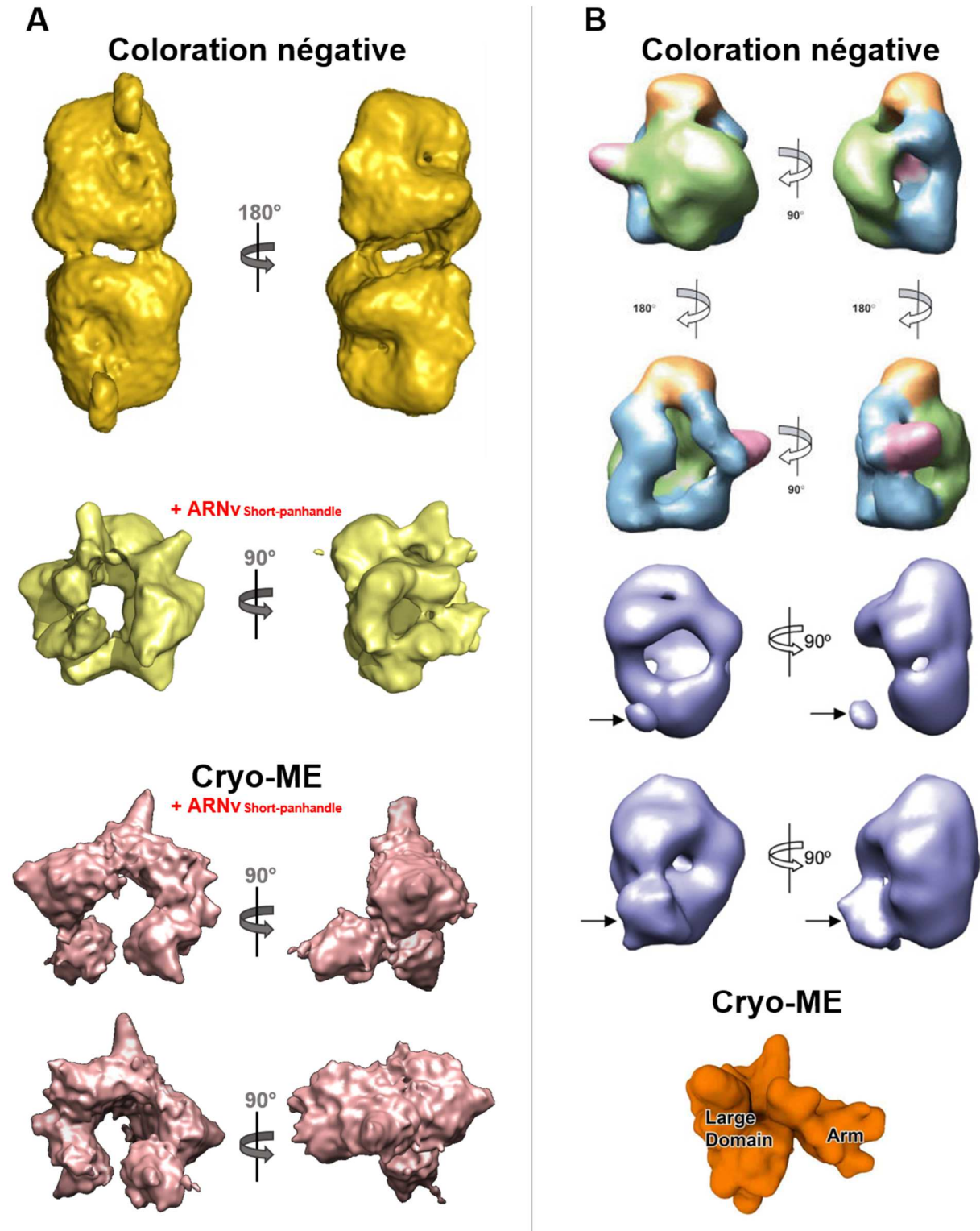


Figure 46 : Comparaison entre les reconstructions de l'ARN-polymérase tronquée (A) et celles de l'hétérotrimère complet (B). **A/** De haut en bas : Reconstruction 3D du dimère d'hétérotrimères à 25 Å de résolution obtenue par ME en coloration négative. Reconstruction 3D de l'hétérotrimère en complexe avec l'ARN Short-panhandle à 20 Å de résolution obtenue par ME en coloration négative. Reconstruction 3D de l'hétérotrimère en complexe avec l'ARN Short-panhandle obtenue en cryo-ME. **B/** En haut : Reconstruction 3D d'une ARN-polymérase isolée soluble à 26 Å de résolution (Torreira et al., 2007). Les aires structurales apparaissent en différentes couleurs pour faciliter la visualisation. Au centre : Reconstruction 3D d'une ARN-polymérase isolée soluble à 25 Å de résolution (Resa-Infante et al., 2010). En bas : Reconstruction 3D d'une ARN-polymérase isolée soluble à 13 Å de résolution (Moeller et al., 2012).

4.2 ETUDES PAR LES RAYONS-X

Parmi les trois sous-unités, PB1 reste la seule presque totalement inconnue quant à sa structure. Les difficultés rencontrées pour la cristallisation de l'ARN-polymérase tronquée ont conduit à concevoir une construction spécifique pour l'étude cristallographique qui intègre PB1, pour tenter d'en obtenir la structure : PACter-PB1 Δ Cter. PB1 ne s'exprimant pas seule, cette construction constitue la séquence protéique minimale permettant de stabiliser la sous-unité PB1 en grande quantité et soluble. Elle se compose de la partie C-terminale de PA débarrassée de sa partie N-terminale portant l'activité endonucléase. Sur PB1, la région d'interaction avec la sous-unité PB2, dont la structure est déjà connue, a été retirée. Ces troncations ont été réalisées dans le souci d'obtenir la structure la plus compacte et la moins flexible possible pour optimiser les chances de cristalliser le complexe. En parallèle de l'étude cristallographique, une étude par diffusion des rayons-X aux petits angles a été réalisée.

4.2.1 ETUDE PAR SAXS DE PACter-PB1 Δ Cter

4.2.1.A PRINCIPE

La technique de SAXS (Small Angle X-ray Scattering) permet d'obtenir des informations à basse résolution de macromolécules en solution. Conceptuellement, l'expérience de SAXS est très simple : l'échantillon en solution est exposé à un faisceau de rayons-X et les rayonnements diffusés sont enregistrés par un détecteur. Le phénomène de diffraction des rayons-X par un cristal, décrit par la loi de Bragg, conduit à des pics de diffraction de forte intensité. Ces pics sont générés par des rayonnements secondaires sortant du cristal avec des angles de plusieurs degrés par rapport au trajet du faisceau de rayons-X incident. La loi de Bragg (cf. § 4.2.2.E, p 94 et Figure 59) indique que plus les plans d'atomes diffusants sont proches (d petit), plus le rayonnement diffusé est émis à des angles grands par rapport au trajet du faisceau incident. A l'inverse, il est possible de détecter un rayonnement à des angles très petits qui émerge presque dans l'axe du faisceau incident. C'est sur ce principe que repose la diffusion des rayons-X aux petits angles.

Cette technique autorise l'analyse d'échantillons au degré d'organisation beaucoup plus faible que celui rencontré à travers les motifs périodiques d'un cristal. Par contre, à de si petits angles, le rayonnement-X enregistré fournit des informations à basse résolution, à travers une échelle allant de la centaine de nanomètre au nanomètre. L'analyse des données de SAXS permet de déterminer la forme globale d'une particule (enveloppe) et de lui attribuer différents paramètres tels qu'une dimension maximale ($D_{\max}$), un rayon de giration (R_g), un volume ou encore une estimation de sa masse moléculaire.

4.2.1.B TRAITEMENT DES DONNÉES SAXS OBTENUES

Lors de l'expérience de SAXS sur la ligne BM29 de l'ESRF, l'échantillon de PACter-PB1 Δ Cter a été injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (S200, 10 mL, GE Healthcare) située en amont de la cellule de mesure de diffusion aux petits angles (Figure 47.A). Cette étape permet d'optimiser l'homogénéité de l'échantillon.

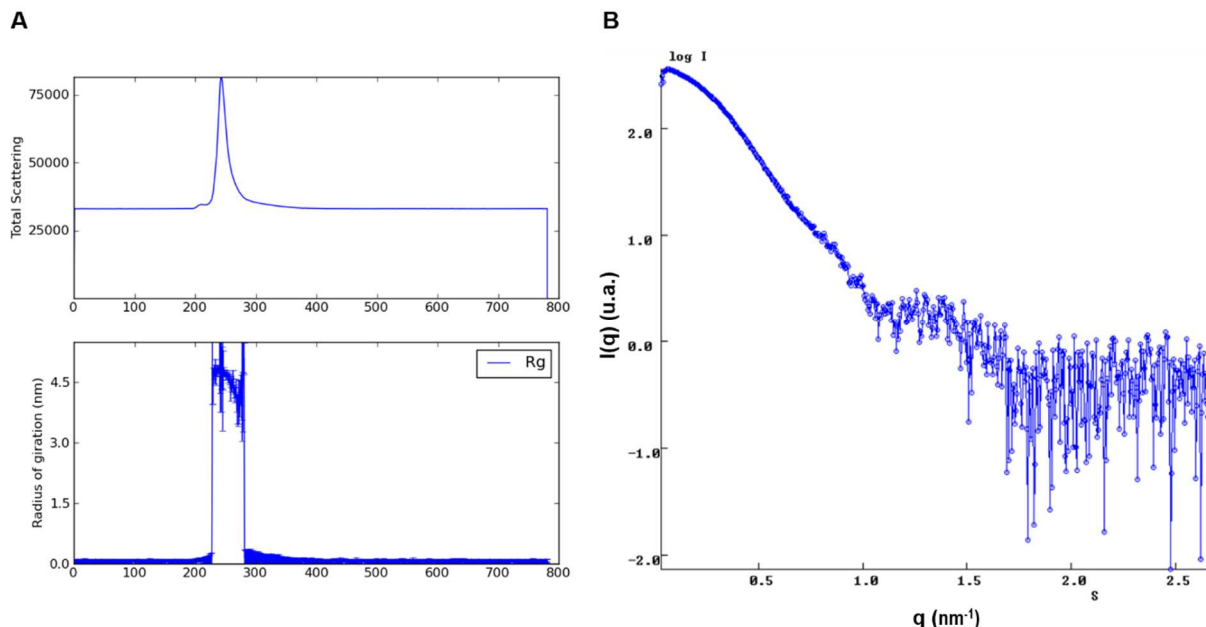


Figure 47 : Données de SAXS brutes. A/ Profil de diffusion correspondant au pic d'élution de chromatographie d'exclusion de taille réalisée en amont de la cellule de mesure de diffusion des rayons-X aux petits angles. Le programme de la ligne (ISPyB) estime le R_g à partir des données de diffusion correspondant au pic d'élution. B/ Données brutes de diffusion des rayons-X aux petits angles.

Le rayon de giration (R_g), estimé par le programme de la ligne (ISPyB) au niveau des données SAXS correspondant au pic (Figure 47.A), est constant et atteste d'une bonne qualité de l'échantillon. Les données de diffusion (Figure 47.B) ont été analysées grâce à la suite de programme ATSAS (Konarev et al., 2006; Petoukhov et al., 2007, 2012) incluant le programme PRIMUS (Konarev et al., 2003) permettant l'analyse et le traitement des données et le programme GNOM (Svergun, 1992) permettant le calcul de la fonction de distribution des distances $P(r)$. Le rayon de giration du complexe (4,97 nm) est estimé par l'analyse de Guinier et le $D_{\max}$ (14,3 nm) est déterminé à partir de la fonction de distribution des distances $P(r)$ (Figure 48.A). La $P(r)$ a fourni aussi une valeur du R_g similaire à celle obtenue par l'analyse de Guinier.

Si l'utilisation de la colonne de chromatographie d'exclusion de taille permet d'optimiser l'homogénéité de l'échantillon, elle rend difficile l'obtention d'une estimation valable de la masse moléculaire. En effet, le calcul de la masse moléculaire se base sur l'intensité de lumière diffusée $I(0)$ par l'échantillon en comparaison avec celle de la BSA (Bovin Serum Albumine). L'intensité $I(0)$ est liée au nombre de particules diffusantes par unité de volume et au volume de la particule. Or, lors d'une mesure avec le système HPLC, la diffusion du rayonnement-X est enregistrée au niveau du pic d'élution. Les mesures de diffusion correspondant au sommet du pic sont utilisées pour traiter les données mais cela implique une variation de la concentration en particules et de l'intensité diffusée rendant l'estimation de la masse moléculaire difficile. Pour contourner ce problème, une nouvelle méthode décrite dans Rambo and Tainer, 2013 a été appliquée pour estimer la masse moléculaire. Cette méthode repose sur un paramètre invariable issu des intensités diffusées, appelé V_c (volume correlation), qui est spécifique de l'état structural de la particule mais indépendant de sa concentration. La masse moléculaire calculée par cette

méthode est de 290 kDa ce qui correspond à la masse attendue pour le dimère de PACter-PB1 Δ Cter (2 x 142 kDa).

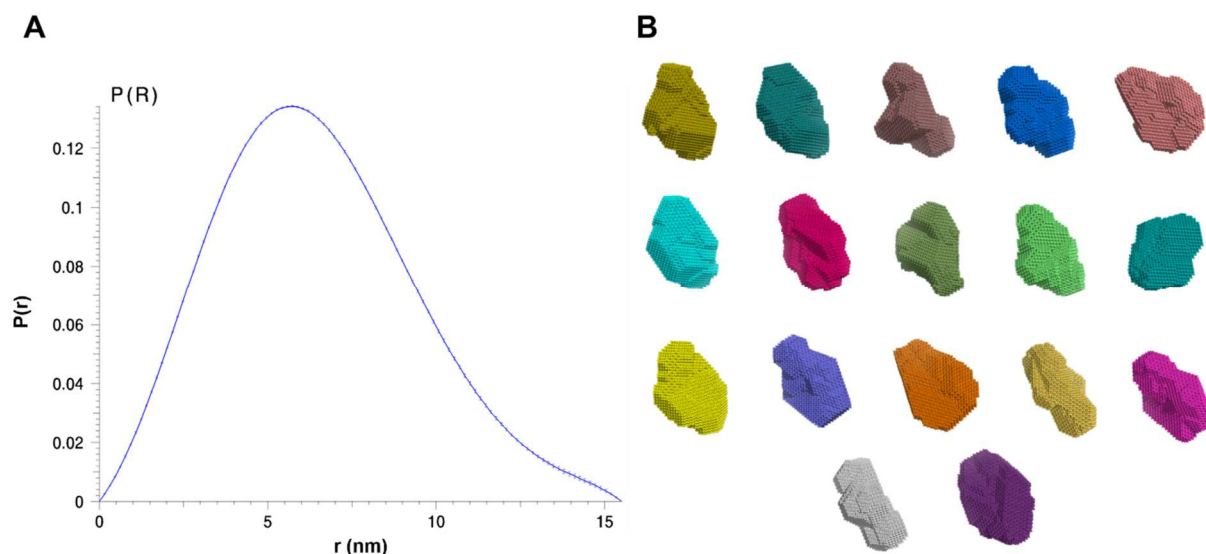


Figure 48 : Fonction de la distribution des distances et modèles *ab initio* générés à partir des données SAXS. A/ Distribution des distances intraparticules. **B/** Galerie des modèles *ab initio* à basse résolution générés par le programme DAMMIF avec une symétrie P2 imposée.

20 modèles *ab initio* ont été réalisés grâce au programme DAMMIF (Franke and Svergun, 2009). PACter-PB1 Δ Cter se comportant comme un dimère en solution, une symétrie d'ordre 2 a été imposée lors du calcul des modèles *ab initio* (Figure 48.B). Les modèles *ab initio* obtenus partagent la même forme globale.

Le χ^2 obtenu pour chaque modèle varie entre 0,919 et 0.930 témoignant d'une bonne adéquation des courbes expérimentales et des modèles générés. La forme moyenne a été calculée en utilisant le programme DAMAVER (Volkov and Svergun, 2003). L'enveloppe finale a enfin été affinée par le programme DAMMIN (Svergun, 1999) à partir du fichier *damstart* généré par DAMAVER. Le volume de l'enveloppe est, quant à lui, évalué par DAMMIF à 680000 Å³.

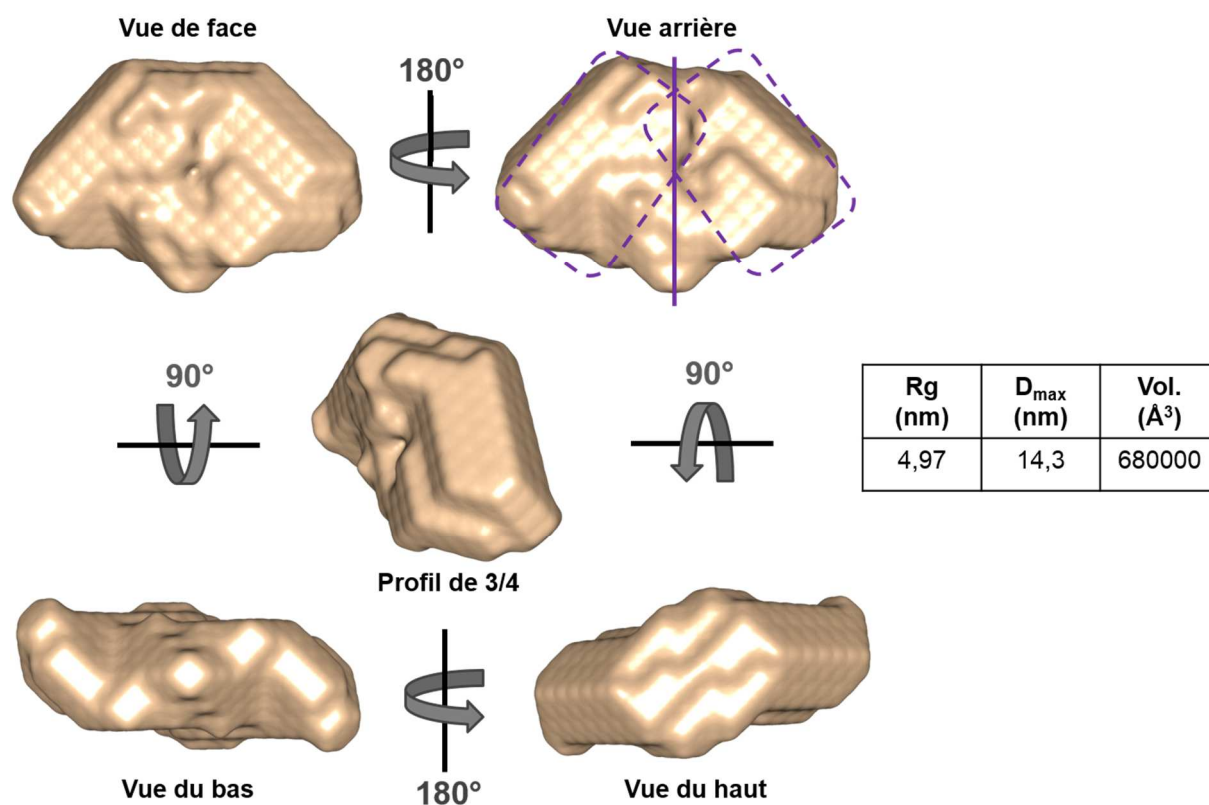
4.2.1.C ENVELOPPE SAXS DE PACter-PB1 Δ CTER

Figure 49 : Enveloppe SAXS à basse résolution du dimère de PACter-PB1 Δ CTer. L'axe de symétrie est représenté en violet et le positionnement des complexes PACter-PB1 Δ CTer est matérialisé par un rectangle violet en pointillés. Le rayon de giration en nm (Rg), la dimension maximale en nm (D_{max}) et le volume en Å³ (Vol.) sont indiqués dans le tableau à droite.

L'enveloppe SAXS obtenue adopte une forme trapézoïdale (Figure 49). L'axe de symétrie d'ordre 2 imposé traverse la structure dans sa largeur. Les deux structures séparées par cet axe semblent légèrement inclinées l'une par rapport à l'autre. L'enveloppe sera comparée à la structure cristallographique qui est en cours de résolution.

4.2.2 ETUDE PAR CRISTALLOGRAPHIE RAYONS-X DE PACter-PB1 Δ Cter

4.2.2.A PRINCIPE DE LA CRISTALLOGENESE

L'obtention de la structure tri-dimensionnelle d'une protéine par la méthode de diffraction des rayons-X peut se résumer à six grandes étapes : la cristallogénèse, la diffraction des cristaux obtenus, le traitement des données de diffraction, le phasage indispensable à la résolution de la structure, la construction du modèle, son affinement et sa validation.

La cristallogénèse consiste à obtenir la macromolécule protéique sous une forme cristalline. L'état cristallin se définit par un haut degré d'agencement de son organisation interne. Par définition, un cristal est un solide dont les constituants sont assemblés de manière régulière par empilement périodique dans l'espace d'un grand nombre de motifs composés d'atomes ou de molécules. Le processus de cristallisation d'une protéine est une entreprise délicate et complexe. Le processus de cristallisation peut être décrit par le diagramme de phase (Figure 50.A). La cristallisation implique la modification des conditions dans lesquelles se trouve la protéine pour qu'elle atteigne un point de sursaturation. Ce point représente un état métastable à la frontière entre l'état soluble et l'état précipité de la protéine dans lequel sa concentration est supérieure à sa solubilité. A ce niveau, la nucléation (point de départ de la cristallisation) peut intervenir. Elle correspond à des amas moléculaires pouvant donner naissance au cristal. La croissance cristalline fait suite à la nucléation pour permettre l'augmentation de la taille des cristaux.

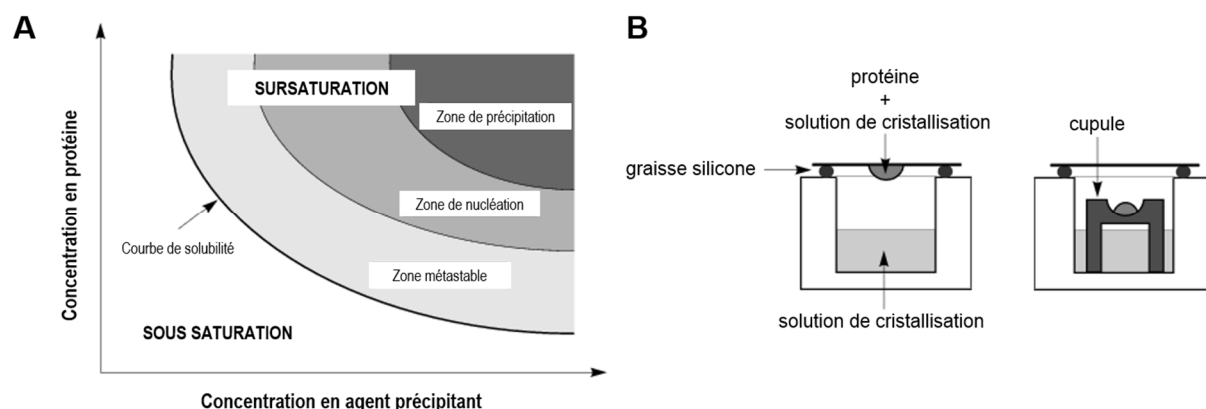


Figure 50 : Principe de cristallisation d'une protéine. A/ Diagramme de phase. Initialement, la protéine est présente sous forme soluble dans la zone de sous saturation. Lorsque la concentration en protéine augmente, elle dépasse la courbe de solubilité pour atteindre la zone de sursaturation dans laquelle peut se produire la nucléation qui peut conduire à l'apparition de cristaux. **B/** Technique de la diffusion de vapeur. Dans la technique de la goutte suspendue (à gauche), la goutte d'un mélange d'une solution de protéine et d'une solution de cristallisation est déposée sur une lamelle avant d'être placée au-dessus du réservoir contenant la solution de cristallisation. La graisse silicone assure l'étanchéité de l'ensemble. Dans la technique de la goutte assise, la goutte repose dans une cupule présente dans le réservoir. L'étanchéité est également assurée par de la graisse silicone sur laquelle est déposée une lamelle.

Différentes techniques existent pour initier un processus de cristallisation. La plus couramment utilisée est la technique de diffusion de vapeur (Figure 50.B). Elle consiste à placer une goutte d'un mélange d'une solution de protéine et d'une solution de cristallisation dans une enceinte étanche, au-dessus d'un réservoir contenant uniquement la solution de cristallisation dans un volume plus important. L'eau et les solvants éventuels vont diffuser entre la goutte et le réservoir jusqu'à l'équilibre. Grâce à ce phénomène, la protéine va se concentrer progressivement jusqu'à potentiellement atteindre la zone de sursaturation. Lors de la cristallisation de PACterPB1 Δ Cter, la technique de la goutte suspendue a été principalement utilisée.

La recherche de conditions de cristallisation peut s'avérer être un travail long et fastidieux qui fait intervenir de nombreux paramètres empiriques. Les différentes stratégies qui ont été adoptées sont décrites dans la suite du manuscrit.

4.2.2.B CRISTALLOGENESE INITIALE AVEC ET SANS ARN

In vivo, l'ARN-polymérase et l'ARN sont étroitement liés dans le contexte de la RNP et présentent une très forte affinité l'un pour l'autre. Lors des essais de cristallogénèse, le traitement d'une protéine pour lui fournir un environnement qui la maintient dans une conformation la plus stable possible est essentiel. Cette stabilité fait partie des trois facteurs primordiaux avec la solubilité et l'homogénéité de l'échantillon, directement corrélés à la probabilité d'une macromolécule à s'agencer de façon régulière dans l'espace et ainsi, à former des cristaux. Dans le cas de l'ARN-polymérase, l'ARN est susceptible de jouer un rôle stabilisateur. Les conditions de stabilité en présence d'ARN ont été testées par une expérience de stabilité thermique (TSA, Thermal Shift Assay). Les résultats du test de stabilité ont permis de sélectionner l'ARN apportant le plus haut degré de stabilité à l'ARN-polymérase tronquée.

Le principe du TSA repose sur la détection de l'état de repliement d'une protéine par une sonde hydrophobe fluorescente (Ericsson et al., 2006). La sonde n'est pas fluorescente en solution aqueuse. Par contre, elle fluoresce lorsqu'elle se fixe aux séquences hydrophobes d'une protéine, quand elle est dépliée. Lors d'un test de TSA, la température augmente progressivement provoquant le dépliement de la protéine et donc l'exposition du cœur hydrophobe permettant la fixation de la sonde. La fixation provoque une augmentation de la fluorescence. Une courte transition entre l'état replié et l'état déplié est observée. La température de fusion, T_m (melting temperature) est définie comme le point à mi-parcours de cette température de transition. L'augmentation de la fluorescence lors de cette transition se matérialise par des courbes appelées courbes de dissociation.

L'expérience de TSA a été menée avec des ARN de différentes tailles incluant tout ou partie de l'extrémité 5' conservée des ARNv (5' ARN) (Figure 51). La construction PACter-PB1 Δ Cter ne possède pas la partie N-terminale de PB2. En absence de cette région, aucune affinité pour l'extrémité 3' n'a été détectée lors des mesures qui ont été réalisées (cf. § 5.3, p 118). C'est pour cette raison que l'extrémité 3' n'a pas été retenue pour les essais de stabilisation et de cristallisation. Le choix concernant la taille des ARN s'est limité à des ARN de courtes longueurs, comprenant seulement l'extrémité 5' conservée, pour favoriser une fixation complète du segment d'ARN et éviter que des parties d'ARN restent libres et flexibles.

A	5' (10nt)	D	5' (14 nt)
	5' AGUAGAAACA 3'		5' AGUAGAAACAAGGG 3'
B	5' (11 nt)	E	5' (16 nt)
	5' AGUAGAAACAA 3'		5' AGUAGAAACAAGGGUA 3'
C	5' (12 nt)	F	3' (16 nt)
	5' AGUAGAAACAAG 3'		5' AUACCCUGCUUUUGCU 3'

Figure 51 : Séquences des molécules d'ARN utilisées lors du test de stabilité thermique. Les résidus appartenant à la région 5' conservée U13 apparaissent en vert alors que les résidus appartenant à l'extrémité 3' conservée U12 apparaissent en rouge.

Les mélanges protéine / ARN ont été effectués à 4 °C dans des plaques 96 puits. La sonde hydrophobe fluorescente a été ajoutée juste avant d'insérer la plaque dans le système RT-PCR permettant la montée en température et la détection de la fluorescence. Les mesures ont été réalisées sur un intervalle de température allant de 24 à 85 °C (Figure 52).

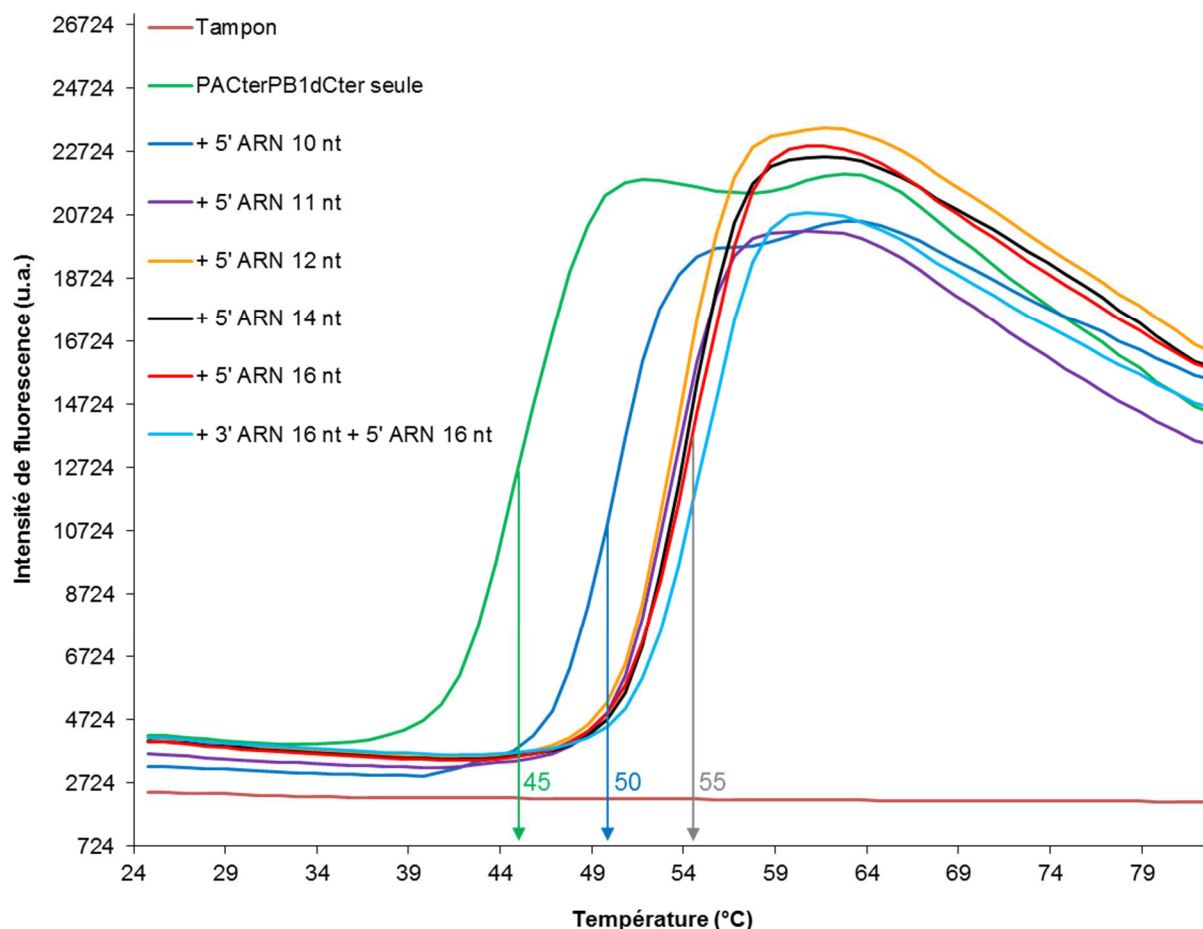


Figure 52 : L'extrémité 5' conservée de l'ARNv stabilise PACter-PB1 Δ Cter. Les tests de stabilité thermique ont été réalisés avec des ARN de différentes tailles incluant tout ou partie de l'extrémité 5' conservée des ARNv. La courbe de stabilité thermique de la protéine PACter-PB1 Δ Cter seule sans ARN est représentée par la courbe verte. Le tampon mélangé à la sonde est utilisé comme condition contrôle (courbe grise).

Par comparaison avec le T_m (45°C) observé pour la protéine seule (Figure 52, courbe et flèche vertes) l'expérience de TSA montre que les ARN 5' ayant une taille comprise entre 11 et 16 nt stabilisent la construction PACter-PB1 Δ Cter de manière identique (T_m = 55°C, Figure 52, flèche grise). L'ARN 5' de 10 nt stabilise moins la construction que ces derniers (T_m = 50°C, Figure 52, courbe et flèche bleues). Ce résultat n'est pas surprenant puisque des études ont montré que les 11 premiers nucléotides en 5' étaient nécessaires pour que l'ARN soit fixé spécifiquement par l'ARN-polymérase (Lee et al., 2002). Il est donc possible que l'ARN 5' de 10 nt présente un défaut de fixation à l'ARN-polymérase qui pourrait être à l'origine de la moins bonne stabilisation observée. Les résultats observés en termes de stabilité thermique en présence d'un ARN inférieur à 10 nt de long sont donc en accord avec les données d'affinités déjà établies. L'ajout de l'ARN 3' de 16 nt en combinaison avec l'ARN 5' de longueur équivalente n'a aucune influence sur la stabilité thermique de la construction. Aucun effet n'est davantage observé après l'ajout de l'ARN 3' seul (non montré) ou d'un ARN quelconque poly-UC. L'ARN 5' de 12 nt a été retenu pour les tests de cristallisation car il fait partie des ARN les plus courts ayant un effet stabilisant.

La valeur de 45 °C obtenue pour le T_m de PACter-PB1 Δ Cter seule est assez faible. Il est généralement admis que la probabilité de cristallisation est maximisée si la température d'incubation des essais de cristallisation est au moins 25 °C en-dessous de la valeur de T_m calculée (Dupeux et al., 2011). Le T_m de la protéine seule suggère donc de réaliser les essais de cristallisation à 4 °C.

Initialement, 1728 conditions de cristallisation avec et sans ARN ont été testées à 4°C et à 20°C grâce à un robot de cristallisation haut-débit disponible au sein du PSB de Grenoble (HTX, EMBL Grenoble). L'automate a réalisé des gouttes assises de 200 nL (100 nL d'échantillon + 100 nL de tampon de cristallisation) disposées dans des plaques 96 puits spécifiques. Dans la condition avec ARN, l'ARN 5' (12 nt) est ajouté directement dans l'échantillon dans un ratio protéine:ARN 1:1,2 quelques heures avant la réalisation des gouttes. Ce criblage préliminaire a permis d'isoler plusieurs conditions de cristallisation ayant fourni des cristaux (Figure 53). Le criblage à 20°C a fourni moins de cristaux que celui à 4°C témoignant d'une meilleure croissance cristalline à faible température. Les essais de cristallisation se sont donc poursuivis à 4°C. Les cristaux obtenus avec et sans ARN présentent des formes cristallines différentes. Les conditions sans ARN fournissent des cristaux isolés les uns des autres en forme de cylindres à facettes de différentes tailles (Figure 53.A). L'ajout d'ARN provoque une modification de la croissance cristalline et de la forme du cristal. Les cristaux avec ARN apparaissent sous forme de cubes déformés et maclés (Figure 53.B).

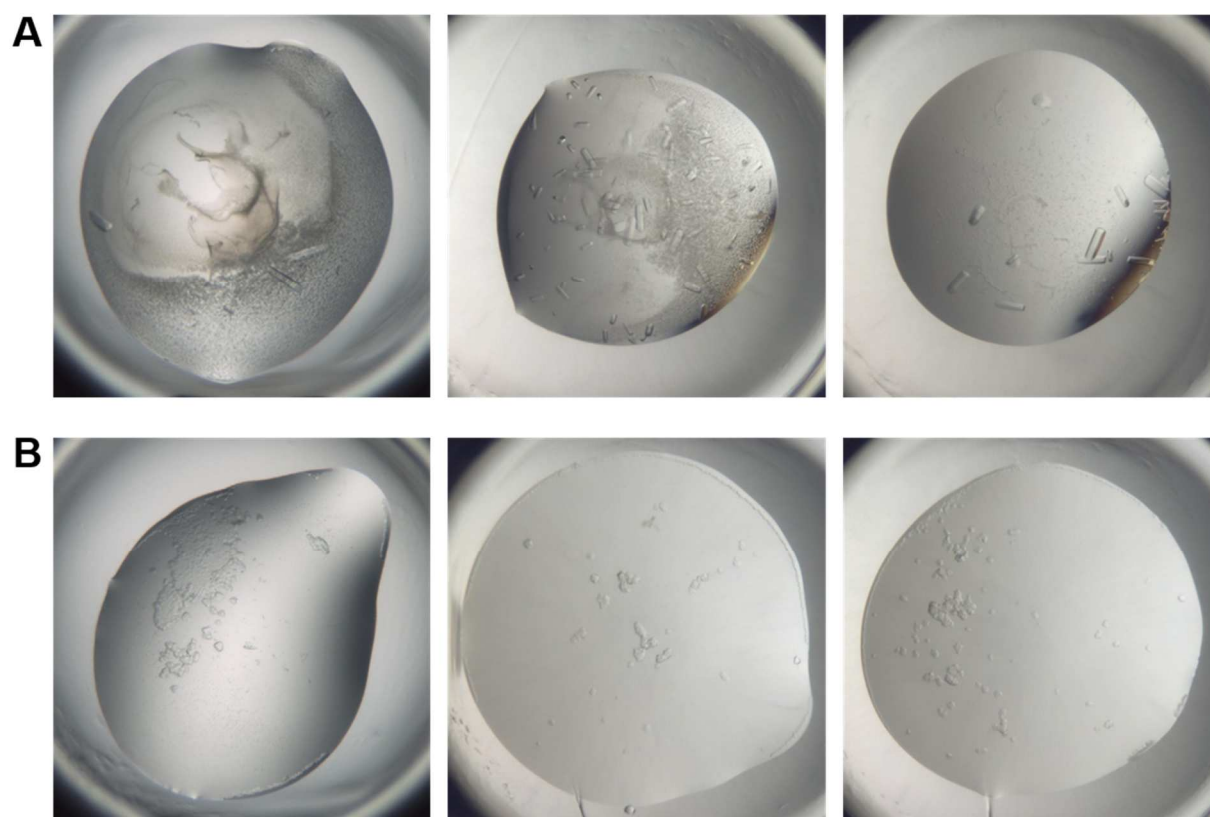


Figure 53 : Cristaux de PACter-PB1 Δ Cter initiaux obtenus à 4 °C par criblage haut-débit grâce à un robot de cristallisation. A/ Cristaux de PACter-PB1 Δ Cter obtenus sans ARN. B/ Cristaux de PACter-PB1 Δ Cter obtenus en présence d'ARN.

4.2.2.C PRODUCTION DES CRISTAUX DE PACter-PB1 Δ Cter

Les conditions de cristallisation pour lesquelles des cristaux ont été obtenus partagent des éléments de composition communs. Elles se composent toutes de polyéthylène glycol (PEG) de haut poids moléculaire (6000 Da le plus souvent) et d'un pH supérieur à 6. Les cristaux ont été reproduits dans des gouttes réalisées à la main et dans des conditions de cristallisation criblant différentes concentration en PEG, des PEG de masses moléculaires différentes comprises entre 200 et 6000 Da et différents pH. Ce criblage a permis d'isoler une condition de cristallisation dont la composition est la suivante : Tris pH 8,5 ; 12,5 % PEG 6000. En absence d'ARN, cette condition fournit des cristaux en cylindre de section hexagonale isolés et bien définis (taille = 500 x 100 x 100 μ M) (Figure 54.A). Les cristaux se forment en 3 à 4 jours à 4°C. Comme lors du criblage haut-débit, l'ajout d'ARN entraîne une croissance cristalline

totale différente conduisant à la formation de formes cubiques généralement maclées (taille = 150 x 150 x 150 μM) (Figure 54.B).

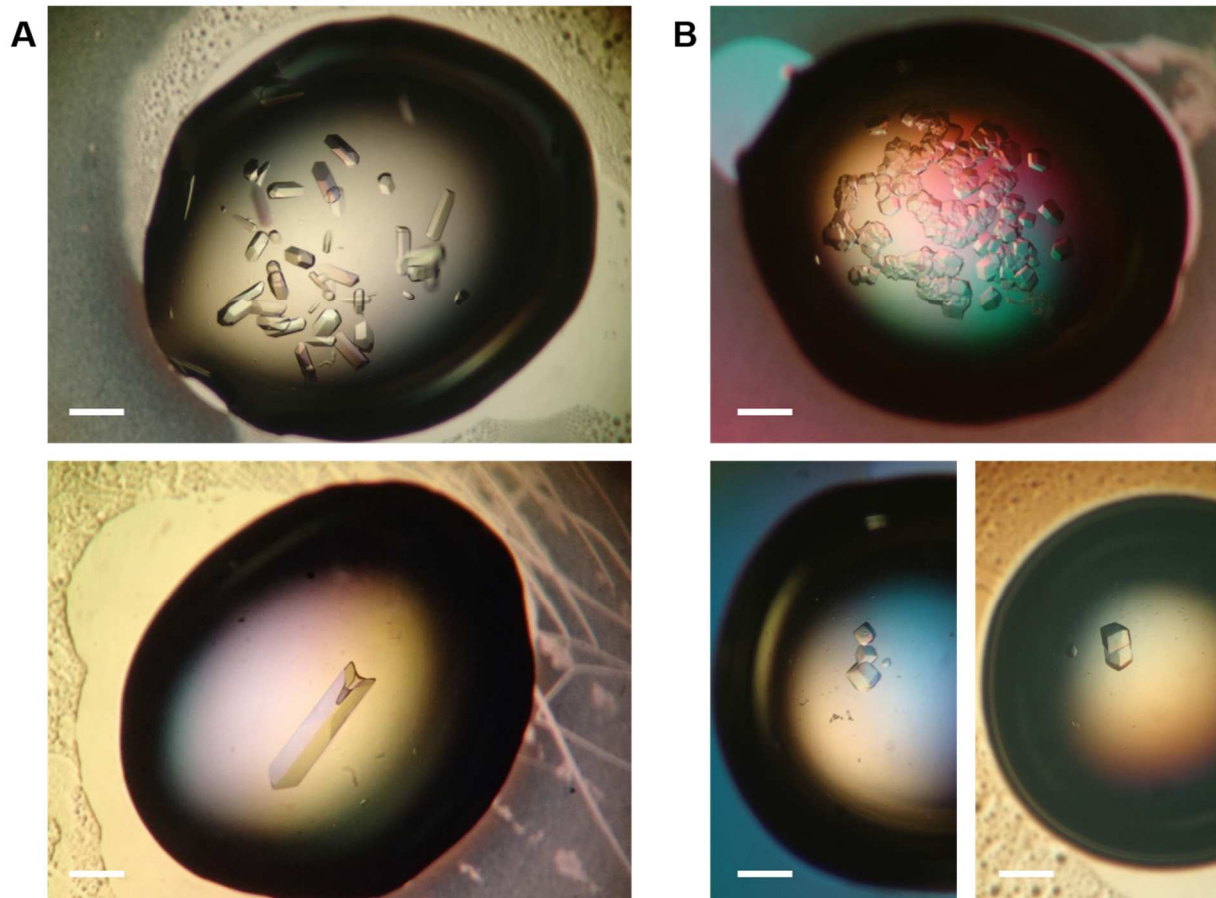


Figure 54 : Cristaux de PACter-PB1 Δ Cter. A/ Les cristaux de PACter-PB1 Δ Cter obtenus sans ARN se présentent sous forme de cylindriques hexagonaux. B/ Les cristaux de PACter-PB1 Δ Cter obtenus avec ARN 5' (12nt) se présentent sous forme de cubes maclés. La barre d'échelle correspond environ à 30 μm .

4.2.2.D VERIFICATION DE LA COMPOSITION DES CRISTAUX OBTENUS

La construction PACter-PB1 Δ Cter intègre la partie C-terminale de la sous-unité PA qui a déjà été cristallisée avec une construction très proche (He et al., 2008; Obayashi et al., 2008). Il était donc à craindre que les cristaux ne soient des cristaux, non pas du complexe PACter-PB1 Δ Cter mais de PACter uniquement. C'est pourquoi la composition des cristaux obtenus avec et sans ARN a été vérifiée sur gel (Figure 55). Comme attendu, après dissolution des cristaux, la protéine est retrouvée dans la composition de la goutte de cristallisation totale. Deux ou trois cristaux ont été lavés dans trois bains successifs de tampon issu du puits de la condition de cristallogénèse, pour éliminer la protéine précipitée pouvant éventuellement les entourer lors de leur sélection. Les cristaux ont ensuite été brisés à la main en présence de SDS et déposés sur gel 12 % polyacrylamide. Les bandes correspondant à chaque sous-unité sont retrouvées. Cela confirme la présence des deux sous-unités dans le cristal.

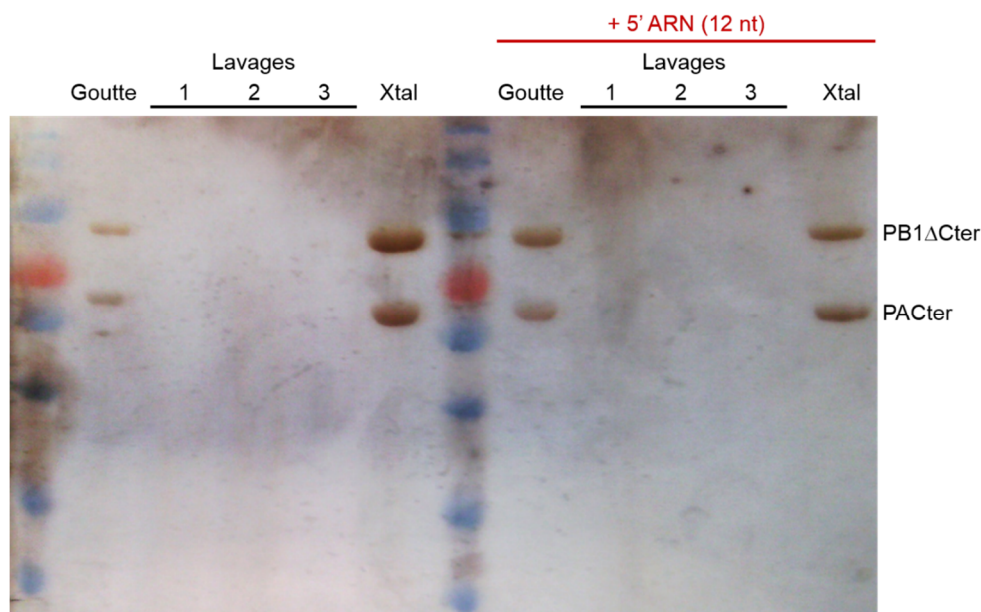


Figure 55 : Contrôle de la composition des cristaux obtenus sur gel de polyacrylamide. Les cristaux sont lavés par trois passages successifs dans trois gouttes de tampon issu du puits de la condition de cristallogénèse. La goutte de laquelle sont issus les cristaux (goutte), les gouttes ayant servi aux trois lavages (lavages 1, 2 et 3) et les cristaux (Xtal), après qu'ils ont été broyés manuellement, sont déposés sur gel SDS-PAGE 12 %. Le gel a été révélé par coloration au nitrate d'argent.

4.2.2.E DIFFRACTION INITIALE

Avant de les soumettre à un rayonnement-X, il est nécessaire de congeler les cristaux. En effet, l'enregistrement des données de diffraction se fait à très basse température (100 K). Dans ces conditions, la progression des radicaux libres provoqués par les rayons-X dans le cristal est bloquée, limitant ainsi les dommages causés par l'irradiation durant l'acquisition des données. La congélation des cristaux constitue une étape délicate qui peut entraîner la destruction du cristal par la formation de glace. Pour éviter la formation de glace, la congélation des cristaux s'effectue dans une solution cryoprotectrice dont le choix dépend de la condition de cristallisation et du cristal. Un agent cryo-protecteur adapté doit former une glace amorphe tout en préservant le pouvoir diffractant des cristaux. Les cristaux initiaux de PACter-PB1ΔCter ont été congelés après un passage dans une goutte de cryo-protecteur 30 % glycérol. Le PEG 400 a également été testé comme cryo-protecteur mais a conduit à une détérioration des cristaux.

Les cristaux obtenus avec ou sans ARN présentaient une diffraction à très faible résolution, de l'ordre de 30 Å. De la qualité de la structure cristalline dépend la qualité des données de diffraction. C'est pourquoi une série de stratégies a été adoptée dans le but d'améliorer la qualité des cristaux obtenus.

4.2.2.F STRATEGIE D'AMELIORATION DES CRISTAUX

Il n'est pas rare que les cristaux qui se forment soient de mauvaise qualité et ne conviennent pas pour obtenir des données de diffraction de qualité. Malgré de grandes avancées dans le domaine de la cristallographie des rayons-X (rayons-X puissants focalisés, criblage de conditions de cristallisation haut-débit, analyse automatique des données de diffraction...), la croissance cristalline demeure encore empirique et représente un fastidieux processus. Plusieurs stratégies ont été utilisées avant et après cristallisation pour tenter d'améliorer la qualité des cristaux obtenus (Figure 56).

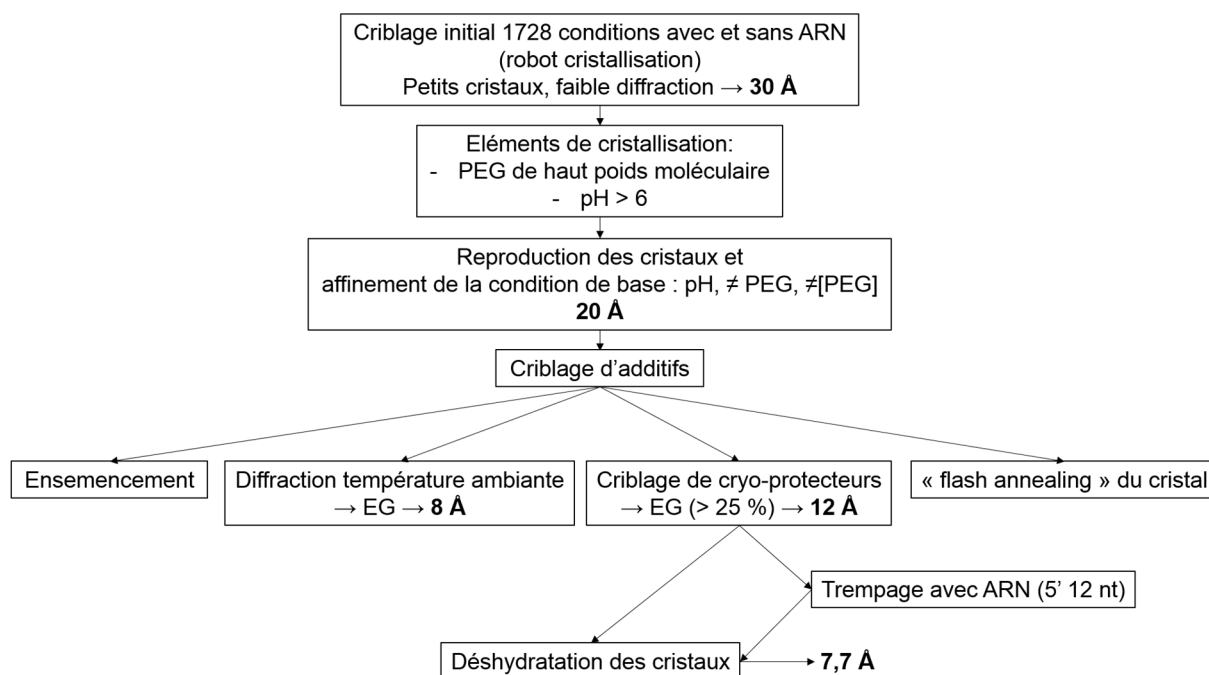


Figure 56 : Organigramme des stratégies suivies pour améliorer la qualité des cristaux. Les paliers de résolutions atteints à chaque étape sont indiqués en gras. EG : Ethylène Glycol.

■ *Criblage d'additifs*

Le criblage d'additifs a constitué le point de départ de la stratégie d'amélioration des cristaux. A partir de la condition de base qui a été déterminée précédemment (Tris pH 8,5 ; 12,5 % PEG 6000), un criblage d'additifs a été réalisé grâce à un kit commercial (Hampton). De nombreux cristaux ont été formés en présence de différents additifs et une partie des cristaux obtenus a été congelée dans le cryo-protectant utilisé initialement (30 % glycérol). Etonnamment, il a été impossible de reproduire le cliché de diffraction initial à 20 Å de résolution. De plus, des anneaux de diffraction caractéristiques de la glace apparaissaient systématiquement suggérant un problème au niveau de l'agent cryo-protecteur.

■ *Diffraction à température ambiante*

Pour s'assurer du pouvoir de diffraction des cristaux obtenus lors du criblage d'additifs, une expérience de diffraction a été menée à température ambiante. Pour cela, les cristaux ont été sélectionnés dans la goutte de cristallisation puis placés directement dans un capillaire dans lequel se trouvaient quelques microlitres de la solution de cristallisation. A température ambiante, une résolution de 8 Å a pu être atteinte et différents additifs améliorant la qualité des cristaux ont pu être isolés. Il a été constaté que différents sucres (tréhalose, sorbitol...) et ainsi que l'éthylène glycol (EG) amélioraient le pouvoir de diffraction des cristaux. Cependant, l'enregistrement des données de diffraction à température ambiante a entraîné une destruction rapide des cristaux excluant la possibilité d'une collecte de données complète.

■ *Ensemencement*

La technique d'ensemencement consiste à apporter dans la solution de cristallisation des fragments de cristaux qui ont été broyés. Ces fragments servent de matrice de croissance cristalline. Plusieurs conditions d'ensemencement ont été criblées et différents cristaux avec et sans ARN ont été utilisés pour ensemercer des nouvelles conditions de cristallisation. Si la

croissance cristalline a été un succès après ensemencement, la qualité de diffraction des cristaux est, elle, restée médiocre.

- *Test de différents cryo-protecteurs*

Différents cryo-protecteurs incluant le glycérol, l'éthylène glycol, les polyéthylènes glycol de faible poids moléculaire (PEG 200 et 400) ont été testés. Si les PEG affectent grandement la structure du cristal, l'EG semble être le meilleur candidat en tant que solution cryoprotectrice. Utilisé à une concentration de 35 %, l'EG a permis d'obtenir une diffraction de l'ordre de 10 Å. Un nouvel affinement des conditions de cristallisation a aussi été initié avec de l'EG dans la solution de cristallisation.

- « *Flash annealing* »

Cette technique consiste à décongeler le cristal puis à le recongeler. Lors de la congélation initiale, la formation de cristaux de glace peut entraîner des contraintes au niveau de la maille cristalline. La décongélation peut permettre de faire disparaître ces contraintes et d'améliorer ainsi l'organisation de la maille cristalline. La décongélation a été effectuée directement sur la ligne (Figure 57) en bloquant le flux d'azote liquide quelques secondes jusqu'à ce que la goutte du cristal contenue dans la boucle soit partiellement (« flash annealing », Yeh and Hol, 1998) ou totalement décongelée (Harp et al., 1999).

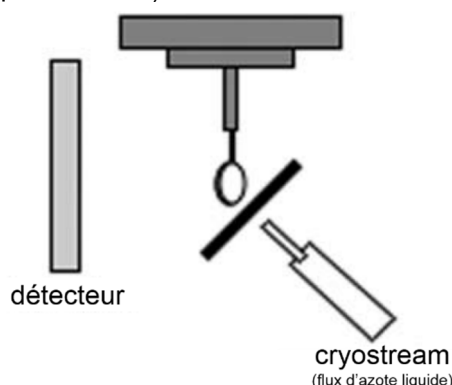


Figure 57 : Décongélation flash du cristal. Représentation schématique de la procédure de décongélation rapide suivie d'une recongélation du cristal. La décongélation se produit en bloquant le flux d'azote liquide (cryostream) durant quelques secondes pour décongeler partiellement ou complètement le cristal.

Le flux d'azote est ensuite immédiatement débloquent pour permettre la recongélation. Cette technique est très risquée pour le cristal et conduit souvent à l'endommager. Ce fut le cas pour les cristaux de PACter-PB1ΔCter qui ont subi de fortes détériorations.

- *Ajout d'ARN par trempage*

La présence d'ARN perturbe la croissance cristalline et conduit à l'obtention de cristaux maclés qui diffractent à faible résolution. Pour tenter d'inclure l'ARN dans les cristaux formés sans ARN, la méthode de trempage a été utilisée. Le trempage avec l'ARN consiste à mettre les cristaux déjà formés en contact avec les molécules d'ARN pour qu'elles puissent diffuser dans le cristal et se fixer au niveau de leurs sites de fixation sur les protéines cristallisées. La stratégie adoptée consiste à placer de l'ARN à forte concentration directement dans la goutte de cristallisation. La forte concentration d'ARN permet d'ajouter le maximum d'ARN en un minimum de volume évitant ainsi de diluer trop fortement la goutte et de modifier les conditions dans lesquelles se trouvent les cristaux. Dans le cas où la fixation de l'ARN sur la protéine cristallisée se produit, elle peut

avoir plusieurs effets et présente autant de risques pour la structure du cristal qu'elle peut avoir d'avantages. En effet, la fixation des ARN sur les protéines au sein du cristal peut entraîner des changements conformationnels qui vont rompre l'organisation cristalline conduisant à la disparition du cristal. A l'inverse, ces changements structuraux peuvent être bénéfiques en améliorant la structure cristalline. Le temps de trempage est une variable cruciale (Geremia et al., 2006) puisqu'il doit permettre la diffusion saturante des molécules d'ARN pour obtenir un échantillon homogène. L'affinité entre l'ARN-polymérase et l'ARN 5' étant très forte (cf. § 5.3, p 118), un trempage de 24 h a été jugé suffisant. Visuellement, aucun dommage sur le cristal n'a été observé durant le trempage.

▪ *Déshydratation des cristaux obtenus*

L'eau joue un rôle crucial dans le maintien de la structure et de l'activité des protéines à la fois en solution et dans les formes cristallines (Frey, 1994; Timasheff, 1995). Les cristallographes ont depuis longtemps étudié en détails les transformations médiées par l'eau dans les cristaux de protéines. Il est connu que la réduction du contenu en solvant peut permettre d'obtenir une organisation du cristal plus serrée et mieux ordonnée permettant l'amélioration du pouvoir de diffraction du cristal. En effet, la déshydratation des cristaux fait partie des traitements produisant les meilleures améliorations de la résolution des profils de diffraction (Abergel, 2004; Heras et al., 2003; Yap et al., 2007). Plusieurs protocoles ont été développés pour la déshydratation des cristaux (Heras and Martin, 2005).

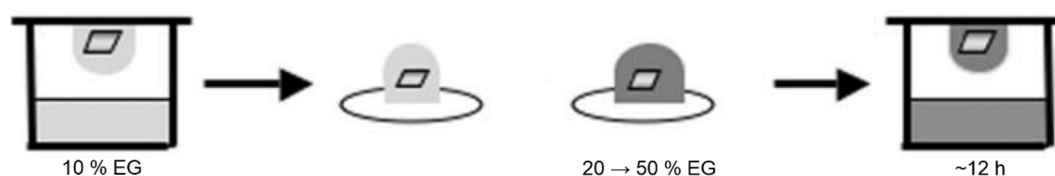


Figure 58 : Méthode de déshydratation cristalline adoptée. Le cristal de la goutte de cristallisation est transféré en série dans des gouttes de 3 μ L de solution de déshydratation de concentration croissante qui sont ensuite équilibrées contre un réservoir contenant la même solution de déshydratation. Dans cet exemple, l'éthylène glycol (EG) est utilisé comme agent de déshydratation. A une concentration supérieure à 25 %, l'effet cryo-protecteur de l'EG permet de congeler directement le cristal à l'issue du processus de déshydratation.

La méthode qui a été adoptée est la suivante : elle consiste à transférer en série le cristal de la goutte de cristallisation dans des gouttes de solution de déshydratation (3 μ L) de concentration croissante en cryo-protecteur par palier de 2 % (Figure 58). A chaque palier, les gouttes de déshydratation sont équilibrées contre un réservoir contenant la même solution de déshydratation pendant environ 12 h avant le transfert des cristaux dans la solution de déshydratation suivante de plus haute concentration en cryo-protecteur. D'après les résultats de diffraction précédents, le choix du cryo-protecteur s'est porté sur l'éthylène glycol (EG). L'effet déshydratant d'un cryo-protecteur tel que l'EG se justifie par le fait qu'un des mécanismes de cryo-protection est de réduire la solvation de protéines. Ainsi, les cryo-protecteurs peuvent agir comme déshydratants et *vice versa* (Charron et al., 2002; Heras and Martin, 2005; Mi et al., 2004; Timasheff and Arakawa, 1988). Les cristaux obtenus sans ARN et après trempage avec ARN ont été soumis à une déshydratation progressive. Pour éviter la manipulation de cristaux et le risque de les fragiliser, la goutte de solution dans laquelle se trouvent les cristaux est aspirée grâce à un capillaire en verre et remplacée par une nouvelle goutte de solution à une concentration plus élevée en cryo-protectant. A l'issue de l'aspiration, une quantité de solution suffisante est laissée

pour enrober le cristal de sorte qu'il ne soit pas en contact direct avec l'air ambiant avant l'ajout de la solution de déshydratation suivante.

Des essais supplémentaires de déshydratation ont été menés sur la ligne BM14 équipée d'un système de contrôle de l'humidité pour la déshydratation d'un cristal directement positionné sur la ligne de lumière. Ce système permet de placer le cristal dans un environnement dont l'humidité peut être modifiée permettant la déshydratation progressive des cristaux avant leur congélation. Avant l'étape de congélation, la diffraction peut être testée à différents paliers de déshydratation. Ce type de déshydratation n'a pas convenu aux cristaux et la diffraction n'a pas été améliorée.

4.2.2.G ACQUISITION DES DONNEES

L'interaction des rayons-X avec les électrons de la matière provoque des changements de leurs niveaux énergétiques par absorption du rayonnement conduisant à la diffusion secondaire des rayons-X dans toutes les directions de l'espace. Dans certaines directions, les rayons diffusés se renforcent alors que dans d'autres, ils s'atténuent par interférence. Les directions dans lesquelles les interférences sont constructives sont appelées « pics de diffraction ». Dans le cas d'un cristal, l'onde diffractée correspond à la somme des ondes diffusées par chacun des électrons compris dans l'entité élémentaire qui constitue la maille du cristal. Le cristal étant périodique, il constitue un ensemble de plans réticulaires sur lesquels le faisceau de rayons-X diffracte dans des directions privilégiées. La diffraction d'un réseau cristallin peut donc être assimilée à une réflexion du rayon incident sur des plans réticulaires (Figure 59), l'onde réfléchie étant constructive (non nulle) seulement pour les plans satisfaisant la loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = n \lambda$$

Où d est la distance entre deux plans du réseau, λ la longueur d'onde du rayon, n un nombre entier positif appelé « ordre de diffraction » et θ l'angle entre le rayon incident et le plan réticulaire.

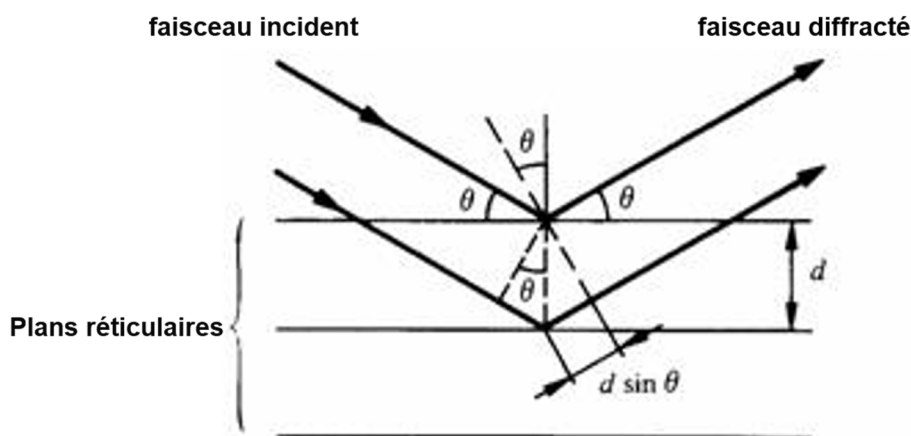


Figure 59 : Le cristal constitue un ensemble de plans réticulaires sur lesquels le faisceau de rayons-X se réfléchit. D'après la loi de Bragg, la différence de trajet parcouru par deux ondes qui se réfléchissent chacune sur des plans parallèles séparés par une distance d vaut $2d \sin \theta$. Cette différence de trajet doit être un multiple de la longueur d'onde pour que l'interférence soit constructive.

Le cliché de diffraction (Figure 60.B) est constitué de tâches définissant le réseau réciproque dont la maille a des dimensions inversement proportionnelles à celles du réseau direct. Comme pour un système d'optique, il existe un lien de réciprocité entre le cristal et son spectre de diffraction permettant de remonter du spectre de diffraction à une image de l'agencement des atomes dans le cristal. A partir du spectre de diffraction, il est en effet possible d'accéder à l'image de la densité électronique de la molécule par la transformée de Fourier inverse en utilisant les phases ainsi que les amplitudes de chaque réflexion. Si l'intensité des réflexions est mesurable, aucun outil n'est disponible pour mesurer directement les phases

des réflexions. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour les retrouver. La méthode du remplacement moléculaire à partir d'un modèle connu sera utilisée pour la résolution de la structure de PACter-PB1ΔCter.

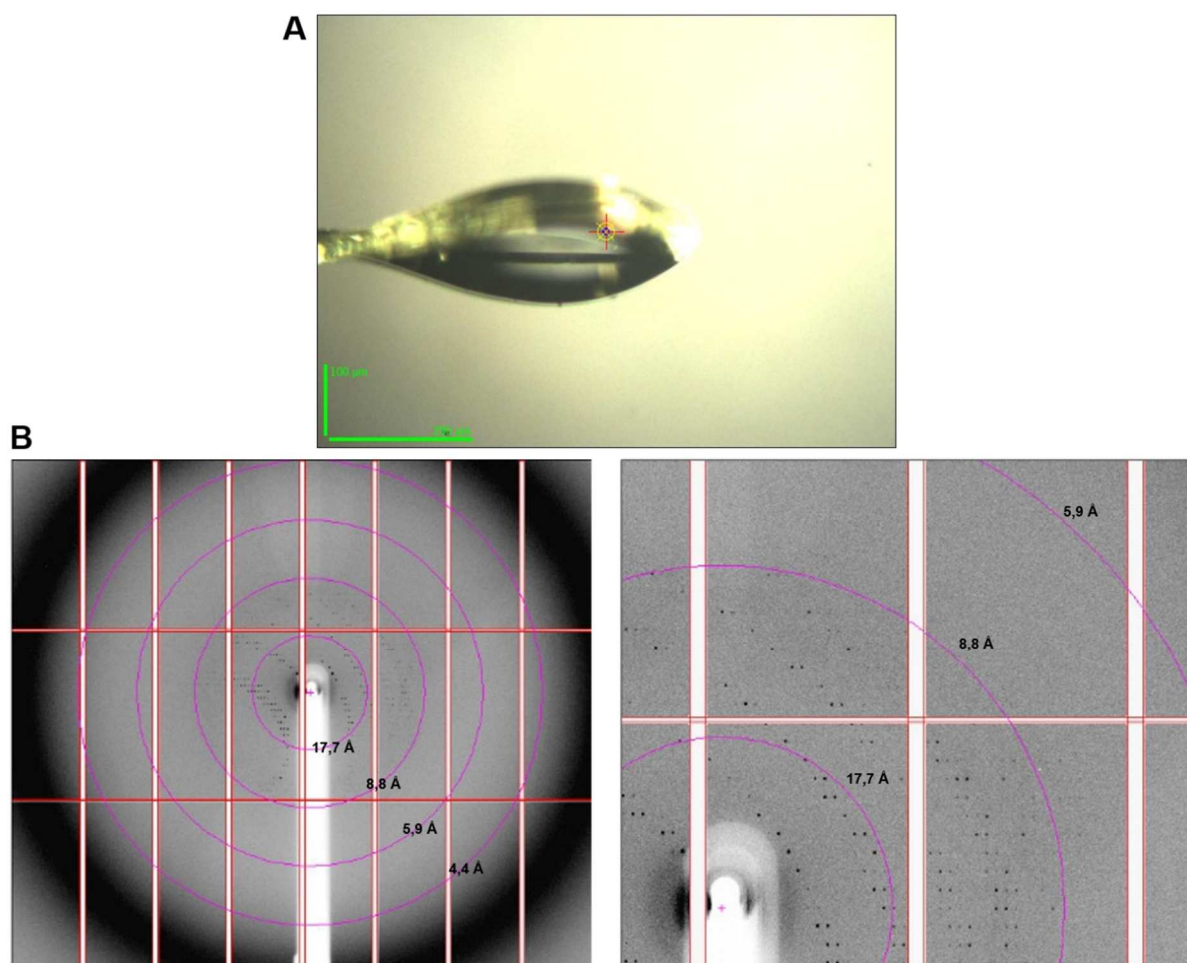


Figure 60 : Photo d'un cristal et cliché de diffraction associé. A/ Photo d'un cristal de PACter-PB1ΔCter dans une boucle prise sur la ligne ID23-2 à l'ESRF (Grenoble). La barre d'échelle verticale correspond à 100 µm et celle horizontale à 200 µm. B/ Cliché de diffraction d'un cristal de PACter-PB1ΔCter collecté à l'ESRF sur la ligne ID23-2. Les cercles correspondent aux seuils de résolution 17,7 ; 8,8 ; 5,9 et 4,4 Å.

Un jeu de données a finalement pu être collecté en utilisant le rayonnement synchrotron de l'ESRF (ligne ID23-2). Le cristal utilisé pour la collecte est issu de la condition de cristallisation suivante : 0,1 M Tris pH 8,5 ; 5 % PEG 6000 et 10 % EG. Ce cristal a subi une étape de trempage avec ARN durant 24 h et a été déshydraté par un transfert en série dans des solutions de la condition de cristallisation de concentration croissante en EG jusqu'à 35 %.

La figure ci-dessus présente un des clichés de diffraction (Figure 60.B) obtenu lors de l'exposition du cristal (Figure 60.A) ayant permis la collecte. L'ensemble des données de diffraction ont été traitées par l'utilisation d'outils informatiques, notamment les programmes *XDS* (Kabsch, 1993, 2010a, 2010b) et *MOSFLM* (Battye et al., 2011; Leslie, 1992, 2006). Les conditions d'acquisition et les données cristallographiques sont détaillées dans le Tableau 4. La qualité du jeu de données est évaluée par le facteur R_{merge} . Les données cristallographiques obtenues sont cohérentes avec les valeurs obtenues pour la dernière tranche de résolution. Malgré une faible résolution maximale (7,7 Å), un traitement des données est en cours.

Tableau 4 : Conditions d'acquisition et données cristallographiques. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux statistiques pour la dernière tranche de résolution.

Conditions d'acquisition	
Concentration	15 mg.mL ⁻¹
Ligne	ESRF ID 23.2
λ (Å)	0.8726
Détecteur	Pilatus 2M
Angle d'oscillation (°)	0.1
Distance (mm)	576.63
Nombre de clichés	640
Données cristallographiques	
Paramètres de maille	
a, b, c (Å)	349.2, 349.2, 166.4
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Groupe d'espace	P6
Résolution (Å)	50-7.7 (7.98 - 7.7)
R_{merge}	14.8 (116.8)
$I / \sigma I$	7.45 (1.19)
Réflexions uniques	13720 (1336)
Complétude (%)	98.7 (96)
Multiplicité	3.75 (3.9)

4.2.2.H STRUCTURE DE PACter-PB1 Δ CTer

Le traitement des données est en cours au moment de l'écriture du manuscrit. La méthode de remplacement moléculaire est mise en œuvre. Elle consiste à utiliser comme source de phases un modèle homologue. Ce modèle doit présenter au minimum 20 % d'identité de séquence avec la protéine étudiée. A partir de la carte de densité obtenue, il est possible de positionner chaque atome de la molécule afin de construire la structure tri-dimensionnelle. Les densités électroniques obtenues à 7,7 Å ne permettent cependant pas d'avoir ce degré de précision dans le positionnement atomique, seuls seront visibles les hélices- α et le tracé global de la protéine.

4.2.3 DISCUSSION ET CONCLUSION

Après toutes les stratégies qui ont été appliquées pour améliorer le pouvoir de diffraction des cristaux de PACter-PB1 Δ CTer, il semblerait que la limite de résolution du cristal ait été atteinte. Le calcul du coefficient de Matthew sur les données cristallographiques obtenues estime le pourcentage de solvant dans le cristal à plus de 85 %. Cette forte concentration en solvant est à l'origine du faible pouvoir de diffraction des cristaux. La structure apportera plus de précision sur l'organisation des molécules dans l'unité asymétrique. De plus, dans le cas où la dimérisation du complexe était conservée dans la structure cristalline, la structure pourrait indiquer les zones à l'origine de la dimérisation. L'ensemble de ces informations seront à prendre en compte pour la conception de futures constructions dédiées à l'étude cristallographique.

ETUDE FONCTIONNELLE

5.1	TEST D'ACTIVITE ENDONUCLEASE.....	102
5.2	TEST D'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN.....	104
5.2.1	LE PROFIL DE TRANSCRIPTION TYPE	105
5.2.2	CONTROLE DE L'ACTIVITE	106
5.2.2.A	ACTIVATION DE L'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN	106
5.2.2.B	INHIBITION DE L'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN	107
5.2.3	CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN	108
5.2.3.A	CRIBLAGE DU PH.....	108
5.2.3.B	CRIBLAGE DES SELS	109
5.2.3.C	CRIBLAGE DES TEMPERATURES.....	110
5.2.3.D	MANGANESE VERSUS MAGNESIUM	111
5.2.4	EFFET DE LA NUCLEOPROTEINE SUR L'ACTIVITE	113
5.2.5	ESSAIS DE QUANTIFICATION DE L'ACTIVITE	114
5.2.6	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	115
5.3	MESURES DES AFFINITES ARN-POLYMERASE:ARN	118
5.3.1	LES REGIONS PROMOTRICES DE L'ARNV	118
5.3.2	AFFINITES INITIALES OBTENUES PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	120
5.3.2.A	PRINCIPE	120
5.3.2.B	AFFINITES INITIALES POUR LES EXTREMITES CONSERVEES	121
5.3.2.C	IDENTIFICATION D'UNE REGION POUR LA FIXATION DE L'EXTREMITÉ 3'	122
5.3.2.D	CONCLUSION	122
5.3.3	AFFINITES OBTENUES PAR FILTER BINDING ASSAY (FBA)	123
5.3.3.A	PRINCIPE	123
5.3.3.B	CONFIRMATION DES AFFINITES POUR LES EXTREMITES CONSERVEES.....	124
5.3.3.C	CONFIRMATION DE L'IMPLICATION DE PB2NTER DANS LA FIXATION DE L'EXTREMITÉ 3'	126
5.3.3.D	AFFINITE POUR DES ARN « PANHANDLE »	126
5.3.4	DISCUSSION SUR LES AFFINITES.....	127

Dans le souci de garantir une pertinence biologique, les études fonctionnelles ont été menées en parallèle des études structurales avec le matériel biologique produit et purifié.

Avant d'entamer les résultats des études fonctionnelles, il convient de rappeler que l'ARN-polymérase grippale est une enzyme multifonctionnelle qui présente trois activités principales réparties sur les trois sous-unités qui la composent (Figure 23, p 34). L'ARN-polymérase tronquée PA-PB1-PB2Nter a constitué l'objet principal des études fonctionnelles. Cette construction comporte l'activité endonucléase sur PA et l'activité de synthèse d'ARN sur PB1. Tronquée au niveau de la partie C-terminale de PB2, elle n'inclut pas le domaine de fixation de la coiffe. Les deux activités présentes ont été investiguées.

5.1 TEST D'ACTIVITE ENDONUCLEASE

Pour initier la transcription et ajouter une coiffe à ses propres ARNm viraux, l'ARN-polymérase reconnaît spécifiquement, via PB2, le 7-méthyl-guanosine (^{7m}G) de la coiffe (^{7m}GpppN) située à l'extrémité 5' des pré-ARNm cellulaires. L'activité endonucléase présente sur PA, va ensuite cliver le pré-ARNm 10 à 13 nt après la coiffe. Il a été montré que l'activité endonucléase portée par l'ARN-polymérase était capable de cliver l'ARN de manière non spécifique et l'ADN simple brin à condition qu'il soit coiffé (Klumpp et al., 2000). Les tests d'activité réalisés avec le domaine endonucléase isolé, ont quant à eux révélé que l'enzyme était capable de cliver des ARN et ADN simple brin de manière non spécifique. L'efficacité de clivage est tout de même modulée par le type de substrat pour l'ARN-polymérase complète comme pour le domaine endonucléase isolé (Dias et al., 2009; Klumpp et al., 2000). Ce dernier montre une efficacité plus élevée pour des ARN simple brin non structurés (Dias et al., 2009). L'ARN-polymérase tronquée ne présente pas l'activité de fixation de la coiffe du fait de la troncation de PB2, mais possède l'activité endonucléase sur PA.

L'activité endonucléase a été testée avec l'ARN-polymérase tronquée sous sa forme dimérique et un ARN poly-uridine non spécifique (52 nt). Le substrat ARN est analysé sur gel d'urée 8M 15 % polyacrylamide après deux heures d'incubation à 37 °C (Figure 61). Les conditions de digestion utilisées correspondent à celles utilisées pour tester l'activité endonucléase de la partie N-terminale de PA isolée (Dias et al., 2009; Crepin et al., 2010). L'activité endonucléase de l'hétérotrimère tronqué a été montrée et est comparable à celle décrite pour le domaine N-terminale isolé (Figure 61, lignes 7 à 12). Cette activité est strictement manganèse dépendante (Figure 61, lignes 2 et 3). L'ARN semble totalement clivé par l'ARN-polymérase tronquée alors que le clivage par PA-Nter est partiel, suggérant une activité endonucléase plus performante de l'hétérotrimère tronqué (Crepin et al., 2010; Dias et al., 2009). Une activité plus forte avait aussi été observée pour PA entière (Noble et al., 2012).

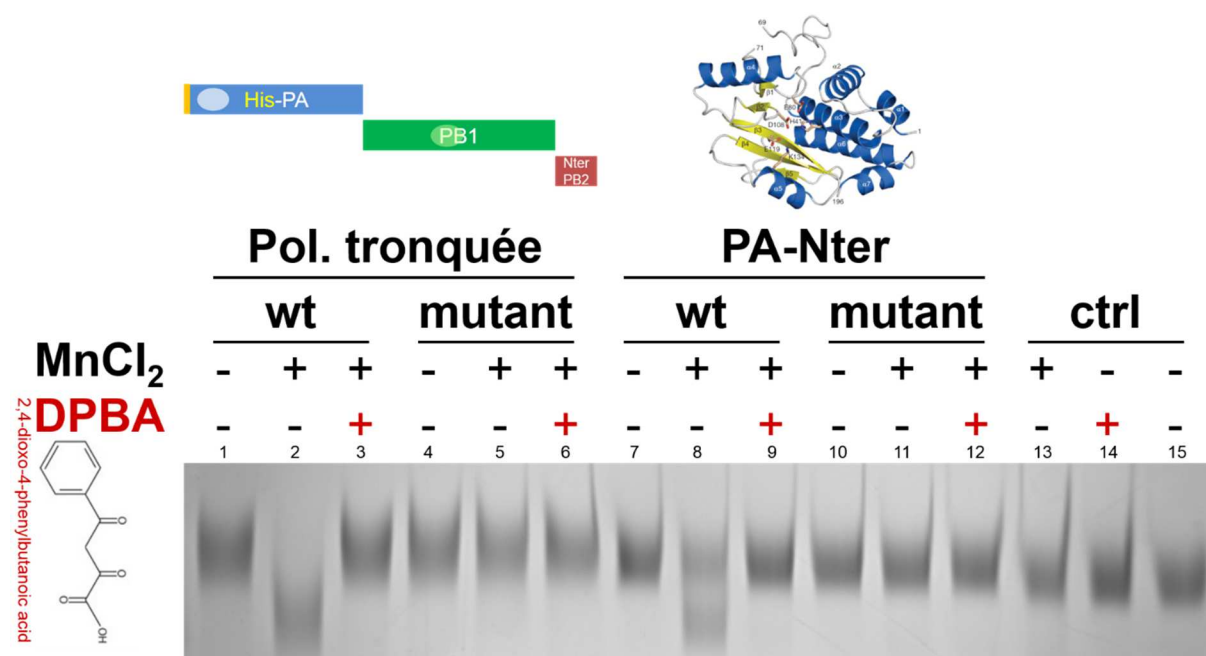


Figure 61 : Activité endonucléase manganèse-dépendante de l'ARN-polymérase tronquée. Un ARN poly-UC (52 nt) est incubé avec l'ARN-polymérase tronquée (Pol. Tronquée) sauvage (wt) ou mutante PA-E80A (mutant) ou avec le fragment N-terminal de PA (PA-Nter) sauvage (wt) ou mutant (mutant) pendant 2 h à 37 °C. Les réactions se déroulent en présence ou en absence de 0,5 mM MnCl₂. Les réactions sont inhibées par addition de DPBA. En contrôle, l'ARN est incubé avec du MnCl₂ ou avec du DPBA ou seul (ctrl). Les réactions ont été stoppées par l'ajout de 20 mM EGTA et les produits des réactions ont été déposés sur gel d'urée 8 M 15 % polyacrylamide et révélés par coloration au bleu de méthylène.

L'activité de clivage peut être contrôlée grâce à un inhibiteur (**DPBA**, Figure 61, ligne 3) ou complètement éteinte en utilisant une construction mutante de l'hétérotrimère (PA-E80A) déficiente pour l'activité endonucléase (Figure 61, lignes 5). Le DPBA (2,4-dioxo-4-phenylbutanoic acid) est un inhibiteur connu de l'activité endonucléase du virus influenza (Tomassini et al., 1994). Le DPBA établit des interactions avec les deux ions du site catalytique endonucléase (Figure 62) (Kowalinski et al., 2012). Dias et al. ont montré que l'activité endonucléase *in vitro* était inhibée par le DPBA de manière dose-dépendante. La concentration de DPBA utilisée dans l'expérience (2 mM) a été déterminée en vue d'éteindre totalement l'activité endonucléase. Comme pour le domaine PA-Nter isolé, la mutation E80A au niveau du site endonucléase sur la sous-unité PA de l'ARN-polymérase tronquée, supprime toute activité de dégradation d'ARN.

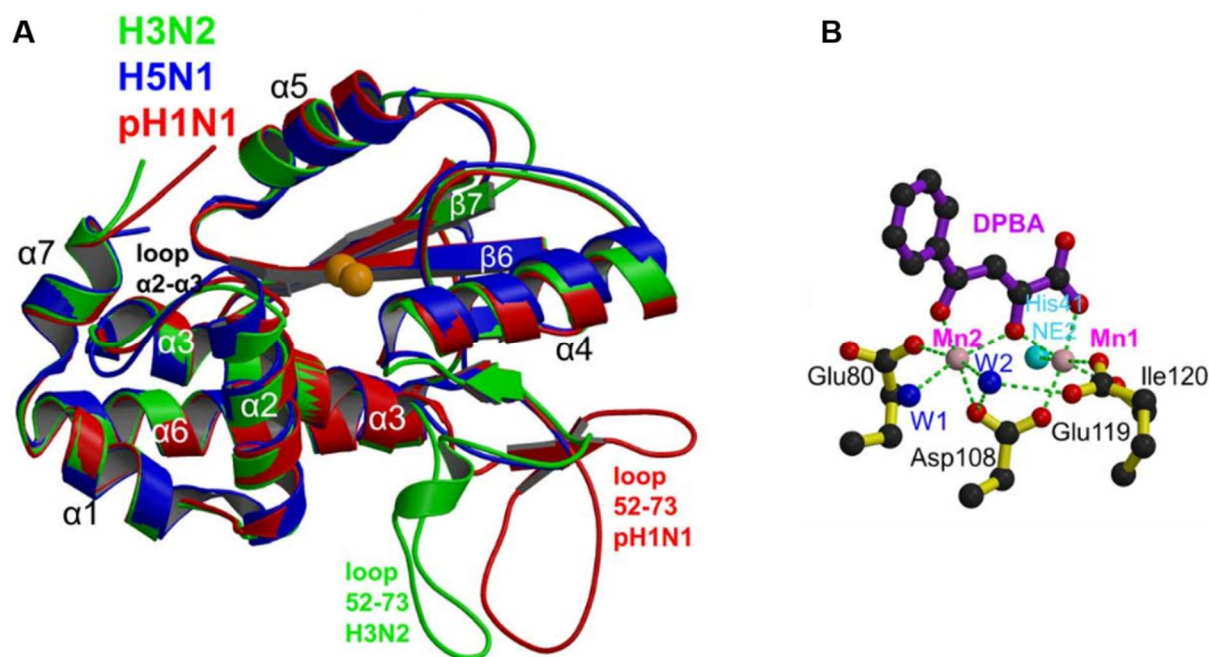


Figure 62 : Mécanisme d'action du DPBA. A/ Superposition des structures du domaine endonucléase de PA des souches H3N2 (vert, PDB 2W69), H5N1 (bleu, PDB 3EBJ) et pH1N1 (rouge, PDB 4AVG). Les deux ions du site catalytique sont représentés par des sphères orange. **B/** Le DPBA établit des liaisons avec les deux ions du site catalytique. Les ions Mn²⁺ représentés en rose sont coordonnés avec des molécules d'eau (sphères bleues). Les liaisons de coordination ioniques sont représentées en pointillés verts (Kowalinski et al., 2012).

Si l'absence du site de liaison de la coiffe au sein de la construction tronquée interdit l'étude du processus complet de vol de coiffe, l'activité endonucléase pourrait toutefois être étudiée en présence de différents ARN, en particulier, d'ARN mimant les ARNv. Il serait intéressant d'analyser *in vitro* le comportement de l'ARN-polymérase tronquée isolée de tout partenaire face à des ARN présentant les extrémités conservées.

Des expériences supplémentaires de cinétique de clivage, avec des substrats fluorescents par exemple, pourraient être envisagées pour quantifier précisément l'activité endonucléase portée par l'ARN-polymérase tronquée.

5.2 TEST D'ACTIVITE DE SYNTHÈSE D'ARN

L'activité de synthèse d'ARN a été étudiée à travers des tests de transcription *in vitro* en présence de substrats radioactifs. La production d'ARNc radioactifs est suivie.

Le terme de « transcription » utilisé ici revêt son sens général de synthèse d'ARN. Il ne correspond absolument pas à l'étape spécifique impliquant le processus de « vol de coiffe » décrite précédemment puisque l'ARN utilisé comme matrice ne comporte pas de coiffe ^{7m}GpppN et la construction utilisée PA-PB1-PB2Nter n'inclut pas le domaine de fixation de la coiffe. Ces tests d'activité de synthèse s'apparenteraient d'ailleurs d'avantage à l'étape de réplication puisqu'ils correspondent au suivi de la production d'ARN complémentaire à la matrice ARN fournie.

Le protocole de base suivi est toujours le même. Il consiste à fournir à l'ARN-polymérase virale, une matrice ARN et des nucléotides libres (NTPs) : ATP, UTP, CTP, GTP. Un type de nucléotide est radioactif (UTP [α -³²P]) pour permettre le suivi des réactions de transcription qui sont réalisées à 37 °C, stoppées par addition d'EGTA et chargées sur gel de polyacrylamide dénaturant (8 M urée).

L'ARN Panhandle (80 nt) est utilisé comme matrice et l'hétérotrimère tronqué PA-PB1-PB2Nter est utilisé pour l'ensemble des tests. Ses deux versions, sauvage (wt) et mutant PA-E80A pour l'activité endonucléase sont actifs pour l'activité de synthèse d'ARN (Figure 63). Un profil de transcription identique est obtenu pour les deux versions de la construction. Cependant, l'activité endonucléase présente sur la version sauvage dégrade les ARN néosynthétisés. Cette dégradation correspond à la traînée sombre observée en arrière-plan des transcrits (Figure 63, wt, temps 30 à 120 min). Pour s'affranchir de cette dégradation, l'ensemble des tests présentés a été réalisé avec la construction PA-E80A mutante déficiente pour l'activité endonucléase sous sa forme de dimère d'hétérotrimère. La forme dimérique a en effet été retenue car elle présente l'avantage d'être purifiée sans ARN (cf. CHAPITRE 3, p 57) ce qui permet de maîtriser la quantité d'ARN matrice présente dans la réaction de transcription.

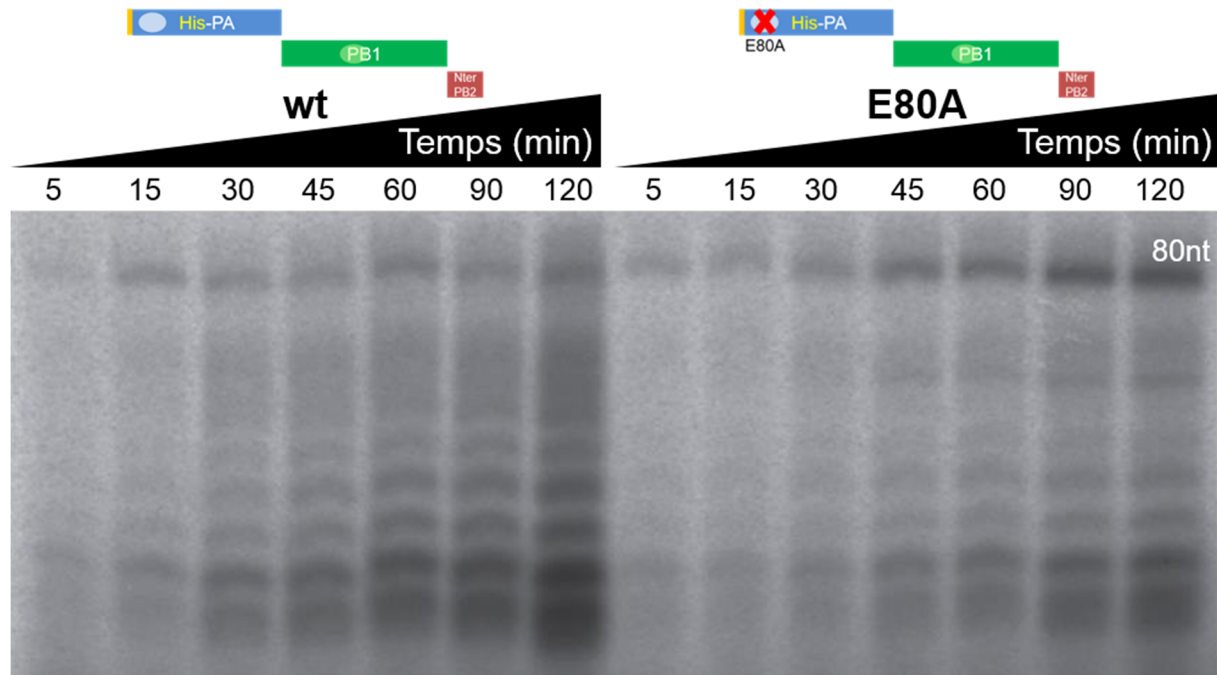


Figure 63 : Les versions sauvage et mutante PA-E80A de l'ARN-polymérase tronquée sont toutes les deux actives pour la synthèse d'ARN. Deux séries de réactions réalisées respectivement avec la version sauvage (wt) et la version mutante (PA-E80A) ont été incubées à 37°C en présence de l'ARN matrice Panhandle (80 nt), de nucléotides libres et d'UTP [α - 32 P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA à différent temps s'étendant de 5 à 120 min pour obtenir une cinétique. Le profil de la version sauvage (wt) de l'ARN-polymérase tronquée montre que les activités endonucléase et de synthèse d'ARN sont concomitantes. La dégradation de l'ARN néosynthétisé par l'activité endonucléase se matérialise par une trainée sombre en arrière-plan des transcrits. La version mutante (PA-E80A) avorte totalement l'activité endonucléase et seule l'activité de synthèse est visible.

Le test de transcription réalisé avec la construction sauvage active pour l'activité endonucléase a fourni plusieurs informations. Il a d'abord établi que les activités endonucléase et de synthèse d'ARN étaient concomitantes lors de tests *in vitro*. Il a ensuite montré que l'ARN-polymérase tronquée était capable de dégrader les ARN qu'elle synthétise. Enfin, la dégradation de l'ARN Panhandle synthétisé alors qu'il présente les deux extrémités 5' conservées des ARNv confirme une activité de clivage non spécifique.

5.2.1 LE PROFIL DE TRANSCRIPTION TYPE

Le profil de transcription obtenu sur gel se construit autour d'une bande supérieure qui correspond au transcrit entier (80 nt) (Figure 64). Différents transcrits abortifs apparaissent en-dessous. L'apparition de ces transcrits de tailles variables se fait au fur et à mesure de la réaction de transcription. Les conditions *in vitro* étant très éloignées des conditions cellulaires, ces arrêts prématurés peuvent être dus à l'absence de partenaires cellulaires et viraux, en particulier de NP, partenaires qui permettraient d'obtenir une réplication plus optimale de la matrice ARN.

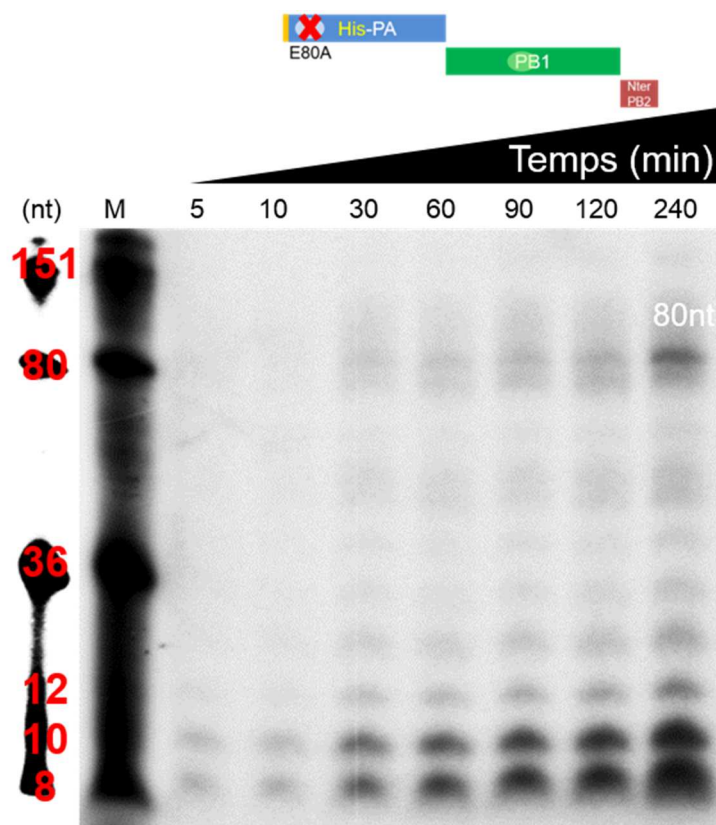


Figure 64 : Motif de transcription type : L'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A) a été incubée à 37 °C en présence de l'ARN matrice Panhandle (80 nt), de nucléotides libres et d'UTP [α - 32 P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA à différents temps s'étendant de 5 à 240 min pour obtenir une cinétique et déposées sur gel 15 % polyacrylamide révélé grâce à un écran radiosensible. La ligne M correspond au marqueur de taille (nt : nombre de nucléotides).

La réaction de synthèse d'ARN continue d'augmenter après des temps de réaction très longs (240 min). Ces temps sont étonnamment longs pour des réactions enzymatiques de ce type et suggèrent une cinétique de synthèse *in vitro* très lente.

5.2.2 CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ

Deux moyens ont été trouvés pour respectivement activer ou inhiber l'activité polymérase de l'hétérotrimère tronqué. La possibilité d'une modulation de l'activité est essentielle pour d'éventuelles mesures de paramètres enzymologiques.

5.2.2.A ACTIVATION DE L'ACTIVITÉ DE SYNTHÈSE D'ARN

Les segments d'ARN viral du virus influenza possèdent des extrémités 3' et 5' hautement conservées qui sont reconnues et fixées par l'ARN-polymérase dans le contexte de la RNP. L'extrémité conservée en 3' constitue également la région promotrice reconnue par l'ARN-polymérase pour l'initiation de la réplication de l'ARN viral. Pour initier la réplication, l'ARN-polymérase du virus influenza présente la particularité de toujours synthétiser un dinucléotide (pppApG) à partir de la région promotrice 3' (cf. § 1.4.2, p 28).

Pour augmenter l'activité de synthèse, le dinucléotide ApG a été ajouté dans le mélange réactionnel avant le début de la réaction (Figure 65.A). La réaction est arrêtée par ajout d'EGTA à différents temps pour obtenir une cinétique. L'ajout d'ApG provoque une nette augmentation de la cinétique de synthèse. La représentation en double inverse illustre la différence de vitesse de synthèse avec (Figure 65.A, droite verte) et sans ApG (Figure 65.A, droite bleue). L'ApG semble donc être utilisé comme amorce par l'ARN-polymérase qui n'aurait plus qu'à poursuivre la réplication. Il conviendrait toutefois de savoir si l'ApG est bel et bien

incorporé au produit de la synthèse. Pour cela, un ApG marqué radioactivement pourrait être utilisé pour suivre son incorporation dans les ARN néosynthétisés.

Ce test d'activation confirme un rôle important du dinucléotide ApG et suggère qu'un analogue de l'ApG pourrait être développé pour inhiber la réplication du génome viral.

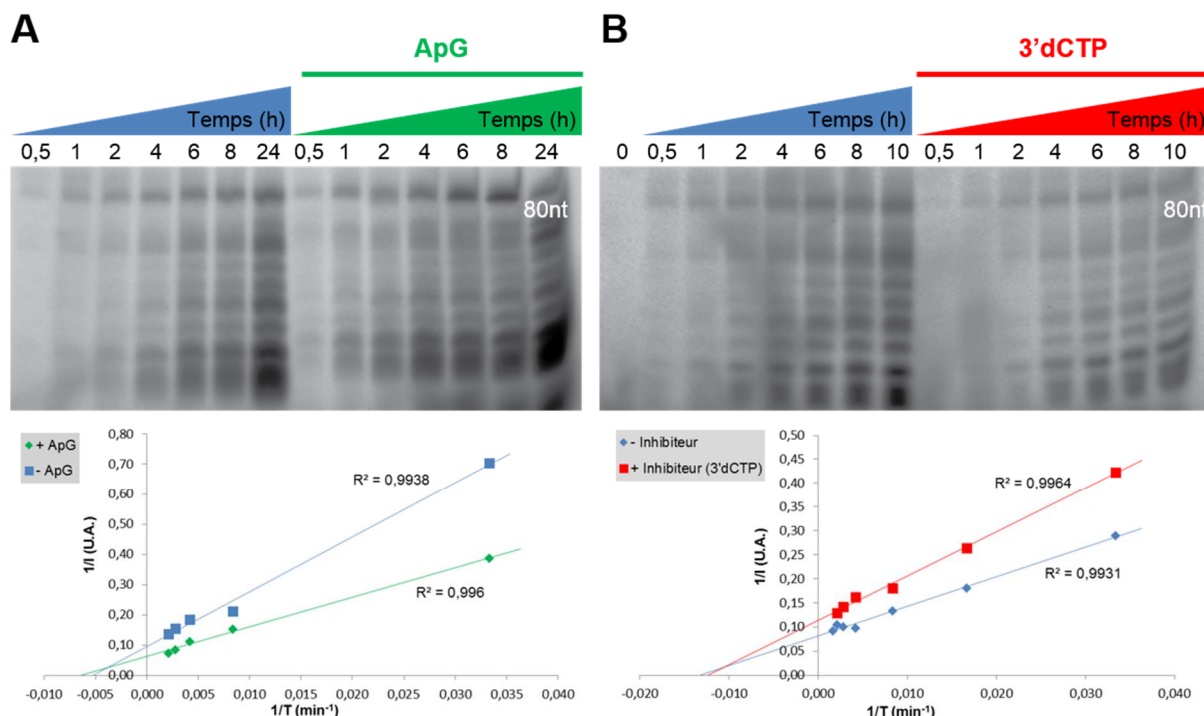


Figure 65 : Contrôle de l'activité de synthèse d'ARN. L'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A) a été incubée à 37 °C en présence de l'ARN matrice Panhandle (80nt), de nucléotides libres et d'UTP [α -³²P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA à différents temps s'étendant de 0,5 à 24 h pour obtenir une cinétique et déposées sur gel 15 % polyacrylamide 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible. **A/** Activation de l'activité de synthèse d'ARN en présence du dinucléotide ApG utilisé comme amorce par l'ARN-polymérase tronquée. La représentation en double inverse montre la condition sans ApG (droite bleue) et avec ApG (droite verte). **B/** Inhibition de l'activité de synthèse d'ARN par remplacement de 10 % du nucléotide CTP par le nucléotide 3'dCTP. La droite rouge représente la condition avec l'inhibiteur 3'dCTP alors que la courbe bleue représente la condition standard.

Les représentations en double inverse sont données à titre d'illustration. Les valeurs utilisées pour les tracer ont été obtenues par lecture d'intensité de la bande correspondant au transcrit complet. Les graphiques représentant l'intensité en fonction du temps ont été tracés puis linéarisés par représentation en double inverse. La synthèse d'ARNc est donc suivie à travers des valeurs d'intensité d'unité arbitraire ne pouvant être reliées à une quantité d'ARNc. Il est donc impossible d'extraire des constantes enzymologiques de ces représentations.

5.2.2.B INHIBITION DE L'ACTIVITE DE SYNTHESE D'ARN

Un nucléotide 3'dCTP a été utilisé pour inhiber la synthèse d'ARN. Le 3'dCTP ne possède pas de groupement hydroxyle (OH) en 3'. Il peut être incorporé en 5' du brin en cours de synthèse. Cependant, une fois incorporé, l'absence d'un groupement OH en 3' du CTP empêche l'incorporation du nucléotide suivant. La réaction de polymérisation est ainsi stoppée. En présence de CTP et de 3'dCTP, la réaction est stoppée aléatoirement selon le nucléotide incorporé. Le remplacement de 10 % de CTP par du 3'dCTP limite la polymérisation et donc l'incorporation de nucléotides marqués et conduit à l'inhibition (Figure 65.B). La représentation en double inverse obtenue en présence de l'inhibiteur 3'dCTP montre un profil d'inhibition de type non compétitive (Figure 65.B, représentation en double inverse). En effet, l'ajout de l'inhibiteur provoque une augmentation de l'inverse de la vitesse maximum ($1/V_m$, intersection de la droite avec

l'ordonnée) alors que le point d'intersection des droites avec l'abscisse (correspondant à l'inverse du K_m , $1/K_m$) reste le même en présence et en absence d'inhibiteur.

La molécule de DPBA utilisée pour inhiber l'activité endonucléase a également été testée pour l'inhibition de l'activité de synthèse d'ARN (Figure 66). La concentration de DPAB utilisée est la même que celle utilisée dans le test d'activité endonucléase (2 mM). Son effet inhibe partiellement l'activité de synthèse mais ne l'avorte pas complètement. L'observation d'une inhibition de l'activité transcriptionnelle *in vitro* est assez étonnante puisque le DPBA a été décrit *in vivo* comme un inhibiteur spécifique de l'activité endonucléase n'affectant pas la synthèse d'ARN (Tomassini et al., 1994). Pour inhiber l'activité endonucléase, le DPBA crée des liaisons avec les ions Mn^{2+} catalytiques. Il pourrait alors se comporter comme un chélateur des ions métalliques, ce qui expliquerait l'inhibition partielle de l'activité de synthèse d'ARN.

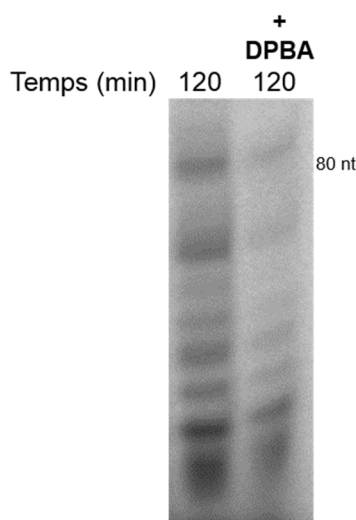


Figure 66 : Inhibition de l'activité de synthèse d'ARN par le DPBA. L'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A) a été incubée à 37°C en présence ou non de 2 mM DPBA et en présence de l'ARN matrice Panhandle (80nt), de nucléotides libres et d'UTP [α - ^{32}P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA et déposées sur gel 15 % polyacrylamide 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible.

5.2.3 CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DE SYNTHÈSE D'ARN

Un long travail de caractérisation de l'ARN-polymérase tronquée a été initié pour étudier l'activité de synthèse d'ARN. Pour cela, une condition de transcription initiale a été sélectionnée (50 mM Tris pH 7,8 ; 100 mM KCl ; 10 mM NaCl ; 5 mM $MgCl_2$; 1 mM $MnCl_2$; 10 mM DTT) et différents paramètres (pH, sels...) ont été testés un par un pour analyser son comportement. Il convient toutefois de rappeler que les conditions *in vitro* utilisées sont très éloignées des conditions cellulaires.

5.2.3.A CRIBLAGE DU pH

Pour déterminer un pH optimal de fonctionnement, les réactions ont été stoppées après deux heures d'incubation à 37 °C dans des tampons allant des pH 5,5 à 8,5. Les résultats obtenus montrent que l'ARN-polymérase est active au pH physiologique (pH 7 à 7,5) et la meilleure activité est obtenue pour un pH supérieur ou égal à 8 (Figure 67). Ce pH est supérieur à celui observé dans le noyau cellulaire, il sera cependant retenu pour le reste des tests d'activité.

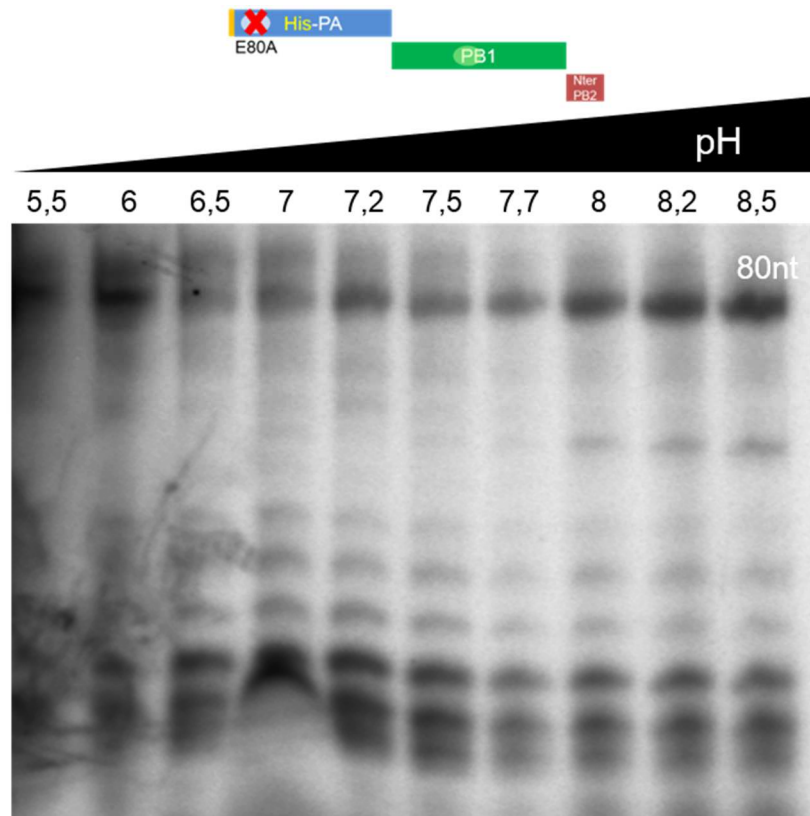


Figure 67 : Effet du pH sur l'activité de synthèse portée par l'ARN-polymérase tronquée. L'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A) a été incubée dans des tampons de pH différents (pH 5,5 à 8,5) à 37 °C en présence de l'ARN matrice Panhandle (80nt), de nucléotides libres et d'UTP [α - 32 P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA et déposées sur gel 15 % polyacrylamide 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible. La migration a été perturbée par les pH acides (5,5 – 6,5).

5.2.3.B CRIBLAGE DES SELS

L'ARN-polymérase tronquée fonctionne avec du Chlorure de Sodium (NaCl) et avec du Chlorure de Potassium (KCl). Le KCl étant le sel physiologique, il sera utilisé pour le reste des tests.

Une série de réactions réalisées avec des concentrations croissantes en KCl montrent une activité plus intense à basse concentration en sels (Figure 68). La concentration physiologique de KCl est de l'ordre de 100 mM. Les meilleurs activités *in vitro* sont obtenues en-dessous de cette concentration. Ce test montre que la concentration en sel peut moduler l'activité de synthèse d'ARN.

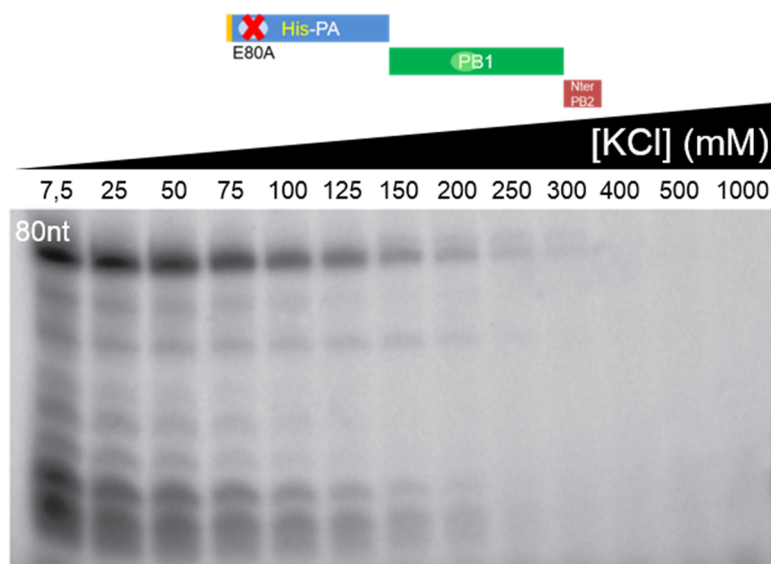


Figure 68 : Influence de la concentration en sels sur l'activité de synthèse d'ARN. Les réactions de transcription ont été menées à différentes concentrations en sel (KCl) allant de 0 à 1000 mM. L'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A) a été incubée à 37 °C en présence de l'ARN matrice Panhandle (80nt), de nucléotides libres et d'UTP [α - 32 P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA et déposées sur gel 15 % polyacrylamide 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible.

5.2.3.C CRIBLAGE DES TEMPERATURES

Selon la souche, le virus de la grippe présente des températures de fonctionnement différentes. Un virus humain aurait une température de fonctionnement plus basse qu'un virus infectant les volailles qui ont température corporelle plus haute (38 °C à 41 °C).

Une série de réactions réalisées à différentes températures (de 25 à 49 °C) durant 2 h et déposées sur gel témoignent d'une large plage de températures de fonctionnement (Figure 69). Une activité peut être visible de 25 à 47 °C, la meilleure activité étant observée entre 41 et 43 °C. Chez l'homme, le virus de la grippe se réplique dans le noyau des cellules des voies aériennes supérieures présentant une température avoisinant celle du corps. Cette température optimale de fonctionnement est donc étonnamment haute pour une ARN-polymérase qui provient d'une souche humaine. Il serait intéressant de comparer cette température avec celle de la même construction provenant d'une souche aviaire.

Le profil de transcription de l'ARN-polymérase ne semble pas être affecté par la température puisque tous les motifs de transcriptions sont équivalents quelle que soit la température.

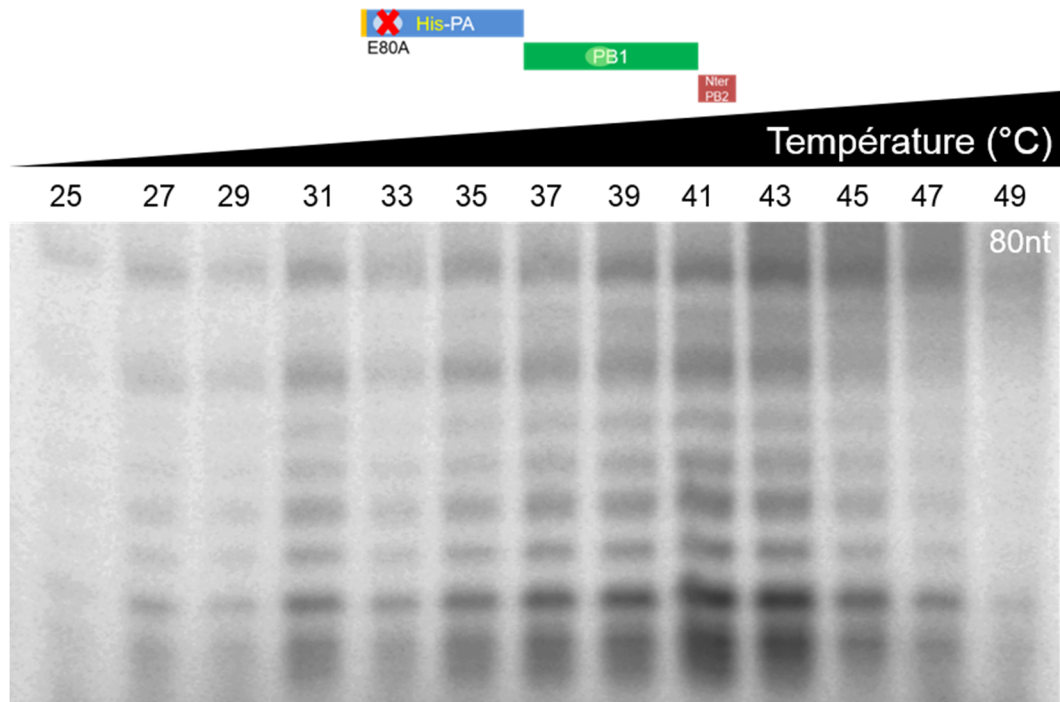


Figure 69 : Effet de la température sur l'activité de synthèse d'ARN. Les réactions ont été réalisées avec l'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A), incubée à différentes températures durant 2 h 30, en présence de l'ARN matrice Panhandle (80nt), de nucléotides libres et d'UTP [α - 32 P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA et déposées sur gel de polyacrylamide 15 %, 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible.

5.2.3.D MANGANESE VERSUS MAGNESIUM

L'activité endonucléase (cf. § 5.1, p 102) est strictement manganèse-dépendante. L'activité de synthèse est également cations-dépendante et montre une claire préférence pour le manganèse (Mn^{2+}).

Deux séries de réactions ont été réalisées en présence de concentrations croissantes soit de Mn^{2+} soit de magnésium (Mg^{2+}) sur un temps très long (3h) pour vérifier l'existence d'une activité même à très faible concentration en cations (Figure 70.A). En absence de cations, aucune activité n'est observée.

L'ARN-polymérase tronquée est environ dix fois plus active avec le Mn^{2+} qu'avec le Mg^{2+} (mesure effectuée par lecture d'intensité de la bande correspondant au transcrit total) et semble atteindre un plateau d'activité à 5 mM de Mn^{2+} .

La fidélité de l'enzyme semble par contre affectée par la concentration en Mn^{2+} puisque les transcrits abortifs n'apparaissent qu'à partir d'une certaine concentration en Mn^{2+} (0,5 mM). L'augmentation d'activité semble s'accompagner d'une hausse de synthèse de ces transcrits abortifs.

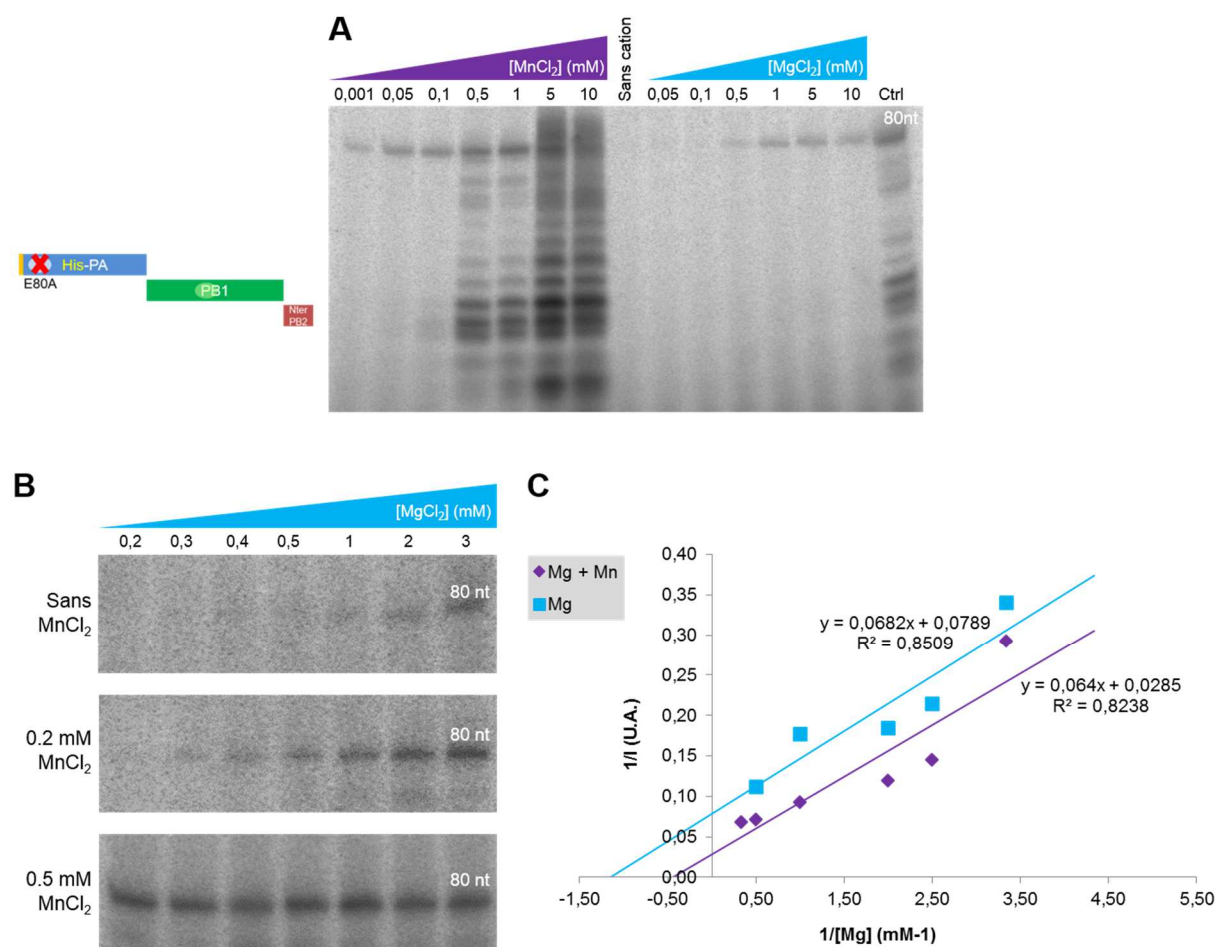


Figure 70 : Effet coopératif entre Mg²⁺ et Mn²⁺. **A/** Comparaison de l'activité de synthèse en présence de Mn²⁺ ou de Mg²⁺. Les réactions ont été réalisées en présence de l'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A), de l'ARN matrice Panhandle (80 nt), de nucléotides libres et d'UTP [α -³²P]. Incubées à 37 °C durant 3 h, les réactions ont ensuite été stoppées par addition d'EGTA et déposées sur gel de polyacrylamide 15 %, 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible. La réaction contrôlée a été réalisée dans le tampon standard avec 5 mM Mg²⁺ et 1 mM Mn²⁺. **B/** Effet coopératif entre Mg²⁺ et Mn²⁺ observé après une heure de réaction. Trois séries de réaction ont été réalisées avec une concentration croissante de Mg²⁺ couplée ou non à une concentration constante de Mn²⁺ (0,2 ou 0,5 mM). L'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A) a été incubée à 37 °C en présence de l'ARN matrice Panhandle (80nt), de nucléotides libres et d'UTP [α -³²P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA et déposées sur gel 15 % polyacrylamide, 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible. **C/** La représentation en double inverse de la production d'ARNc radioactif en fonction de la concentration en Mg²⁺ illustre la coopérativité des deux ions. Aucune valeur de constante enzymologique ne peut être extraite de cette représentation (cf. § 5.2.2.A, p 106).

Deux séries de réactions ont été réalisées en même temps avec une concentration constante de Mn²⁺ couplée à une concentration croissante de Mg²⁺ (Figure 70.B). Les réactions sont arrêtées après 1 h. La première série montre l'activité en présence d'une concentration croissante de Mg²⁺ seulement. La réaction réalisée à une concentration constante de Mn²⁺ à 0,2 mM couplée à une concentration croissante de Mg²⁺ montre que l'augmentation de l'activité suit celle de la concentration de Mg²⁺. A plus haute concentration en Mn²⁺, ce cation devient dominant et l'effet du Mg²⁺ n'est plus visible. Un effet coopératif est donc visible entre le Mg²⁺ et le Mn²⁺ à des concentrations non saturantes de Mn²⁺.

Le graphique en double inverse (Figure 70.c) de la production d'ARNc radioactif en fonction de la concentration en Mg²⁺ illustre ce phénomène coopératif : lorsque le Mn²⁺ est ajouté à une concentration de 0,2 mM, l'activité augmente avec la concentration en Mg²⁺.

La concentration cellulaire de Mg²⁺ sous forme ionique libre est de l'ordre de 0,5 à 6 mM selon les types cellulaires ce qui représente 1 à 3 % de la concentration intracellulaire totale de magnésium (Bertini and Sigel, 2001; Csernoch et al., 1998; McCarthy and Rajiv, 1999). La concentration de Mn²⁺ cellulaire est

encore mal renseignée mais semble être de l'ordre de la dizaine de micromolaires (Bertini and Sigel, 2001; Chen et al., 2012; Schramm, 1986; Tholey et al., 1988; Vettori et al., 1999). La concentration en Mn^{2+} est donc beaucoup plus faible que celle de Mg^{2+} . Dans la cellule, l'avantage en concentration revient au Mg^{2+} et les sites de fixation des ions métalliques seront donc plus facilement occupés par le Mg^{2+} que par le Mn^{2+} . Pour se rapprocher de ce contexte physiologique un ratio $Mn^{2+}:Mg^{2+}$ 1:5 sur la base d'une concentration en Mg^{2+} de 2,5 mM a été adopté.

5.2.4 EFFET DE LA NUCLEOPROTEINE SUR L'ACTIVITE

Dans l'optique de se rapprocher du contexte de la RNP, des tests d'activité en présence de NP ont été réalisés.

Deux cinétiques ont été mises en place avec et sans NP (Figure 71). NP, produite en bactéries, a été purifiée sous forme monomérique (souche A/H1N1, travaux d'Alice Tissot, UVHCI Grenoble) et ajoutée dans un ratio ARN:NP 1:10. La proportion de NP ajoutée par rapport à la quantité d'ARN-Panhandle matrice est calculée de manière à ce que l'ensemble des ARN Panhandle soient encapsidés par NP en respectant les données qui ont été décrites indiquant que 24 nt entourent une NP (Compans et al., 1972; Ortega et al., 2000; Portela and Digard, 2002).

L'ajout de NP dans le milieu réactionnel ne produit pas l'augmentation de l'activité de synthèse mais sa diminution. NP est ajoutée en dernier dans le milieu réactionnel en même temps que les nucléotides libres. Pourtant, ce résultat suggère que la matrice ARN est piégée par NP empêchant ainsi la synthèse. De plus, la visualisation des ARN synthétisés sur gel nécessite l'ajout de 0,8 % SDS en plus de l'urée (8 M). Sans SDS, les ARN produits restent au fond du puits du gel sans migrer.

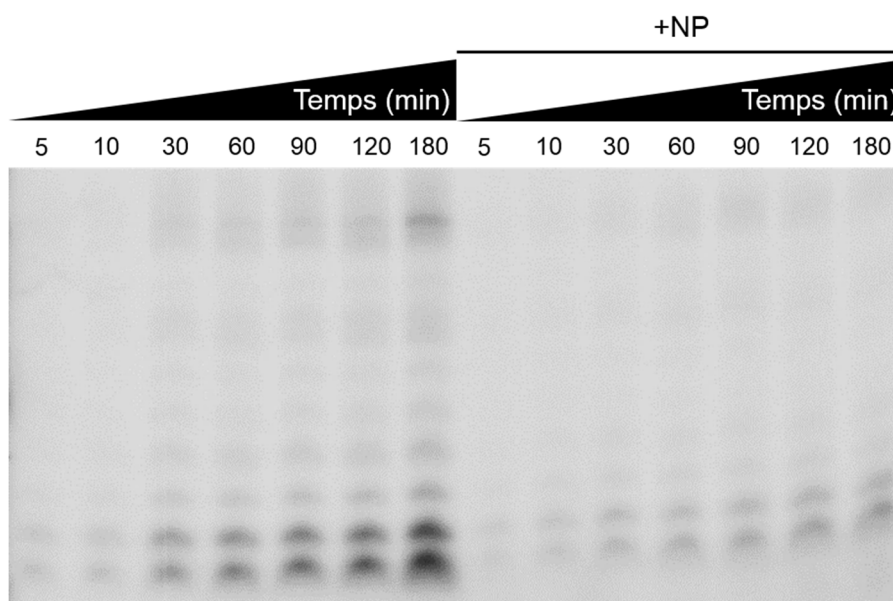


Figure 71 : Essai de transcription en présence de NP. Deux cinétiques ont été réalisées en parallèle avec ou sans NP. NP est ajouté dans un ratio NP:ARN 1:10 pour que toutes les matrices ARN puissent être recouvertes de NP. Dans les deux cas, les réactions ont été réalisées avec l'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A) à 37°C en présence de l'ARN matrice Panhandle (80 nt), de nucléotides libres et d'UTP [α - ^{32}P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA à différents temps pour obtenir une cinétique et déposées sur gel de polyacrylamide 15 %, 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible.

Malgré une affinité plus faible pour l'ARN (40 nM contre 5 nM pour l'ARN-polymérase tronquée), l'interaction semble très forte et la matrice d'ARN devient inaccessible à l'ARN-polymérase. NP étant ajoutée en dernier dans le mélange réactionnel, elle semble pouvoir arracher la matrice ARN à l'ARN-

polymérase sans créer d'interaction bénéfique pour l'activité de synthèse d'ARN. Ceci expliquerait la diminution de l'activité observée.

L'ARN-polymérase tronquée ne présente que la partie N-terminale de PB2. Une récente publication (Gui et al., 2014) a montré que l'interaction entre NP et l'ARN-polymérase se ferait au niveau de la sous-unité PB2 par l'intermédiaire du résidu D88 de NP lors de la réplication. L'absence de PB2 dans la construction expliquerait l'absence d'interaction entre NP et l'hétérotrimère tronqué et donc l'absence d'effet sur l'activité de synthèse.

5.2.5 ESSAIS DE QUANTIFICATION DE L'ACTIVITE

Une fois la caractérisation achevée et la condition optimale isolée, la quantification de l'activité a été entamée pour déterminer les paramètres enzymologiques de l'activité de synthèse d'ARN.

Les premiers tests ont été réalisés à l'Ecole Polytechnique (Palaiseau, Groupe du Dr. Yves Mechulam). Il s'agissait de mettre au point les mesures d'activité par scintillation liquide sur filtre (Blanquet et al., 1974; Lawrence et al., 1973). La production d'ARNc radioactif est suivie. Cette technique consiste, après isolement des produits ARN sur filtre, à placer le filtre dans un liquide scintillant qui va transformer les rayonnements ionisants, consécutifs aux désintégrations radioactives, en lumière détectable et quantifiable. Après une semaine de mesures avec des temps de réaction s'étendant jusqu'à 12 h, aucun signal n'a pu être détecté. Pour être complet, il convient de préciser qu'un bruit de fond constant assez fort a été observé et n'a pas pu être limité suggérant un problème technique qui peut ne pas être étranger à ces résultats.

Lors de ces tests, l'expérience a été faite d'ajouter après 3 h de réaction de larges quantités de dimères d'ARN-polymérase pour essayer d'obtenir un signal. Encore une fois, aucun signal n'a pu être détecté. L'expérience inverse a été réalisée en ajoutant de larges quantités de matrice ARN et a conduit au même résultat.

Une dernière expérience a été réalisée dans laquelle une quantité constante d'ARN-polymérase est mise en présence de larges quantités d'ARN Panhandle en concentrations croissantes. Les produits de la réaction ont été déposés sur gel (Figure 72). Une nouvelle fois, quelle que soit la quantité d'ARN au départ dans le milieu réactionnel, aucune augmentation de l'activité de synthèse n'a été constatée.

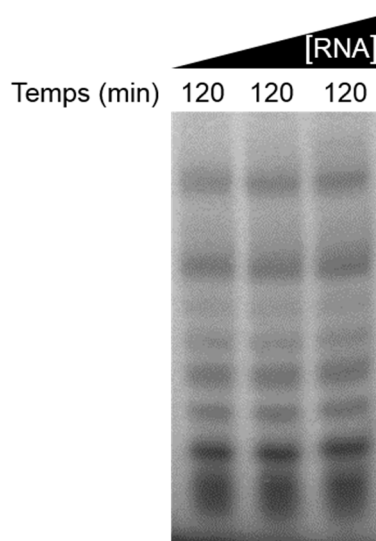


Figure 72 : Effet de la concentration d'ARN matrice sur la réaction de synthèse d'ARN. Les réactions ont été réalisées avec l'ARN-polymérase tronquée (mutant PA-E80A) incubée en présence de concentrations saturantes et croissantes d'ARN Panhandle (0.75, 1 et 4 μ M), de nucléotides libres et d'UTP [α - 32 P]. Les réactions ont été stoppées par addition d'EGTA et déposées sur gel de polyacrylamide 15 %, 8 M urée révélé grâce à un écran radiosensible

Une activité de synthèse est donc visible sur gel mais la quantité d'ARN radioactifs n'est pas suffisante pour être détectée par un compteur à scintillation. Cette absence de signal suggère que l'ARN matrice est fixé par l'ARN-polymérase, répliqué mais pas relâché. L'ajout de matrice d'ARN ou d'ARN-polymérase ne semble pas parvenir à rompre cette interaction et à déplacer l'équilibre vers la fixation d'une nouvelle matrice ARN qui permettrait d'enchaîner de nouvelles réplifications.

Il serait maintenant intéressant de tester l'incorporation d'un nucléotide fluorescent (ou un autre type de sonde). Beaucoup moins contraignante que la radioactivité pour des tests d'activité en haut débit, la fluorescence semble être en effet la technique la plus prometteuse pour mettre au point un test facile d'usage qui pourrait être utilisé pour une analyse à grande échelle de cinétiques pour le test d'inhibiteurs.

5.2.6 DISCUSSION ET CONCLUSION

Malgré une troncation de PB2 et une absence totale de partenaires viraux et / ou cellulaires, en particulier de NP, l'ARN-polymérase du virus influenza est capable de synthétiser de l'ARN à partir d'une matrice ARN de façon autonome. En cohérence avec ces résultats, de récentes études *in vivo* ont d'ailleurs montré qu'en absence de NP, l'ARN-polymérase pouvait répliquer et transcrire des ARNv d'une taille inférieure à 149 nt (Honda et al., 1988; Lee et al., 2002; Newcomb et al., 2009; Turell et al., 2013). Néanmoins la lenteur de la réaction observée avec l'ARN-polymérase tronquée est très éloignée des constantes déjà mesurées sur des ARN-polymérase virales recombinantes purifiées (Zhang et al., 2010). Ces résultats pourraient donc être imputables à l'absence d'une grande partie de la sous-unité PB2.

L'absence de signal lors des tests effectués avec un compteur à scintillations et l'impossibilité de moduler ou de relancer l'activité en jouant sur les concentrations d'ARN-polymérase ou de matrice ARN au départ et durant la réaction, ont conduit à de nombreuses interrogations concernant le relâchement du brin néo-synthétisé après la répllication. Les résultats suggèrent que le brin nouvellement synthétisé resterait fixé à l'ARN-polymérase et au brin matrice sans être relargué. L'ensemble serait alors dans un état bloqué n'autorisant plus la synthèse. Le système tendrait vers l'accumulation de complexes entre l'ARN-polymérase et les brins matrice et néosynthétisés d'ARN expliquant l'arrêt prématuré de la synthèse et l'impossibilité de détecter les produits de transcription par compteur à scintillations.

Ces tests ont été réalisés avec l'ARN-panhandle (80 nt) présentant les deux extrémités conservées 3' et 5'. Les tests de transcription *in vitro* et les études génomiques *in vivo* réalisées jusqu'à présent ont montré que l'extrémité 5' était nécessaire pour permettre l'activité de synthèse et qu'un appariement était requis (Lee et al., 2003; Neumann et al., 2004). Ce rôle pourrait être vérifié sur l'ARN-polymérase tronquée, en effectuant des tests de transcription avec des ARN comportant soit l'extrémité 5', soit l'extrémité 3'. Des brins complémentaires pourraient également être testés pour investiguer la deuxième étape de la répllication, c'est-à-dire, la synthèse d'ARNv (-) à partir d'ARNc (+).

Le DPBA a été décrit *in vivo* pour inhiber spécifiquement l'activité endonucléase sans affecter l'activité de synthèse d'ARN (Tomassini et al., 1994). *In vitro*, l'inhibition de l'activité endonucléase a été confirmée (Dias et al., 2009), mais son effet sur l'activité de synthèse n'a jamais été décrit. Les résultats obtenus *in vitro* pour l'ARN-polymérase tronquée montrent une inhibition partielle de l'activité de synthèse d'ARN à une concentration identique à celle utilisée pour inhiber l'activité endonucléase. Le mécanisme d'action du DPBA pourrait expliquer cet effet. Pour inhiber l'activité endonucléase, le DPBA créerait des liaisons avec les ions Mn^{2+} catalytiques. Il pourrait se comporter comme un chélateur d'ions métalliques conduisant à l'inhibition partielle de l'activité de synthèse d'ARN observée. Ces résultats remettent en question l'effet du DPBA, non seulement sur l'activité de synthèse de l'ARN-polymérase de la grippe, mais aussi sur l'activité des ARN-polymérases cellulaires.

La sous-unité PB1 présente les motifs conservés A-D spécifiques des ARN-polymérases ARN-dépendantes. Les motifs A et C contiennent les résidus aspartates strictement conservés nécessaires à l'établissement des liaisons avec les ions divalents (Mg^{2+} et Mn^{2+}) (Joyce and Steitz, 1995; Steitz, 1998). Les tests de transcription sur l'ARN-polymérase tronquée ont confirmé l'importance des ions manganèse et magnésium lors du processus de synthèse d'ARN. Ils ont aussi montré que l'activité de synthèse était différente selon le type d'ion métallique en présence. Ainsi, l'activité est plus forte en présence de Mn^{2+} qu'en présence de Mg^{2+} . La préférence pour le Mn^{2+} observée n'exclut en rien la possibilité d'un fonctionnement avec les deux ions lors de la réplication. Un effet coopératif entre le Mg^{2+} et le Mn^{2+} a d'ailleurs pu être illustré lors des tests. Ce phénomène coopératif s'expliquerait par l'existence, chez de nombreuses ARN-polymérase ARN-dépendantes, d'un site de fixation non catalytique d'ions divalents (Mönttinen et al., 2012; Poranen et al., 2008). De tels sites ont été identifiés chez différentes familles de virus à ARN pour lesquelles les structures des ARN-polymérases ARN-dépendantes sont disponibles (*Caliciviridae*, *Flaviviridae*, *Leviviridae*, *Picornaviridae*, *Birnaviridae*, *Cystoviridae*, *Reoviridae*). L'existence d'un site non catalytique chez l'ARN-polymérase ARN-dépendante du virus influenza pourrait expliquer l'effet coopératif entre le Mg^{2+} et le Mn^{2+} en autorisant la présence des deux ions et leur coopération au sein du domaine polymérase. La présence mixte d'un ion Mn^{2+} et d'un ion Mg^{2+} ne peut pas non plus être exclue. D'autres études font également état de rôles spécifiques du Mg^{2+} et du Mn^{2+} sur les activités des ARN-polymérases ADN-dépendante I et II (Song and Hunt, 1988).

L'addition de manganèse est connue pour stimuler un grand nombre d'ARN-polymérase dont des ARN-polymérase virales telles que celle du virus de l'hépatite C. (Ferrari et al., 1999; Luo et al., 2000; Mönttinen et al., 2012; Poranen et al., 2008). Dans le cas de l'ARN-polymérase tronquée, la plus forte activité observée en présence de Mn^{2+} s'accorde avec ces données. Dans la dualité entre Mg^{2+} et Mn^{2+} , le rôle biologique et structural du Mn^{2+} est resté à l'état d'énigme pendant très longtemps puisqu'à faible concentration, il active de nombreuses polymérases alors qu'à haute concentration, il les inhibe (Ferrari et al., 1999; Luo et al., 2000; Poranen et al., 2008; Yang et al., 2001, 2003).

L'étude de l'ARN-polymérase ARN-dépendante du bactériophage $\Phi 6$ a montré que la perte de fixation du Mn^{2+} s'accompagnait d'une baisse de la fixation de la matrice ARN (Poranen et al., 2008). Des études de stabilité thermique en thermofluor (TSA) ont aussi montré que le Mn^{2+} déstabilisait l'ARN-polymérase ARN suggérant qu'un degré de flexibilité structural était nécessaire pour une fixation efficace de la matrice ARN (Poranen et al., 2008). Pour explorer l'effet du manganèse sur la stabilité de l'ARN-polymérase tronquée, des tests de stabilité thermique (cf. principe § 4.2.2.B, p 90) ont été réalisés en présence de différents additifs dont le manganèse (Figure 73). Les tests ont été menés avec l'ARN-polymérase tronquée sous forme monomérique purifiée en présence d'ARN. L'ARN-polymérase tronquée présente une température de fusion (T_m) significativement plus haute (55°C, Figure 73, courbe bleue) que celle de l'hétérotrimère tronqué en présence de Mn^{2+} (50°C, Figure 73, courbe rouge) suggérant que le Mn^{2+} réduit sa stabilité structurale. Ce résultat est en accord avec la déstabilisation par le manganèse déjà observée sur l'ARN-polymérase ARN-dépendante du bactériophage $\Phi 6$ (Poranen et al., 2008). A noter que les nucléotides libres n'ont pas d'effet sur la stabilité thermique de l'ARN-polymérase tronquée.

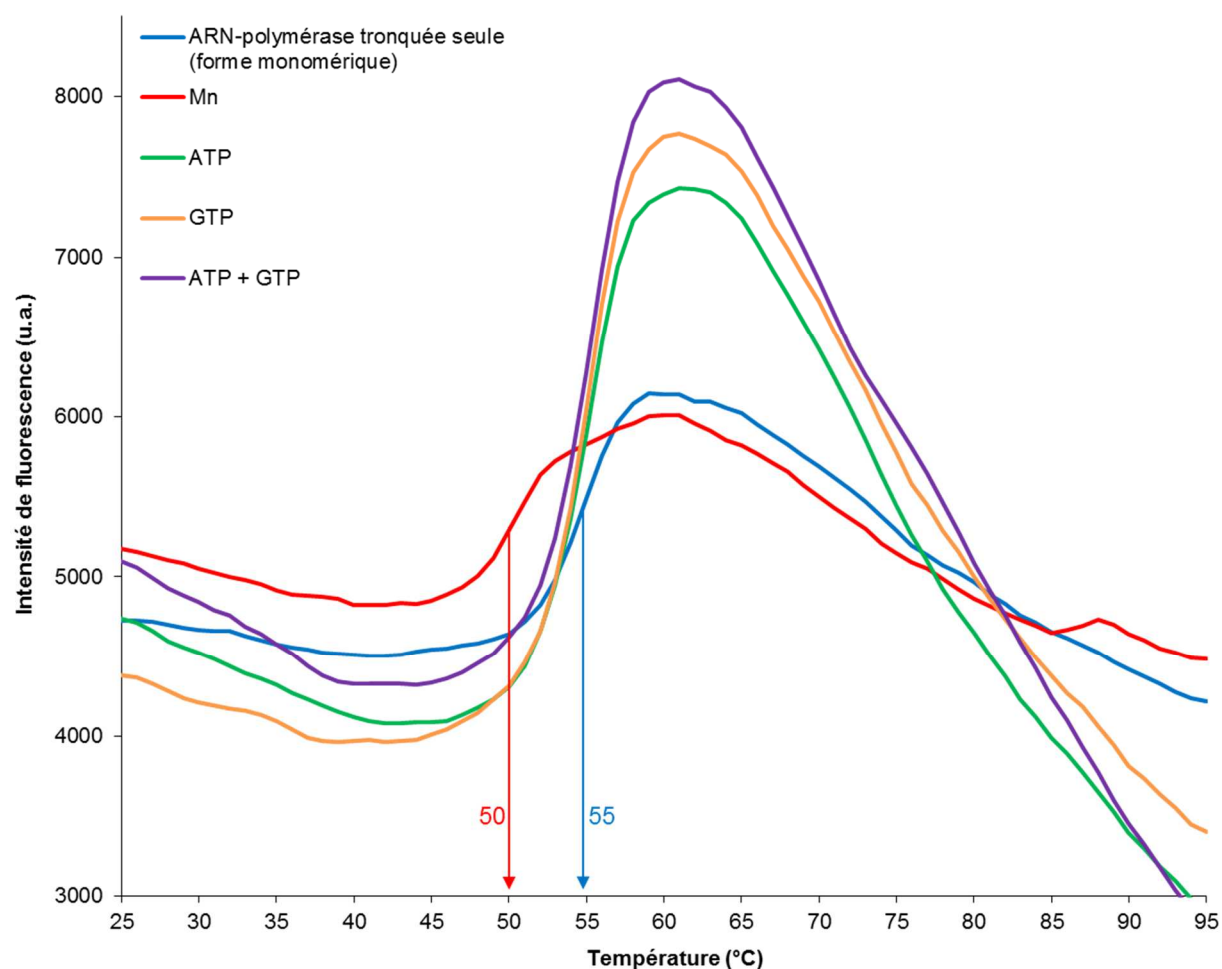


Figure 73 : Les ions manganèse déstabilisent l'ARN-polymérase tronquée sous forme monomérique. Expérience de stabilité thermique menée en présence de différents additifs. Rappel : L'ARN-polymérase tronquée sous forme monomérique est purifiée en présence de l'ARN-Short-panhandle.

Au niveau mécanistique, il a été montré que l'établissement de liaisons entre le Mn^{2+} et l'aspartate catalytique était nécessaire pour permettre au site actif de s'engager correctement face au squelette triphosphate des NTP entrant (Mönttinen et al., 2012; Poranen et al., 2008). En présence des ions Mg^{2+} catalytiques, il agirait comme un co-facteur pour le positionnement correct des substrats durant la catalyse établissant ainsi une géométrie correcte lors de la polymérisation. La flexibilité structurale engendrée par la fixation du Mn^{2+} est donc aussi importante pour la dynamique de synthèse et explique les besoins en Mn^{2+} durant la polymérisation. Cependant, parce que les concentrations physiologiques en manganèse sont très inférieures à celles de magnésium (Bertini and Sigel, 2001; Chen et al., 2012; Schramm, 1986; Tholey et al., 1988; Vettori et al., 1999), le rôle physiologique du manganèse dans l'activité de synthèse reste encore incertain. Pour tenter d'apporter des éléments de réponse quant à cette question, le rôle potentiel du manganèse a été analysé à travers sa distribution cellulaire durant l'infection par le virus de la grippe. Ces travaux sont décrits dans le dernier chapitre (cf. CHAPITRE 6, p 129).

Face au manganèse, l'ARN-polymérase tronquée du virus influenza semble donc faire état d'un comportement similaire à celui qui a déjà été décrit pour d'autres ARN-polymérases ARN-dépendante citées plus haut. L'obtention d'une structure du site catalytique polymérase à haute résolution ($< 2 \text{ \AA}$) pourrait permettre de confirmer la présence d'un site de fixation au manganèse au sein de l'ARN-polymérase du virus influenza. Si un site de fixation était mis en évidence, il pourrait constituer une cible pour la conception d'antiviraux universels.

5.3 MESURES DES AFFINITES ARN-POLYMERASE:ARN

5.3.1 LES REGIONS PROMOTRICES DE L'ARNv

Tous les segments d'ARNv des virus influenza contiennent des régions non codantes à leurs extrémités 5' et 3' entourant la région codante. Les extrémités terminales sont hautement conservées entre tous les segments chez toutes les souches de virus de la grippe (Figure 5, p 10). Ces treize nucléotides à l'extrémité 5' et douze à l'extrémité 3' présentent une complémentarité partielle et inversée qui a conduit à une proposition de structure en tige-boucle appelée « panhandle » créée par l'appariement partiel entre les extrémités 5' et 3' (Desselberger et al., 1980; Robertson, 1979). Ce modèle en « panhandle » s'appuie sur des expériences de réticulation (cross-linking) qui montre une configuration circulaire des ARN (Hsu et al., 1987) ainsi que sur des analyses structurales (Bae et al., 2001; Martín-Benito et al., 2001).

Si la présence des deux extrémités et d'un appariement à ce niveau semblent essentiels pour permettre l'activité de synthèse, d'autres modèles ont été proposés se basant sur des analyses mutationnelles. Le modèle d'origine panhandle (Figure 74.A) prédit un large appariement Watson-Crick alors que le modèle RNA-fork (Figure 74.B) propose que la partie terminale des extrémités reste à l'état de simple brin (Fodor et al., 1994, 1995; Kim et al., 1997). Le troisième modèle dit « en tire-bouchon » (corkscrew) (Figure 74.C) suggère que les extrémités 3' et 5' s'apparient avec elles-mêmes pour former des extrémités 5' et 3' en épingle à cheveux. Ce modèle dérive d'études montrant que la présence d'une structure en épingle à cheveux en 3' et en 5' était nécessaire pour l'activité endonucléase *in vivo* et que la structure en épingle à cheveux en 5' était essentielle pour le mécanisme de polyadénylation (Leahy et al., 2001a, 2001b; Pritlove et al., 1999). De récentes expériences de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) ont révélé une structure en tire-bouchon dans laquelle les extrémités 5' et 3' forment chacune une épingle à cheveux (Tomescu et al., 2014).

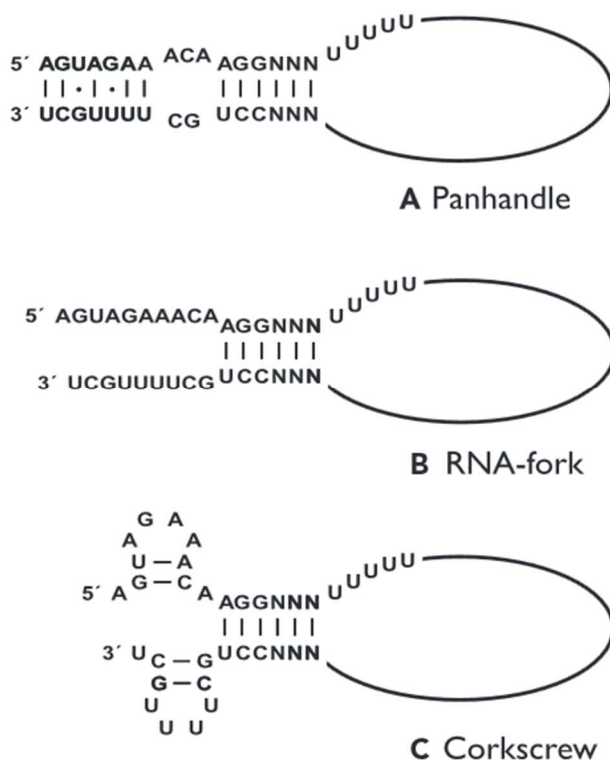


Figure 74 : Modèles des structures secondaires proposés pour les extrémités promotrices de l'ARNv. Les nucléotides conservés aux extrémités 3' et 5' sont représentés ainsi que les nucléotides spécifiques de chaque segment (NNN). Le signal de polyadénylation est représenté par une séquence poly-U. Les appariements Watson-Crick sont indiqués (Shaw and Palese, 2013).

Beaucoup d'études se sont donc intéressées à la fixation de l'ARN sur l'ARN-polymérase mais peu d'entre elles se sont intéressées à la mesure d'affinité de l'ARN-polymérase pour les extrémités terminales 3' et 5' individuellement.

Des mesures d'affinité de l'ARN-polymérase tronquée pour les extrémités conservées des régions promotrices (Figure 75.A – D) ont donc été réalisées. Les ARN correspondant à ces extrémités se composent des seize nucléotides terminaux. Dans un même temps, les affinités pour deux ARN suivant le premier modèle en forme de tige-boucle (panhandle) (Figure 75.E et F) ont été déterminées.

Les mesures d'affinité initiales pour les extrémités conservées individuellement ont été acquises par anisotropie de fluorescence puis vérifiées par la méthode du FBA qui a été utilisée pour les mesures suivantes.

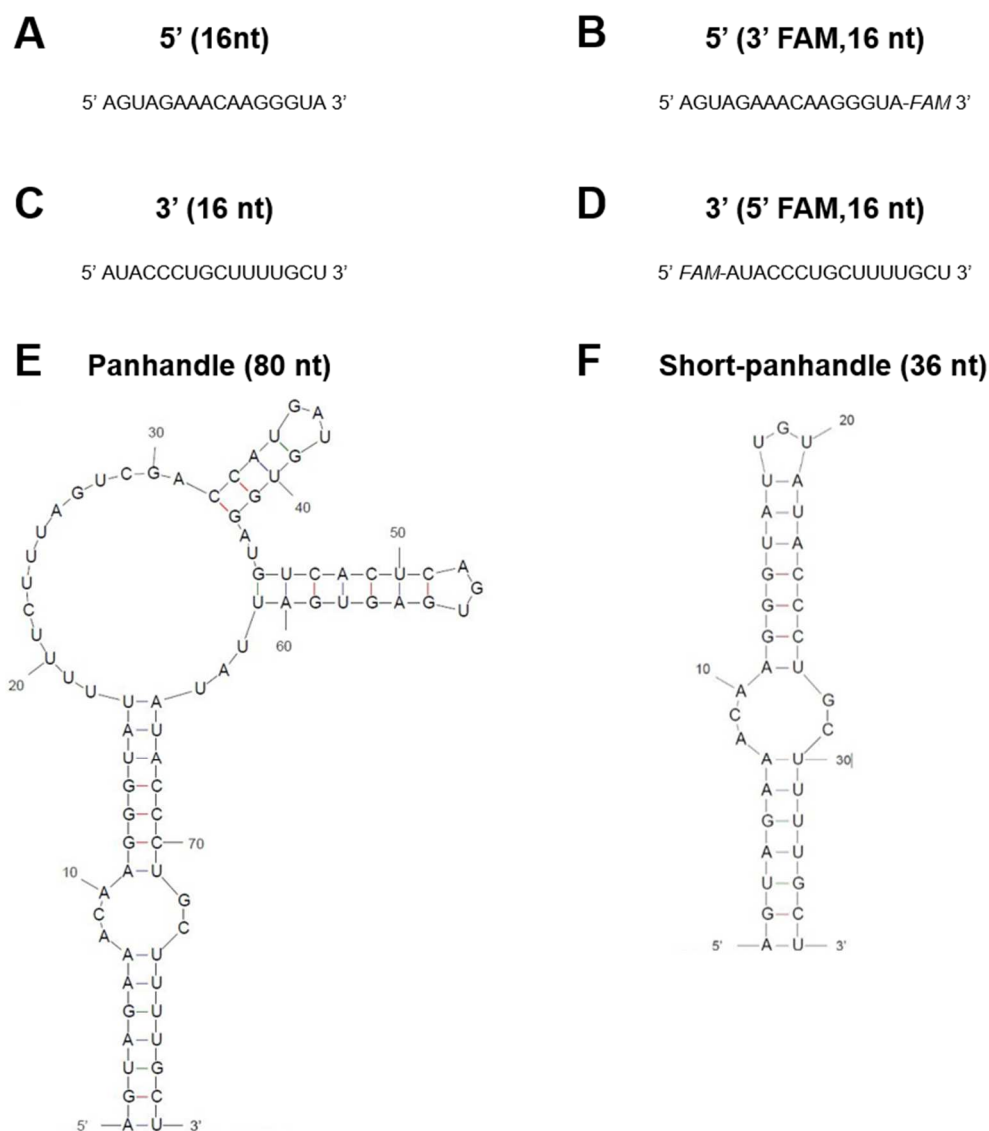


Figure 75 : Séquences des molécules d'ARN utilisées pour la mesure des affinités par FBA et anisotropie de fluorescence. A/ Séquence de l'ARN 5' correspondant aux 16 derniers nucléotides de l'extrémité 5' conservée de l'ARNv. **B/** Séquence de l'ARN 5' (3' FAM) correspondant aux 16 derniers nucléotides de l'extrémité 5' conservée de l'ARNv couplée en 3' à la fluorescéine (FAM). **C/** Séquence de l'ARN 3' correspondant aux 16 derniers nucléotides de l'extrémité 3' conservée de l'ARNv. **D/** Séquence de l'ARN 3' (5' FAM) correspondant aux 16 derniers nucléotides de l'extrémité 3' conservée de l'ARNv couplée en 5' à la fluorescéine (FAM). **E/** Séquence et prédiction de structure de l'ARN Panhandle (80 nt) mimant l'ARNv. **F/** Séquence et prédiction de structure de l'ARN Short-panhandle (36 nt) formant une tige-boucle correspondant aux extrémités 5' et 3' de l'ARNv.

5.3.2 AFFINITES INITIALES OBTENUES PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

5.3.2.A PRINCIPE

L'utilisation de l'anisotropie de fluorescence pour mesurer en temps réel les interactions entre les protéines et les séquences nucléotidiques a été introduite au début des années 90 (Heyduk and Lee, 1990). Pour l'anisotropie de fluorescence, deux propriétés fondamentales sont à garder en mémoire :

- I) Les molécules fluorescentes possèdent à la fois un dipôle d'excitation et un dipôle d'émission.
- II) Il existe un court délai entre l'absorbance d'un photon exciteur et la libération d'un photon fluorescent.

Le dipôle d'excitation de la molécule impose que la lumière polarisée excite uniquement les molécules de la solution qui sont dans la bonne orientation, c'est-à-dire les fluorophores qui sont orientés de sorte que leur dipôle d'excitation s'aligne avec la lumière incidente polarisée. Puisque l'illumination est constante, les fluorophores de la solution vont continuellement entrer et sortir de l'alignement avec la lumière polarisée incidente.

De la même manière que le dipôle d'excitation, le dipôle d'émission d'un fluorophore détermine la polarité de la lumière libérée par ce fluorophore. Par exemple, si une population de fluorophores était soudainement immobilisée et éclairée par un plan de lumière polarisée, seuls les fluorophores ayant leur dipôle d'excitation correctement aligné avec la lumière incidente polarisée vont absorber la lumière. Ces fluorophores vont alors constituer un sous-ensemble de la population totale. Puisqu'ils sont immobilisés, toute la lumière émise par cette sous-population de fluorophores excités va être polarisée de façon cohérente. La relation angulaire entre les dipôles d'excitation et d'émission de la molécule détermine aussi la relation angulaire entre la polarisation de la lumière émise et la polarisation de celle incidente. Il convient de considérer maintenant la situation réelle dans laquelle une solution de fluorophores est éclairée par une lumière polarisée incidente. C'est dans ce cadre que le délai entre excitation et émission rentre en jeu. Pour une population de fluorophores, le délai entre excitation et émission suit une loi de décroissance exponentielle et le délai moyen est décrit par le temps de vie de la fluorescence du fluorophore. Le temps de vie de fluorescence fait donc référence au temps moyen qu'une molécule de fluorophore reste dans un état excité avant d'émettre un photon. Les temps de vie de fluorescence sont généralement de l'ordre de 1 à 25 nanosecondes.

Si un fluorophore excité se réoriente en bougeant par diffusion rotationnelle durant son temps de vie de fluorescence, la polarisation de la lumière qu'il émet sera déterminée par sa nouvelle position. Si une population entière de fluorophores se réoriente aléatoirement durant le temps de vie de fluorescence, la lumière émise va devenir complètement dépolarisée puisque les positions de tous les dipôles seront aléatoires. Pour une population de fluorophores, cela signifie que la polarisation et l'intensité de la lumière émise dépendent de la diffusion rotationnelle. C'est sur cette caractéristique que se fonde la mesure des interactions intermoléculaires par anisotropie de fluorescence.

Dans le cas des interactions protéines:ARN, leurs mesures se basent sur le fait que les grosses molécules se réorientent plus lentement et fournissent donc des émissions de lumière plus polarisées. A l'inverse, les petites molécules se réorientent très rapidement et sont alors plus efficaces pour dépolariser la lumière (Figure 76). Ainsi, une petite molécule d'ARN marquée par un fluorophore va se réorienter (et les spins sur leur axe) plus rapidement seule en solution que fixée à une protéine. L'augmentation de l'anisotropie de fluorescence due à une plus faible diffusion rotationnelle des complexes protéine:ARN par rapport à l'ARN libre est directement reliée à la fraction d'ARN fixée. En résumé, les tests d'affinité protéine:ARN basés sur l'anisotropie de fluorescence mesurent le degré par lequel la lumière émise par un fluorophore situé sur l'ARN est polarisée.

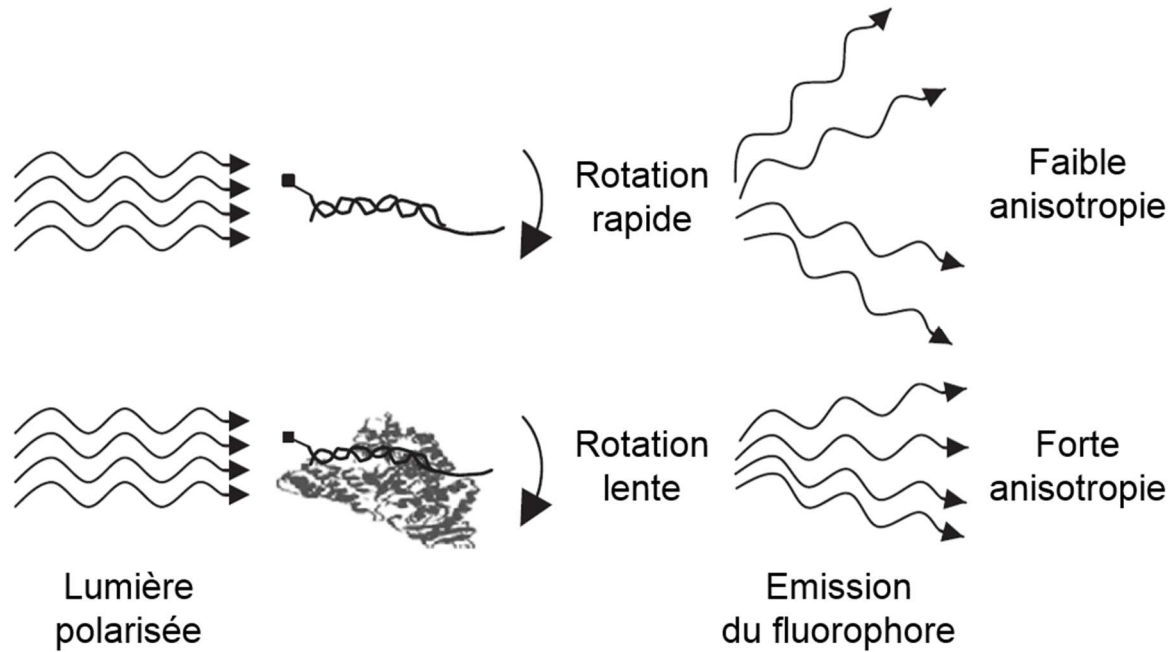


Figure 76 : Effet de la vitesse de diffusion rotationnelle (réorientation et rotation des spins sur leur axe) sur l'anisotropie de la lumière émise d'une molécule d'ADN marquée par un fluorophore. La molécule d'ADN libre et celle complexée à la protéine sont toutes les deux exposées à une lumière polarisante. La molécule d'ADN complexée à la protéine se réorientant plus lentement, une plus grande proportion de sa lumière d'émission est polarisée ce qui provoque une mesure de fluorescence plus importante.

5.3.2.B AFFINITES INITIALES POUR LES EXTREMITES CONSERVEES

Des quantités croissantes de protéine d'intérêt ont été ajoutées à un volume réactionnel dans lequel le brin d'ARN correspondant à une extrémité est à concentration constante. Pour éviter toute perturbation dans la fixation de l'extrémité conservée, le fluorophore (fluorescéine, FAM) est placé à l'extrémité opposée, en 5' pour l'ARN 3' et inversement (Figure 75.B et D). La quantité croissante d'ARN-polymérase conduit à une augmentation initiale de l'anisotropie correspondant à la formation des complexes ARN-polymérase:ARN suivie d'un plateau de saturation atteint à de plus fortes concentrations en protéine (Figure 77).

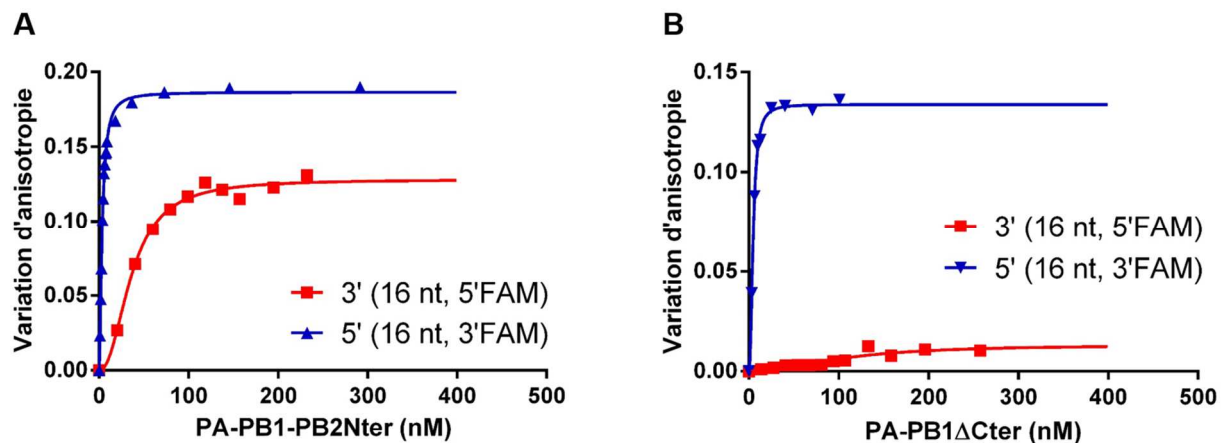


Figure 77 : Affinité de l'ARN-polymérase tronquée et de PA-PB1ΔCter pour les extrémités 3' et 5' conservées de l'ARNv mesurée par anisotropie de fluorescence. Le graphique représente la variation de l'anisotropie observée (sans unité) en fonction de la concentration d'ARN-polymérase tronquée ou de PA-PB1ΔCter. Des concentrations croissantes d'ARN-polymérase sont incubées avec 8 nM d'ARN 3' marqué en 5' par un fluorophore (fluorescéine, FAM) à température ambiante durant 2 min avant chaque mesure.

L'ARN-polymérase tronquée présente une affinité forte pour le brin correspondant à l'extrémité 5' conservée avec un K_d apparent de l'ordre de quelques nanomolaires (3,4 nM) (Figure 77.A). Son affinité

pour l'extrémité 3' conservée est plus faible avec un K_d apparent égal à 36 nM. Les détails des valeurs d'affinité obtenues sont indiqués dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Affinités obtenues par anisotropie de fluorescence. La qualité des données d'affinité est évaluée par l'erreur standard en nM et le R^2 . ND (Non Détecté) indique l'absence d'affinité.

Construction	ARN	K_d (nM)	Erreur standard (nM)	R^2
ARN-polymérase tronquée	5' ARNv (3'FAM)	3,4	0,10	0,98
	3' ARNv (5'FAM)	36	1,85	0,99
PA-PB1 Δ Cter	5' ARNv (3'FAM)	4,7	0,13	0,99
	3' ARNv (5'FAM)	ND	ND	ND

5.3.2.C IDENTIFICATION D'UNE REGION POUR LA FIXATION DE L'EXTREMITE 3'

Dans des conditions identiques et avec les mêmes ARN, des affinités ont été mesurées avec une construction de l'ARN-polymérase sans l'extrémité N-terminale de PB2 et sans le domaine d'interaction de PB1 avec PB2 (**Figure 78.B**) (construction PA-PB1 Δ Cter, travaux de Christopher Swale, UVHCI Grenoble).

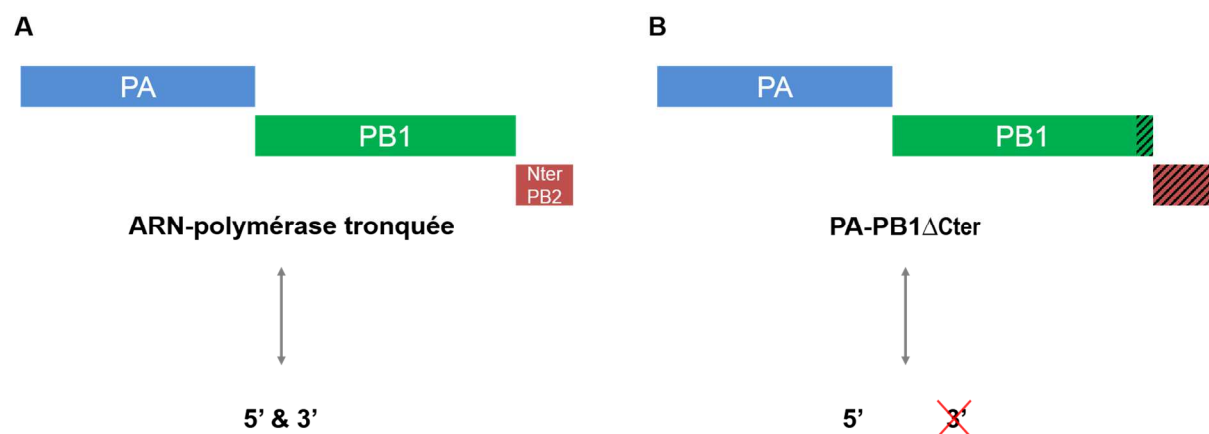


Figure 78 : Identification d'une région indispensable à la fixation de l'extrémité 3'. Représentation schématique des interactions avec les régions promotrices 3' et 5' en présence (**A**) et en absence (**B, zone rayée**) de la partie N-terminale de PB2.

L'absence de la partie N-terminale de PB2 conduit à la perte d'affinité pour l'extrémité 3' conservée de l'ARN mais n'a aucune incidence sur la fixation du 5' (**Figure 77.B**). La partie N-terminale de PB2 semble donc participer à l'interaction avec l'extrémité 3' soit en interagissant directement avec elle, soit en entraînant un changement conformationnel du complexe PA-PB1 qui permettrait sa fixation.

5.3.2.D CONCLUSION

Ces résultats montrent une affinité significativement plus haute entre l'ARN-polymérase tronquée et l'extrémité 5' des ARNv. Les valeurs de K_d obtenues apparaissent très fortes (en particulier pour l'extrémité 5', $K_d < 5$ nM) et remettent en question la validité de leur obtention à travers la méthode

d'anisotropie de fluorescence. En effet, les mesures d'affinités imposent d'utiliser des concentrations d'ARN marqué inférieures au K_d apparent. Or en anisotropie de fluorescence, une concentration d'environ 8 nM d'ARN marqué est nécessaire pour détecter un signal. Cette concentration est supérieure à la valeur du K_d apparent pour la fixation du 5' (3,4 nM) et ne permet pas de valider les valeurs obtenues. La méthode de mesure d'affinité par fixation sur filtre (FBA, Filter Binding Assay), plus sensible, a permis d'abaisser la concentration d'ARN marqué (< 0,1 nM) en-dessous du K_d apparent estimé et a été utilisée pour confirmer les valeurs obtenues par anisotropie de fluorescence.

5.3.3 AFFINITES OBTENUES PAR FILTER BINDING ASSAY (FBA)

En comparaison avec l'anisotropie de fluorescence, la méthode de FBA est beaucoup plus sensible et permet d'effectuer les mesures en présence de concentrations d'ARN marqué très faibles (< 0,1 nM) assurant la validité des mesures de K_d très fortes, ce qui est le cas pour l'affinité entre l'ARN-polymérase et l'extrémité 5' de l'ARN viral.

5.3.3.A PRINCIPE

Un FBA avec double filtration sur système de filtration 96 puits a été utilisé pour la mesure des affinités entre l'ARN-polymérase tronquée et différents ARN. Dans cette méthode, l'ARN est marqué radioactivement par phosphorylation au P^{32} (Figure 79). Les détails concernant le marquage radioactif au P^{32} est détaillé dans le paragraphe 2.13.2, p 53 du CHAPITRE 2 Matériel et Méthodes.

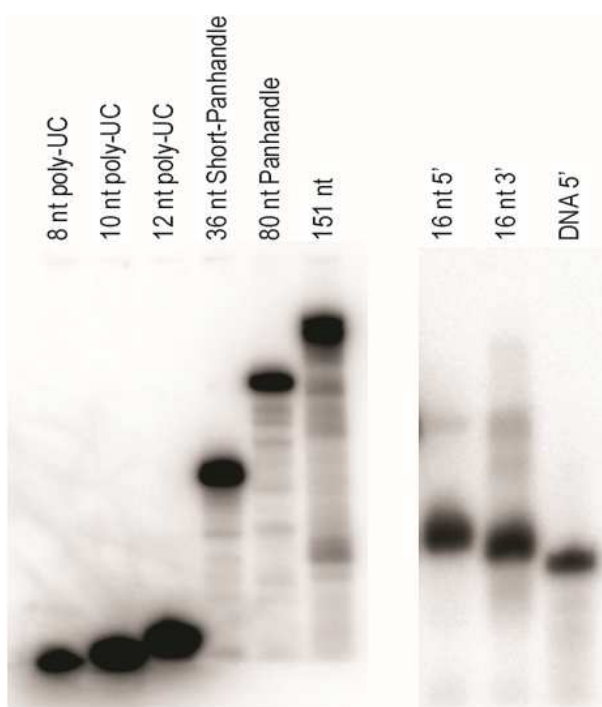


Figure 79 : Résultats des marquages au P^{32} des ARN visualisés sur gel polyacrylamide 8 M urée.

Protéine et ARN sont mélangés dans une série de tubes dans lesquels la concentration en ARN marqué est constante mais la concentration protéine est croissante. La filtration sur membrane de nitrocellulose permet de retenir toutes les protéines. L'ARN étant marqué, seules les protéines ayant fixé l'ARN fourniront un signal. Le système 96 puits permet de réaliser les mesures en triplicat et de réaliser la titration des affinités simultanément sur la même membrane.

En comparaison avec la méthode classique de filtration à une membrane de nitrocellulose, le système à double filtration ajoute une membrane de DEAE sépharose sous la membrane de nitrocellulose (Figure

80.A). Cette seconde membrane piège tous les ARN qui n'ont pas été fixés sur la membrane de nitrocellulose, c'est-à-dire, les ARN libres qui n'ont pas été fixés par la protéine.

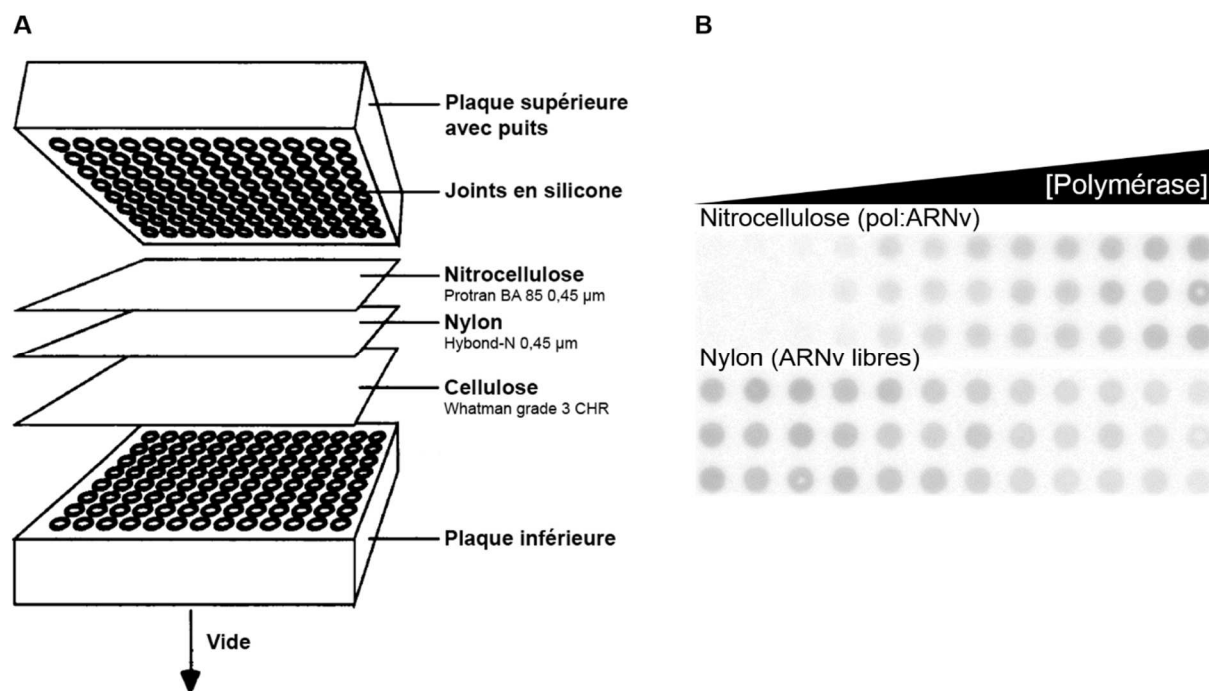


Figure 80 : Principe du FBA à double filtration (A) et visualisation des résultats de filtration (B).

Après une incubation de 10 min à température ambiante, les mélanges ARN:ARN-polymérase tronquée sont déposés sur le système de filtration et la filtration est lancée. Après lavage avec le tampon réactionnel, les membranes sont séchées à l'air libre et exposées dans une cassette d'exposition contre un film radiosensible. Le film est scanné et l'intensité des points correspondant aux différentes conditions sur chaque membrane est enregistrée (Figure 80.B). Les valeurs relevées sur la membrane de DEAE retenant les ARN libres permettent de s'affranchir de la fraction d'ARN non liée et de calculer la fraction d'ARN liée spécifique. Les données sont ensuite analysées par une régression linéaire et un K_d apparent est déterminé à partir des courbes obtenues.

5.3.3.B CONFIRMATION DES AFFINITES POUR LES EXTREMITES CONSERVEES

Des dilutions en série de l'ARN-polymérase tronquée ont été réalisées dans lesquelles est ajoutée une concentration constante d'ARN marqué radioactivement au P^{32} . L'augmentation de la fraction d'ARN liée suit celle de la concentration en ARN-polymérase tronquée (PA-PB1-PB2Nter) avant d'atteindre un plateau tendant vers 1 (100 % d'ARN lié) (Figure 81, à gauche). Portées sur une échelle logarithmique, les courbes d'affinité forment une sigmoïde caractéristique (Figure 81, à droite). Les conditions contrôles ont été réalisées avec des ARN quelconques (poly-UC) de différentes tailles (Figure 79). Comme attendu, aucune affinité n'a été observée pour ces ARN contrôles. Les affinités obtenues en FBA fournissent un K_d apparent subnanomolaire de 0,6 nM entre l'ARN-polymérase tronquée et l'extrémité 5' conservée (Figure 81.A, courbe bleue). Comme en anisotropie de fluorescence, l'affinité entre l'ARN-polymérase tronquée et l'extrémité 3' conservée apparaît plus faible avec un K_d apparent égal à 20 nM (Figure 81.A, courbe rouge). L'ensemble des valeurs d'affinité obtenues sont rassemblées dans le Tableau 6. Les K_d obtenus sont donc du même ordre que ceux obtenus en anisotropie de fluorescence et confirment une plus faible affinité entre l'ARN-polymérase tronquée et l'extrémité 3'.

Tableau 6 : Affinités mesurées par FBA. La qualité des données d'affinité est évaluée par l'erreur standard en nM et le R^2 . ND (Non Détecté) indique l'absence d'affinité.

		Kd (nM)	Erreur standard (nM)	R^2
ARN-polymérase tronquée	5' ARNv	0,6	0,11	0,94
	3' ARNv	20	2,5	0,94
	ARN Short-Panhandle	9,6	1,51	0,95
	ARN Panhandle	3,8	0,35	0,96
PA-PB1 Δ Cter	5' ARNv	1,8	0,3	0,95
	3' ARNv	ND	ND	ND

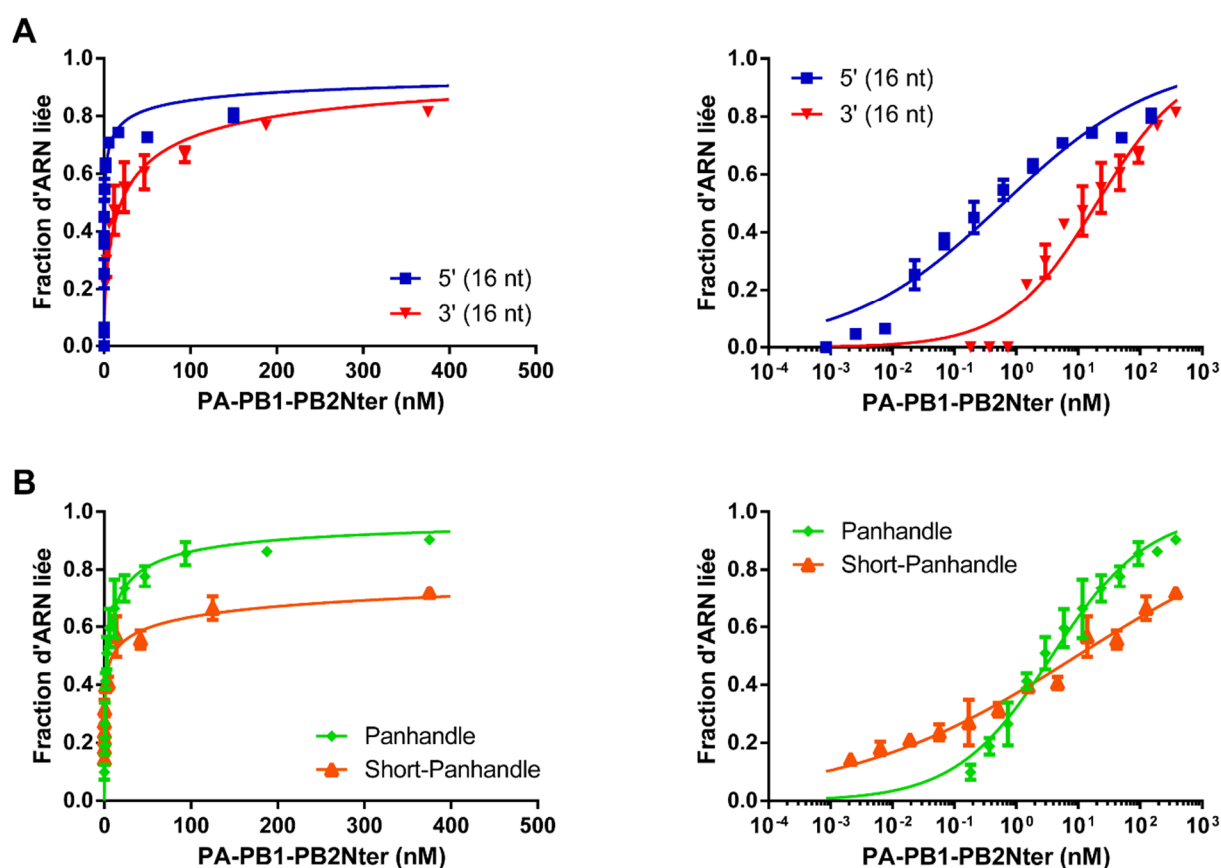


Figure 81 : Courbes des affinités mesurées par FBA entre l'ARN-polymérase tronquée et différents ARN. La fraction d'ARN liée est représentée en fonction de la concentration en ARN-polymérase tronquée. Des concentrations croissantes d'ARN-polymérase sont incubées avec 0,1 nM d'ARN radioactif à température ambiante. La concentration de l'ARN-polymérase tronquée est portée sur une échelle logarithmique à droite de la figure (courbes sigmoïdiennes). **A/** Fixation de l'ARN-polymérase tronquée à un ARN simple brin correspondant à l'extrémité conservée 3' (courbes rouges) ou 5' (courbes bleues). **B/** Fixation de l'ARN-polymérase tronquée à deux ARN mimant l'ARN viral (Panhandle, courbes vertes et Short-Panhandle, courbes orange).

5.3.3.C CONFIRMATION DE L'IMPLICATION DE PB2NTER DANS LA FIXATION DE L'EXTREMITE 3'

Comme en anisotropie de fluorescence, aucune affinité entre la construction PA-PB1 Δ Cter et l'extrémité 3' de l'ARN n'a pu être détectée en FBA (Figure 82.A et B). Ces résultats confirment les résultats d'anisotropie et donc l'implication de la partie N-terminale de PB2 et / ou de PB1Cter dans la fixation du promoteur 3'.

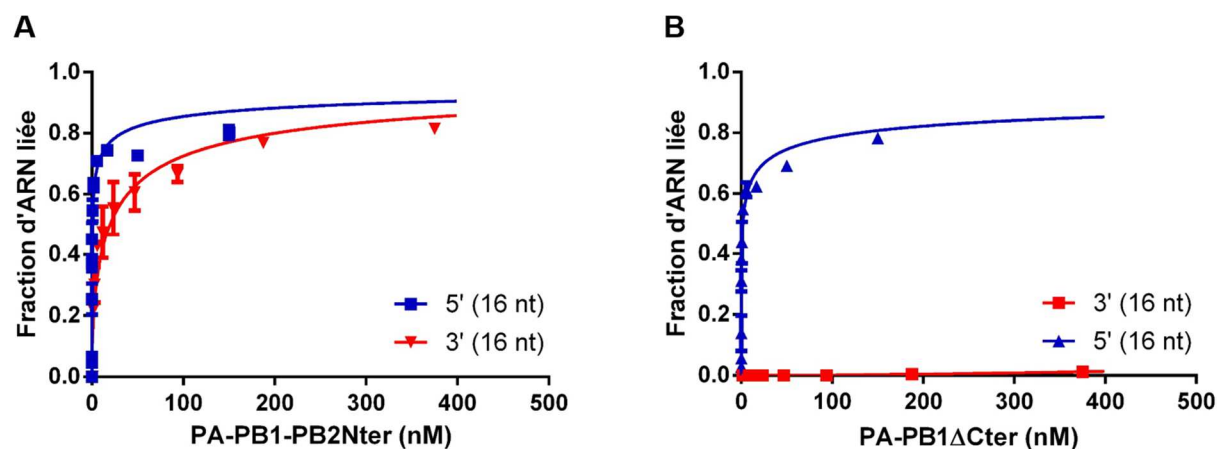


Figure 82 : Affinités de l'ARN-polymérase pour les extrémités 3' et 5' conservées en présence (A) et en absence (B) de PB2Nter. La fraction d'ARN liée est représentée en fonction de la concentration d'ARN-polymérase tronquée (A, présence de PB2Nter) ou de PA-PB1 Δ Cter (B, absence de PB2Nter). Des concentrations croissantes d'ARN-polymérase sont incubées avec 0,1 nM d'ARN radioactif à température ambiante.

5.3.3.D AFFINITE POUR DES ARN « PANHANDLE »

Les mêmes mesures ont été réalisées avec des ARN mimant l'ARNv présentant les deux extrémités 5' et 3' conservées. Ces deux ARN présentent une structure de type tige-boucle « panhandle » mais sont de tailles différentes (Figure 75.E et F). En présence des deux extrémités conservées, l'ARN-polymérase présente des K_d intermédiaires selon la longueur de l'ARN utilisé (Figure 81.B). L'affinité de l'ARN-polymérase tronquée pour l'ARN panhandle de 80 nt est de l'ordre de 4 nM (Figure 81.B, courbe verte). Son affinité pour le Short-panhandle de 36 nt est plus faible avec un K_d de l'ordre de 10 nM (Figure 81.B, courbe orange).

Si la courbe d'affinité pour l'ARN Panhandle portée sur échelle logarithmique présente une forme sigmoïdienne caractéristique, celle du Short-panhandle adopte une forme linéaire. Ce comportement pourrait venir de la structure très fermée en tige-boucle couplée à la petite taille du Short panhandle. Ses extrémités conservées 5' et 3' ne sont séparées que d'une courte séquence d'une dizaine de nucléotides ayant pour effet de maintenir les extrémités 5' et 3' à proximité l'une de l'autre. Cette proximité pourrait entraîner une tendance à un réappariement du 5' et du 3' qui pourrait expliquer la progressivité de la fixation par rapport à celle observée avec l'ARN Panhandle. Il pourrait s'agir d'une compétition entre l'extrémité 3' et l'ARN-polymérase pour la fixation de l'extrémité 5'.

A l'inverse, l'ARN Panhandle est plus long (80 nt contre 36 nt). Ses extrémités 5' et 3' sont plus espacées quand elles ne sont plus appariées limitant ainsi leur réappariement et autorisant également des conformations où le 5' est déjà libre en solution. Ces hypothèses quant à la disponibilité des extrémités conservées pourraient être à l'origine des différences observées dans les profils de fixation du Panhandle et du Short-panhandle par l'ARN-polymérase tronquée.

5.3.4 DISCUSSION SUR LES AFFINITES

Les coefficients de Hill estimés lors des calculs d'affinité (en FBA et en anisotropie de fluorescence) sont tous inférieurs à 0 traduisant une coopérativité négative : une fois qu'un site de fixation de l'ARN-polymérase est occupé par un ARN, il perd son affinité pour les autres ARN du même type.

Le processus de marquage radioactif des ARN pour la mesure des affinités en FBA implique une déphosphorylation complète de l'extrémité 5' suivie d'une phosphorylation avec un phosphate radioactif P^{32} conduisant à la formation d'ARN monophosphate. Des mesures d'affinité en anisotropie de fluorescence ont été réalisées avec un ARN 5' triphosphate et comparées aux mesures effectuées avec un ARN de séquence identique mais présentant une extrémité 5' monophosphate. Aucune différence d'affinité n'a été observée entre l'ARN 5' triphosphate et l'ARN 5' monophosphate. Ce contrôle effectué en anisotropie de fluorescence valide les tests effectués en FBA.

Les doubles mesures en FBA et en anisotropie de fluorescence ont montré que l'ARN-polymérase tronquée possède une affinité significativement plus haute pour l'extrémité 5' que pour l'extrémité 3'. Jamais jusqu'à présent, une étude ne s'était intéressée à la mesure quantitative de l'affinité entre l'ARN-polymérase et les extrémités ARN promotrices 3' et 5' individuelles. Une étude récente (Tomescu et al., 2014) a pu fournir des mesures d'affinité des extrémités simple brin 3' et 5' individuelles pour le trimère de l'ARN-polymérase complet. Les résultats de ces travaux montrent une affinité de l'hétérotrimère complet pour l'extrémité 5' (~ 2 nM) du même ordre que celle obtenue avec l'ARN-polymérase tronquée. Par contre, Tomescu et al. montrent une activité pour l'extrémité 3' de l'ordre du micromolaire radicalement plus faible que celle obtenue avec l'ARN-polymérase tronquée (entre 20 et 40 nM).

La concentration en sel utilisée lors des mesures peut expliquer cette différence d'affinité. En effet, différentes concentrations en sel ont été testées lors de la mise au point des mesures d'affinité, en FBA et en anisotropie de fluorescence mettant en évidence une forte influence de la concentration en sel sur l'affinité de fixation. Une concentration en sel supérieure à 300 mM NaCl tend à diminuer les affinités alors qu'une concentration inférieure à 300 mM tend à augmenter l'affinité et provoque des interactions non spécifiques. Tomescu et al. ont mené des mesures d'affinité à une concentration de 500 mM NaCl alors que les affinités pour l'ARN-polymérase tronquée ont été mesurées à 300 mM NaCl rendant les mesures difficilement comparables. Cette différence de concentration en sel pourrait par conséquent être à l'origine des variations d'affinité constatées.

Une région du complexe indispensable à la fixation de l'extrémité 3' a également pu être identifiée. Cette région intègre le domaine d'interaction de PB1 avec PB2 et la partie N-terminale de PB2. Ces résultats suggèrent que la partie N-terminale de PB2 est impliquée dans la fixation de l'extrémité 3' soit via une interaction directe, soit en provoquant un changement conformationnel du complexe PA-PB1 qui permettrait sa fixation. La fixation de l'extrémité 5' n'étant pas affectée par l'absence de cette région, l'ensemble des résultats suggèrent donc que l'extrémité 5' se fixe au niveau du complexe PA-PB1, soit sur PA, soit sur PB1, soit à l'interface entre les deux.

Les affinités pour des ARN de type « Panhandle » mimant les ARN viraux prennent des valeurs intermédiaires à celles obtenues respectivement pour les extrémités 3' et 5'. Les affinités obtenues pour l'ARN Panhandle sont significativement plus hautes que celles rapportées pour la sous-unité PB1 (González and Ortín, 1999b). Le contexte de fixation sur une sous-unité isolée est bien évidemment très différent de celui d'un complexe et PB1 seule doit probablement afficher un comportement différent d'un hétérotrimère. Les sous-unités PA et PB2 ont d'ailleurs été décrites pour être impliquées dans la fixation des régions promotrices (Fodor et al., 1993, 1994).

Une affinité plus forte a été obtenue avec l'ARN Panhandle le plus long suggérant une corrélation entre l'affinité et la longueur des ARN. La plus faible affinité observée avec un ARN Panhandle court pourrait s'expliquer par une proximité plus importante des extrémités 3' et 5' qui créerait une compétition entre l'extrémité 3' de l'ARN et l'ARN-polymérase pour la fixation du 5'.

Extrapolées à l'échelle des mécanismes de transcription et de réplication, les données d'affinité obtenues peuvent être la source de plusieurs idées concernant ces processus. Lors de la transcription (cf. mécanisme § 1.4.1, p 27), la haute affinité entre l'extrémité 5' et l'ARN-polymérase assurerait qu'elle reste fixée à l'ARN-polymérase durant la phase d'élongation et durant celle de synthèse de la queue poly-A. La plus faible affinité entre l'extrémité 3' et l'ARN-polymérase permettrait le déplacement de cette extrémité nécessaire à la lecture du brin par l'ARN-polymérase alors que la plus forte affinité pour l'extrémité 5' assurerait que l'extrémité 3' reste fixée durant l'élongation. Cette suggestion s'appuie sur des résultats semblant indiquer que la présence de l'extrémité 5' augmente l'affinité pour l'extrémité 3' (González and Ortín, 1999a, 1999b). Plusieurs modèles ont été décrits pour le processus de réplication (cf. modèles § 1.4.2, p 28). Tous les modèles ont en commun d'imposer que les extrémités 5' et 3' soient séparées durant la synthèse d'ARNc. A l'issue de la synthèse, l'extrémité 5' de l'ARNv doit être relâchée par l'ARN-polymérase sur laquelle il est fixé, qu'il s'agisse d'une polymérase résidente ou non-résidente, pour permettre à l'ARN-polymérase répliquative de terminer la copie du segment d'ARNv jusqu'à la fin de l'extrémité 5'. Dans le modèle dit en *trans* (Resa-Infante et al., 2011), la plus faible affinité entre l'extrémité 3' et l'ARN-polymérase faciliterait le relargage initial de l'extrémité 3' et sa fixation par une autre ARN-polymérase pour la réplication. Il est très probable que d'autres facteurs *in vivo* interviennent. Par exemple, l'interaction avec l'extrémité 3' pourrait être stabilisée par la présence de nucléotides initiateurs ou de courts ARNv correspondant à l'extrémité 5' des segments d'ARNv et qui sont exprimés en grande quantité dans les cellules infectées (Perez et al., 2010).

Le choix a été fait de tester les affinités pour des ARN adoptant une structure de type « tige-boucle » (Panhandle). Les investigations pourront se poursuivre en testant l'affinité de l'ARN-polymérase tronquée pour des ARN adoptant les structures des deux autres modèles proposés (Figure 74).

Comme cela a été mentionné et observé dans l'étude de l'activité de synthèse d'ARN, le manganèse déstabilise l'ARN-polymérase. Cette déstabilisation conduirait à moduler sa capacité de fixation à la matrice d'ARN. Les affinités présentées dans ce manuscrit ont été mesurées sans manganèse. Des mesures d'affinité en présence et en absence du cation divalent Mn^{2+} pourraient être envisagées pour vérifier l'existence d'une modulation de l'affinité pour l'ARN en lien avec la fixation de manganèse.

DISTRIBUTION CELLULAIRE DES IONS METALLIQUES

LORS D'UNE INFECTION PAR LE VIRUS DE LA GRIPPE

6.1	STRATEGIE DE MESURE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES	130
6.1.1	STRATEGIE EXPERIMENTALE ET PREPARATION DES CELLULES.....	130
6.1.2	DESSICCATION PAR LA METHODE DU POINT CRITIQUE	131
6.1.3	FLUORESCENCE DES RAYONS-X	132
6.2	DISTRIBUTION DU MANGANESE CELLULAIRE LORS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS INFLUENZA A	133
6.2.1	DISTRIBUTION DU MN DANS LES CELLULES NON INFECTEES	133
6.2.2	DISTRIBUTION DU MN LORS DE L'INFECTION	135
6.2.3	QUANTIFICATION DU MANGANESE CELLULAIRE.....	136
6.3	DISCUSSION ET CONCLUSION	137

Les résultats des études fonctionnelles ont montré que la concentration en ions manganèse et magnésium influence fortement les activités catalytiques *in vitro* de l'ARN-polymérase tronquée du virus influenza. La dépendance pour le manganèse de l'activité endonucléase, déjà décrite pour le domaine isolé (Crepin et al., 2010; Dias et al., 2009), a été confirmée sur l'ARN-polymérase tronquée. Les tests de synthèse d'ARN ont montré que l'activité de synthèse d'ARN est également ion-dépendante, une activité de synthèse étant observée en présence d'ions magnésium et manganèse. La plus haute activité est mesurée en présence d'ions manganèse et un effet coopératif semble exister en présence des deux cations.

Pour deux de ses trois activités principales, l'ARN-polymérase semble avoir une prédilection pour le manganèse. Il est connu que les ions manganèse sont principalement présents dans les mitochondries et dans le noyau des cellules (Hiromu Sakurai et al., 1985; Maynard and Cotzias, 1955) où l'ARN-polymérase est active. Des protéines du virus de la grippe produites durant l'infection (PB1-F2, Chen et al., 2001) ont été décrites pour interagir avec la mitochondrie et des travaux récents ont constaté un afflux de calcium extracellulaire durant l'infection par le virus influenza A (Ueda et al., 2010). Ces résultats suggèrent des changements dans la distribution et la concentration des ions métalliques lors de l'infection.

A l'heure actuelle, la distribution des ions métalliques dans les cellules infectées par le virus de la grippe est très peu documentée. De plus, la concentration basale en ions métalliques dans les cellules communément utilisées pour les expériences d'infection demeure inconnue.

Pour étudier cet aspect de l'infection, la fluorescence spécifique des ions observée en microscopie rayons-X a été utilisée pour examiner leur distribution et leur concentration durant un cycle d'infection par le virus influenza A. Lorsqu'un élément est soumis à un rayonnement-X, il émet un rayonnement de fluorescence à une énergie qui lui est propre. L'énergie de ce rayonnement étant différente pour chaque

élément, elle permet de les discriminer les uns des autres tout en les cartographiant au niveau des zones soumises au rayonnement-X.

Ce projet a été l'occasion de coupler données de biologies structurales et données cellulaires.

6.1 STRATEGIE DE MESURE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES

6.1.1 STRATEGIE EXPERIMENTALE ET PREPARATION DES CELLULES

Initialement, des tests préliminaires avaient été effectués sur des cellules congelées. La glace qui se formait lors de la congélation gênait la mesure et les manipulations des cellules congelées étaient laborieuses. Une autre méthode a donc été employée.

Le principe de l'expérience consiste à mesurer la fluorescence spécifique des ions métalliques cellulaires à différents temps après infection (0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h et 8 h). Pour cela, des cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549) ont étéensemencées sur des supports spécifiques en nitrure de silicium (Si_3N_4) pour la microscopie rayons-X (Figure 83.A), infectées après une adsorption de 2 h à 4 °C et fixées au paraformaldéhyde aux temps correspondants. Les temps d'infection sont décomptés après l'adsorption virale. Les mesures ont été faites en duplicat.

Le principal objectif était d'observer la distribution du manganèse dans le but d'établir des liens entre la dépendance pour cet ion observée *in vitro* et sa distribution dans la cellule infectée. Pour rester aussi proche que possible du contexte cellulaire physiologique, il était indispensable de réaliser une série de mesures à la concentration cellulaire basale de manganèse.

Dans l'hypothèse où la concentration basale en manganèse n'aurait pas permis d'obtenir un signal de fluorescence d'une intensité suffisante, une seconde série de mesures a été réalisée en parallèle sur des cellules cultivées en milieu complémenté en manganèse (10 μM). Cette complémentation ne s'est pas révélée nécessaire, la concentration cellulaire physiologique en manganèse ayant permis d'obtenir un signal de fluorescence suffisant. Seuls les résultats concernant les cellules non complémentées seront donc présentés ici.

Après fixation au paraformaldéhyde et déshydratation à l'acétone, les cellules subissent une dessiccation par la méthode dite du point critique.

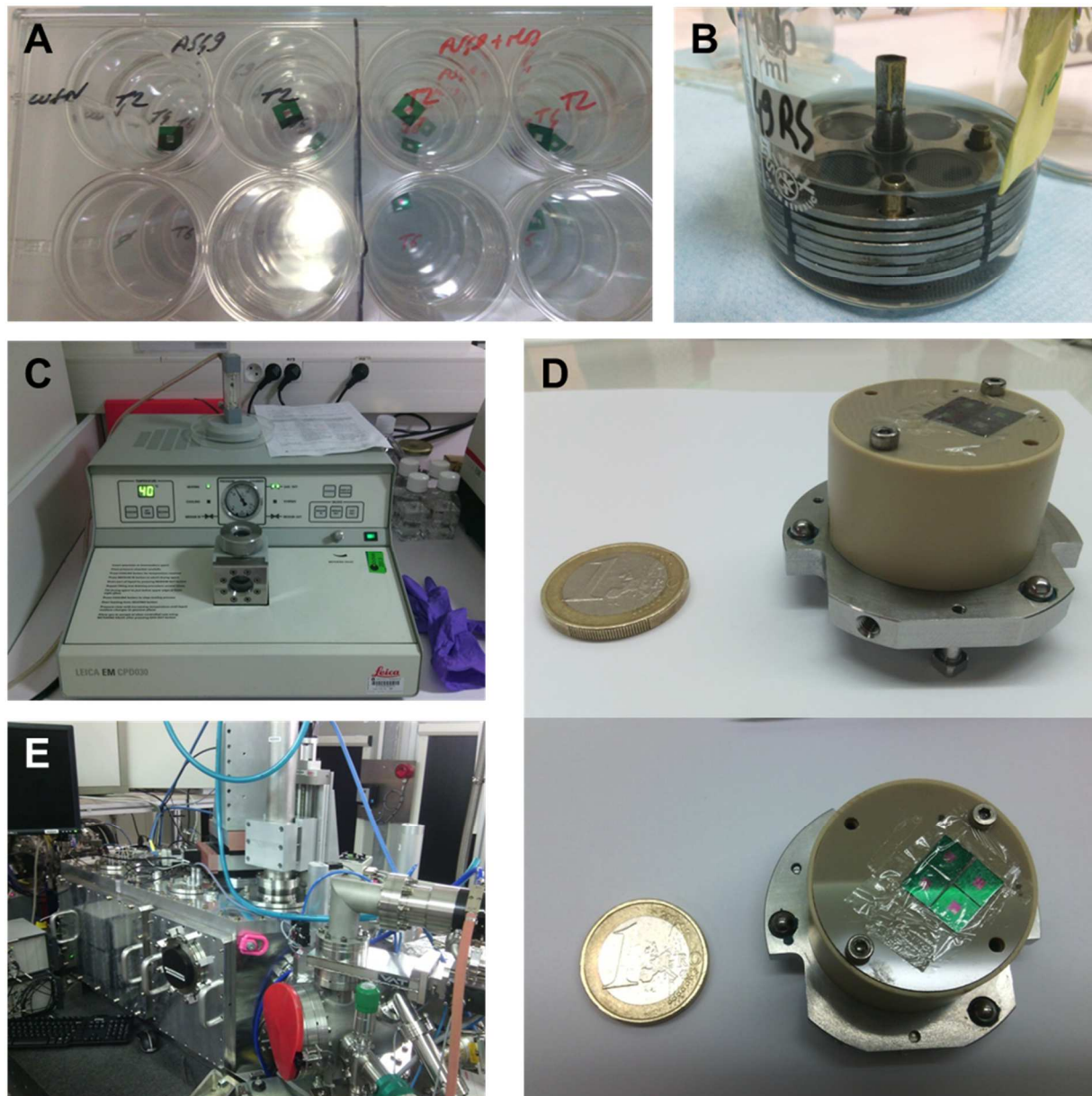


Figure 83 : Préparation des échantillons pour la microscopie rayons-X. Les cellules sont cultivées sur des supports spécifiques en nitrure de silicium dans des boîtes de culture six puits (A). Après déshydratation dans l'acétone, les supports sont rangés dans un porte-échantillons (B) qui est inséré dans un dessiccateur (C) pour procéder à la dessiccation par la méthode du point critique. Les supports sont ensuite placés sur une plaque ronde de plastique et recouvert d'un film d'Ultralène pour éviter les projections de matériel biologique (D). La plaque plastique est ensuite vissée sur un porte-échantillon (D) et l'ensemble est introduit dans un sas de mise sous vide (E, capot rouge) puis dans la chambre du microscope à rayons-X (E, capot noir).

6.1.2 DESSICCATION PAR LA METHODE DU POINT CRITIQUE

Un objet biologique contient beaucoup d'eau. Dans le vide du microscope rayons-X, l'eau va s'évaporer violemment en créant des tensions superficielles qui risquent de détériorer fortement la structure des échantillons, en particulier celle des cellules. Ces tensions superficielles sont similaires à celles que l'on peut rencontrer lors d'un procédé de séchage à l'air. Le procédé de dessiccation par la méthode du point critique permet de s'affranchir de ces forces de tensions superficielles.

Une fois fixé au paraformaldéhyde (PFA) et déshydraté à l'acétone, l'échantillon est introduit avec le milieu de déshydratation dans l'enceinte sous pression du dessiccateur (Figure 83.C) dans laquelle le milieu (acétone) est échangé contre un fluide de substitution (CO₂ dans cette préparation). Après cela, l'étape

de séchage intervient : l'enceinte et le liquide de substitution sont chauffés, faisant monter la pression dans l'enceinte. Lorsque le point critique est atteint (31°C et 73,8 bar pour le CO₂), le liquide de substitution passe directement en phase gazeuse sans franchir de limite de phase. L'échantillon est ainsi séché sans les détériorations susceptibles d'être provoquées par les tensions superficielles qui se manifestent lors d'un séchage à l'air.

N.B. : Au niveau de la sécurité biologique lors de la manipulation de virus entier, une déshydratation préalable de l'échantillon évite l'éclatement cellulaire lors de la mise sous vide et donc des projections de matériel biologique.

Après dessiccation, les échantillons sont prêts à être introduits dans le microscope à rayons-X (Figure 83.E). Pour cela, ils sont collés sur une plaque plastique trouée, la fenêtre de nitrure de silicium sur laquelle se trouvent les cellules étant placée au-dessus d'un trou. La plaque portant les supports est vissée sur un porte-échantillon (Figure 83.D) qui est ensuite introduit dans un sas de mise sous vide et transféré dans la chambre du microscope à rayons-X.

6.1.3 FLUORESCENCE DES RAYONS-X

La microscopie rayons-X est un moyen très sensible pour cartographier la répartition de différents éléments à faible concentration et haute résolution dans les cellules. Pour observer la distribution des ions métalliques dans la cellule, la fluorescence intrinsèque spécifique de chaque ion métallique soumis à un rayonnement-X a été mesurée sur la ligne ID21 à l'ESRF (Figure 84) (Grenoble).

Le principe de la fluorescence rayon-X est basé sur l'irradiation des atomes avec des rayons-X d'une énergie suffisante pour éjecter un électron d'une couche électronique par effet photoélectrique. L'atome est alors dans un état excité, la perte d'un électron ayant rendu sa structure électronique instable. Lors du processus de relaxation, la désexcitation se fait par une transition électronique : un électron d'un niveau plus élevé va prendre la place laissée vacante par l'électron qui a été éjecté. Cette transition électronique s'accompagne de l'émission d'un photon X ou photon de fluorescence. L'énergie du rayonnement émis est caractéristique de l'élément qui a été excité rendant possible son identification.

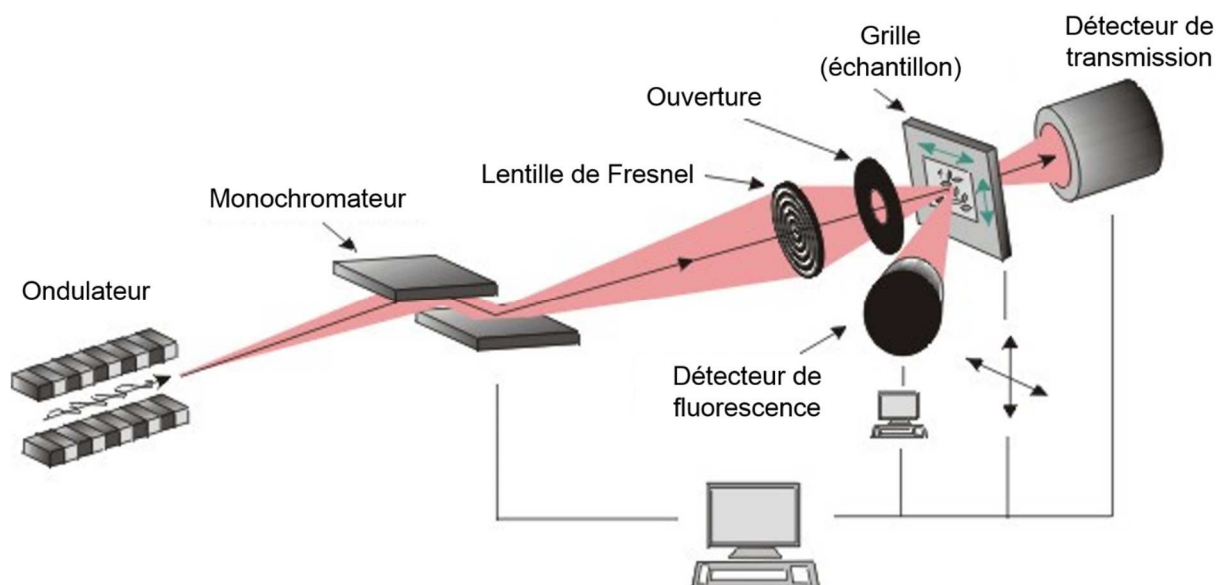


Figure 84 : Organisation schématique de la ligne ID21. Un monochromateur est utilisé pour sélectionner l'énergie du faisceau rayons-X. Le faisceau monochromatique est ensuite focalisé grâce à une lentille de Fresnel. L'échantillon est aligné dans le plan focal de la lentille de Fresnel et scanné par le faisceau de rayons-X pour la collecte de données en 2D. Le signal transmis ainsi que le spectre de fluorescence total est enregistré pour chaque pixel de la zone scannée.

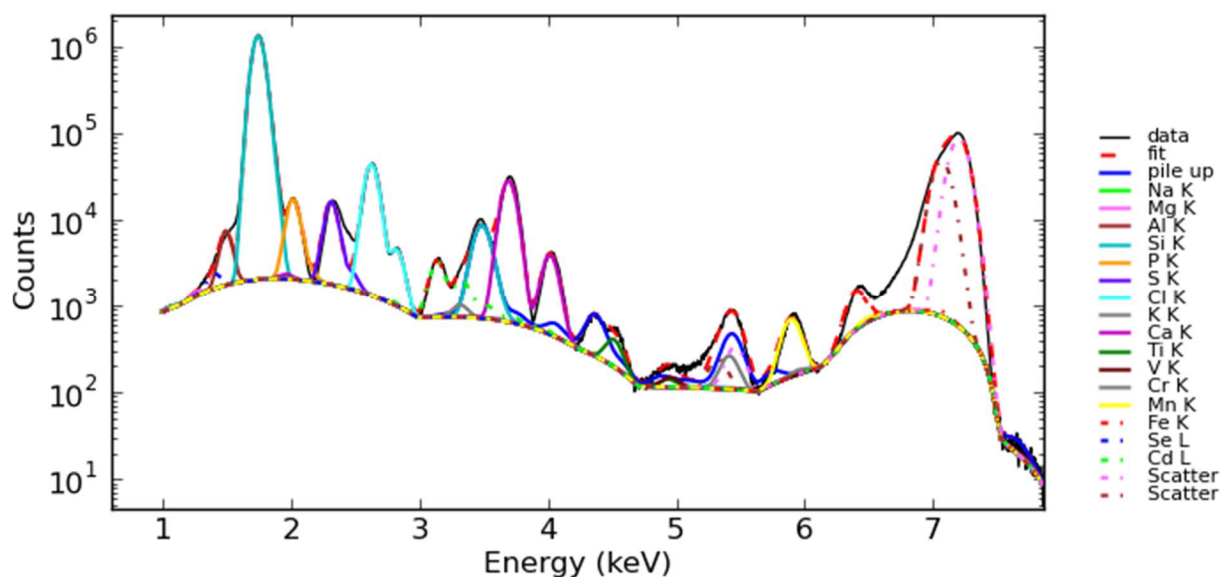


Figure 85 : Spectre global de fluorescence des rayons-X d'une zone irradiée correspondant à l'aire occupée par une cellule. Un spectre global est enregistré pour chaque pixel de cette zone. Soumis à un rayonnement X, un élément émet un rayonnement (photon de fluorescence) caractéristique à une énergie particulière rendant possible son identification. La courbe globale de fluorescence des rayons-X (data, courbe noire) est analysée (fit, courbe rouge) pour permettre d'attribuer un élément à chaque pic. Les différents éléments sont indiqués en légende à droite du spectre. Des pics d'empilement (pile up, courbe bleue) et de diffusion (scatter, pointillés) sont également visibles.

Le détecteur du microscope rayons-X enregistre un spectre total de fluorescence composé des rayonnements de fluorescence spécifiques de plusieurs éléments pour chaque pixel d'une zone irradiée (Figure 85). Il est ainsi possible non seulement d'identifier la composition atomique d'un échantillon mais aussi de la cartographier. Les mesures ont été réalisées sur des aires de 100 x 100 μm et cartographiées par pas de 500 nm. Deux cartographies par condition au minimum ont été réalisées.

De cette manière, la distribution intracellulaire des ions métalliques a pu être étudiée à différents temps après infection par le virus influenza A. Les résultats présentés dans ce manuscrit se focalisent sur la distribution du manganèse.

6.2 DISTRIBUTION DU MANGANESE CELLULAIRE LORS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS INFLUENZA A

6.2.1 DISTRIBUTION DU MN DANS LES CELLULES NON INFECTÉES

Les noyaux cellulaires sont matérialisés par la fluorescence du phosphore (P) (Figure 86, P, couleur bleue). A l'intérieur des noyaux, des points plus intenses apparaissent et correspondent aux nucléoles. Les nucléoles sont visibles en microscopie optique et la confrontation des images de microscopie (Figure 88, p 136) et des cartographies de fluorescence du phosphore confirment qu'il s'agit bien des nucléoles. Les nucléoles sont des sous-compartiments du noyau dans lesquels se produit, entre autres processus, la transcription des ARN ribosomiaux. Le signal de fluorescence du Mn^{2+} dans la cellule non infectée (Figure 86, Mn, couleur rouge) se superpose parfaitement au point bleu de plus forte intensité suggérant une localisation du Mn^{2+} principalement dans les nucléoles (Figure 86, P & Mn).

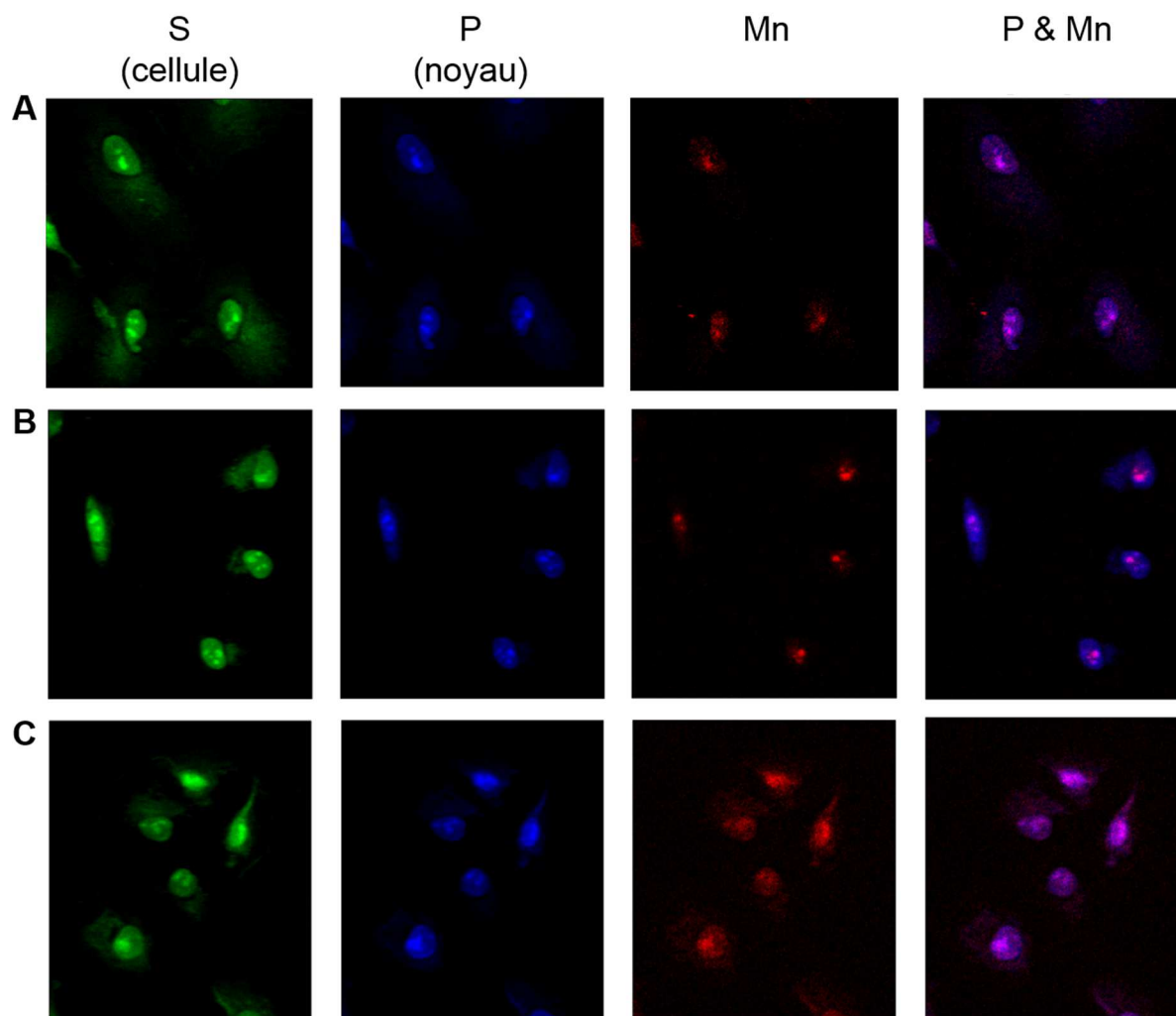


Figure 86 : Cartographie du signal de fluorescence des rayons-X de différents éléments de cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549). Le signal de fluorescence du soufre (S), phosphore (P) et manganèse (Mn) a été cartographié sur trois zones appartenant à trois grilles de microscopie rayons-X différentes (A, B et C). Le signal du soufre (S) permet de délimiter la cellule alors que celui du phosphore (P) permet de délimiter les noyaux.

A titre de comparaison, le magnésium, quant à lui, semble réparti sur l'ensemble de la cellule. Cela vérifie les informations relatives à la distribution de cet élément selon lesquelles le magnésium est complexé à de multiples molécules (ATPase, protéines membranaires, ADN, ARN, membranes cellulaire et nucléaire) et est séquestré par des organelles subcellulaires (mitochondrie et réticulum endoplasmique) (McCarthy and Rajiv, 1999). Cependant, les conditions de l'expérience ne sont pas idéales pour la détection de la fluorescence du Mg^{2+} . En effet, le pic de fluorescence du magnésium est à basse énergie et se recoupe avec la base du pic de fluorescence du silicium qui compose les supports. Sa cartographie et sa quantification peuvent donc être entachées d'erreurs. Malgré tout, sa quantification globale sera quand même utilisée pour être comparée avec celle du manganèse.

6.2.2 DISTRIBUTION DU MN LORS DE L'INFECTION

Lors de l'infection par le virus influenza, la localisation du Mn^{2+} semble évoluer avec le temps. Les mouvements du Mn^{2+} semblent se produire à des temps très avancés après infection et s'orienteraient en direction du cytoplasme. Ces déplacements commencent à être visibles 4 h après adsorption (Figure 87, T4). L'intensité de fluorescence du Mn^{2+} au niveau des nucléoles semble diminuer. Localement, des « projections » du signal de fluorescence du Mn^{2+} apparaissent dans le cytoplasme en périphérie du noyau. A 6 et 8 h après adsorption, des concentrations locales en Mn^{2+} sont clairement visibles à proximité du noyau alors que l'intensité de fluorescence du Mn^{2+} a largement diminué au niveau des nucléoles (Figure 87, T6 et T8). Les cellules contrôles (mock) non infectées après 6 h conservent une localisation du Mn^{2+} au niveau des nucléoles et valident les observations.

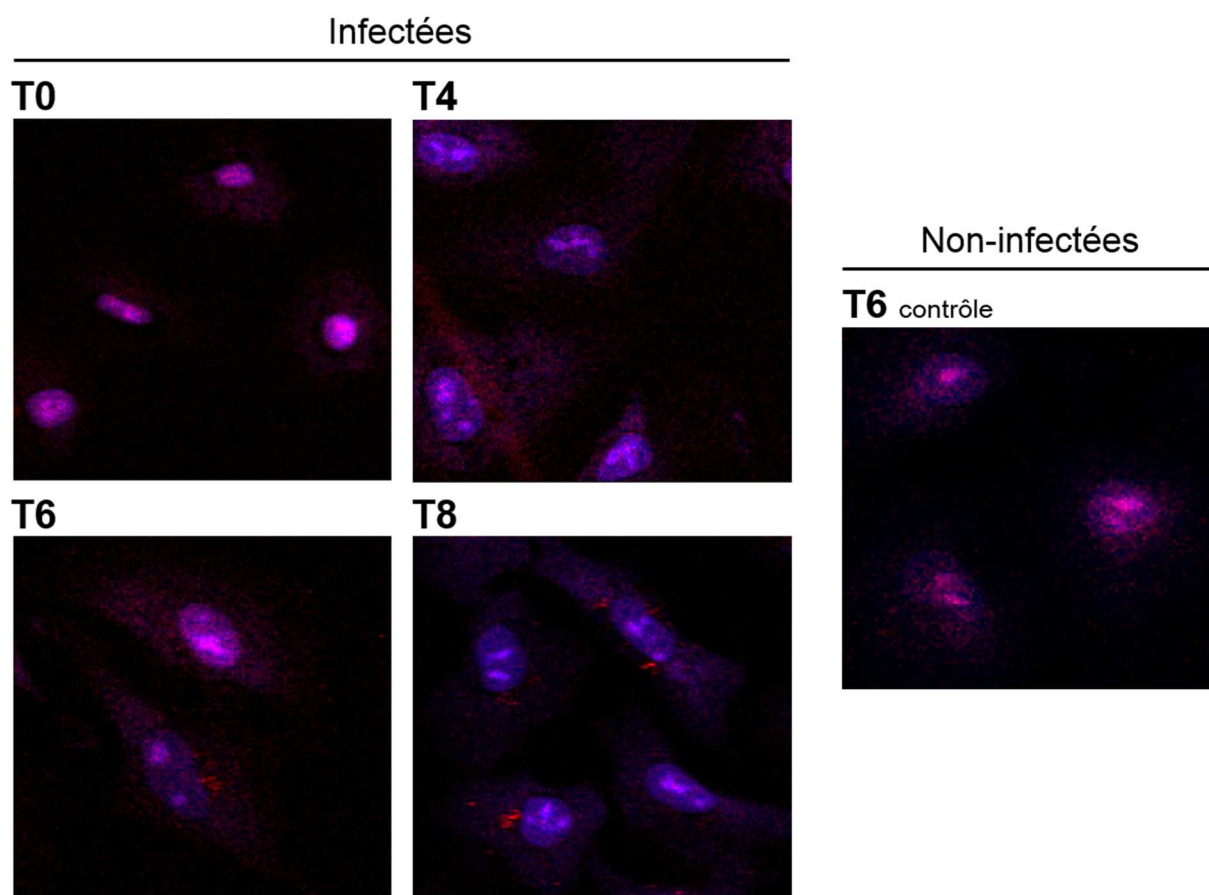


Figure 87 : Distribution du manganèse dans la cellule avant et pendant l'infection par un virus influenza A. Les signaux de fluorescence du phosphore (bleu) et du manganèse (rouge) à différents temps de l'infection (T0, T4, T6 et T8) sont cartographiés. Les cartographies des temps T0,5, T1 et T2 sont identiques à la cartographie du temps T0 et ne sont pas présentées. La cartographie de fluorescence de cellules non infectées correspondant au temps T6 est montrée en contrôle (Mock).

Après irradiation, un cliché des cellules qui ont été soumises au rayonnement-X est réalisé en microscopie optique (Figure 88). Ce cliché permet de vérifier l'intégrité des structures cellulaires, en particulier du noyau et des nucléoles qui apparaissent intacts.

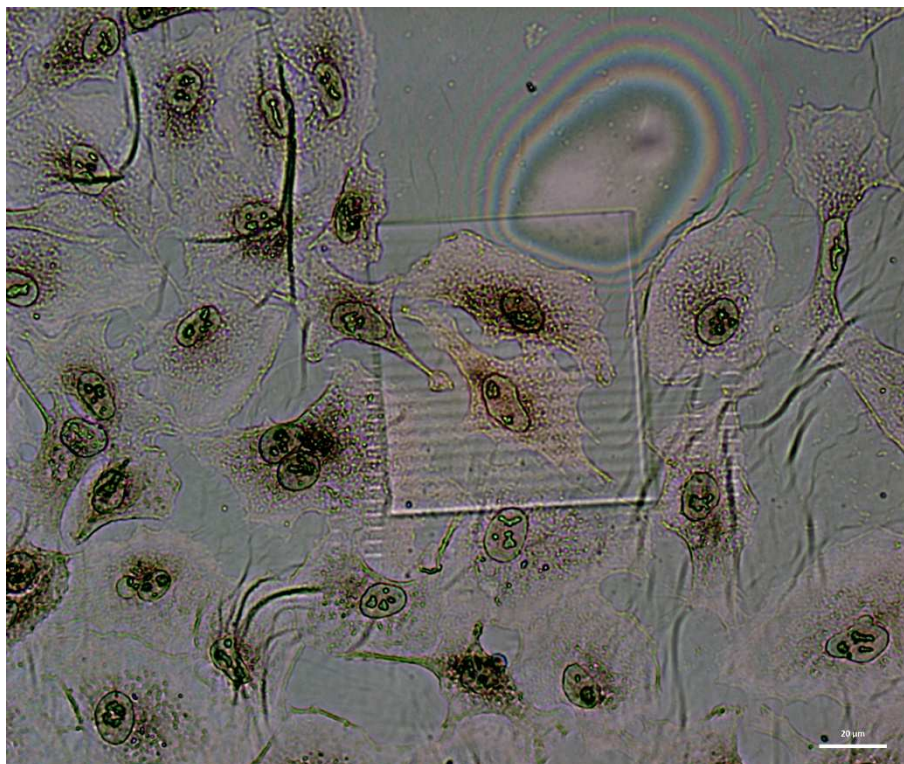


Figure 88 : Image de microscopie optique des cellules (au temps T6) après irradiation aux rayons-X. Ces cellules correspondent aux cellules infectées 6 h après adsorption (T6). La marque de forme carrée visible autour des cellules correspond aux dommages causés par l'irradiation sur le film d'Ultralène recouvrant l'échantillon. Les réflexions de lumières sont également causées par le film d'Ultralène. La barre d'échelle correspond à 20 µm.

6.2.3 QUANTIFICATION DU MANGANESE CELLULAIRE

Le traitement des données de quantification est en cours au moment de l'écriture du manuscrit. Il se fait grâce à un échantillon standard de référence composé d'éléments en quantités précisément calibrées (Bovine Liver, National Institute of Standards and Technology). Les données préliminaires de quantification ont permis d'estimer, au niveau du noyau, une concentration de magnésium 100 à 500 fois supérieure à celle du manganèse. Ce rapport est en accord avec les données disponibles estimant la concentration de magnésium au niveau du millimolaire et celle du manganèse à quelques dizaines de micromolaires (Bertini and Sigel, 2001; Chen et al., 2012; Schramm, 1986; Tholey et al., 1988; Vettori et al., 1999). Les données sont en cours de traitement pour obtenir une concentration précise de manganèse dans les différents compartiments cellulaires.

6.3 DISCUSSION ET CONCLUSION

L'expérience de microscopie rayons-X visait à renseigner deux points. Le premier point concernait la distribution de l'ion manganèse dans une cellule utilisée pour les expériences d'infection par le virus influenza A. La complémentation des cultures en Mn^{2+} ne s'est pas révélée nécessaire puisque la concentration physiologique en manganèse était suffisante pour obtenir un signal de fluorescence spécifique. L'analyse des cartographies de fluorescence du Mn^{2+} a montré que le manganèse était majoritairement nucléaire, localisé dans des sous-structures du noyau qui correspondent aux nucléoles. L'information sur la localisation du manganèse dans la cellule était capitale pour déterminer le contexte ionique de base au moment où le virus infecte la cellule. L'information spatiale sera complétée par les données quantitatives qui sont en cours au moment de l'écriture de ce manuscrit. Des études en neurobiologie avaient déjà indiqué une haute concentration de manganèse dans les nucléoles de neurones et de cellules gliales (Morello et al., 2008).

Le deuxième point concernait la distribution du manganèse lors d'une infection par le virus influenza de type A. Des changements dans la localisation du manganèse ont été observés et sont visibles 4 h après adsorption. Différents temps intermédiaires seront nécessaires dans de futures expériences pour affiner le temps d'apparition des premiers déplacements de Mn^{2+} après adsorption. Au cours de l'infection, le manganèse quitte les nucléoles pour se diriger dans le cytoplasme au sein duquel il semble diffuser avant de former des points de concentration locale à des temps plus avancés (6 à 8 h après adsorption). Les points de plus forte concentration en Mn^{2+} semblent stationner principalement à proximité du noyau. Dans les cellules humaines alvéolaires, un lien entre le manganèse et l'infection par le virus de la grippe semble donc exister. Ces résultats, couplés à ceux obtenus *in vitro* pour les activités de l'ARN-polymérase, établissent un lien clef entre le manganèse et le virus influenza. Pour comparer les contextes d'infection, d'autres cellules animales, en particulier des cellules aviaires, pourraient être étudiées.

L'infection semble donc entraîner une modification de la distribution du manganèse cellulaire qui, à l'origine se trouvait au niveau des nucléoles. Ces déplacements suggèrent, par extrapolation, qu'une interaction existerait entre des protéines du virus influenza et les nucléoles. Ces structures dynamiques subnucléaires sans membrane sont surtout connues pour leur rôle dans la synthèse des ARN ribosomiaux. Pourtant, les nucléoles possèdent de nombreux autres rôles, tels que la maturation des précurseurs ARNt, la réponse cellulaire au stress, l'extinction de gènes, la sénescence et la régulation du cycle cellulaire (Hiscox, 2007; Olson, 2004, 2009; Olson and Dundr, 2005; Olson et al., 2002; Wang et al., 2010). Les nucléoles semblent aussi être impliqués dans le métabolisme des ARN (Huang et al., 1998) et des ARNm épissés ont été retrouvés dans les nucléoles (Pendle et al., 2005; Wang et al., 2010). La présence d'ARNm associée à celle du manganèse, feraient des nucléoles une cible de choix pour le virus de la grippe lors des étapes de transcription et du vol de coiffe.

L'interaction entre le nucléole et les virus est un phénomène commun à plusieurs virus dont les virus à ADN, les rétrovirus et les virus à ARN (Hiscox, 2007; Wang et al., 2010). Il a été décrit que la structure du nucléole changeait lors d'une infection par un adénovirus et que deux de ses protéines virales impliquées dans la réplication interagissaient avec une protéine du nucléole (B23) (Hindley et al., 2007). Plusieurs protéines d'herpesvirus ont été décrites pour transiter par les nucléoles. Parmi les virus à ARN, le virus de la maladie de Borna a été décrit pour utiliser le nucléole comme site de réplication (Pyper et al., 1998). La protéine Rev du virus HIV est également localisée dans les nucléoles (Fankhauser et al., 1991; Kubota et al., 1999). D'autres virus comme le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) ont un effet sur l'architecture des nucléoles et cause l'arrêt du cycle cellulaire (Chen et al., 2002; Dove et al., 2006a, 2006b; Wurm et al., 2001). Quant au virus de la grippe, une perturbation du protéome nucléolaire

a été décrite (Emmott et al., 2010). De plus, la protéine NS1 pourrait se localiser au niveau du nucléole (Melén et al., 2007, 2012; Volmer et al., 2010) et une interaction des RNP avec une protéine nucléolaire majeure, la nucléophosmine, a été mise en évidence (Mayer et al., 2007). La perturbation de l'architecture et de la fonction des nucléoles semble être commune aux virus ciblant les nucléoles. La fuite de manganèse des nucléoles observée pourrait s'expliquer par un dérèglement des fonctions des nucléoles lors de l'infection par le virus influenza.

Différents motifs d'import nucléolaire (NoLS) ont été décrits. Jusqu'à présent, aucune séquence d'import nucléolaire conservée n'a été identifiée dans des protéines virales. Cependant, parmi les protéines virales circulant par les nucléoles, des motifs similaires aux NoLS ont été découverts (Rowland and Yoo, 2003; Rowland et al., 2003; Wang et al., 2010) comme ceux identifiés chez NS1 (Melén et al., 2012). La recherche de ces motifs au sein d'autres protéines du virus influenza devra être envisagée. Dans le même sens, une recherche d'interactions entre les protéines virales et des protéines spécifiques du nucléole pourrait être réalisée.

Des espèces réactives oxygénées semblent être impliquées dans les mécanismes d'apoptose induits par l'infection par le virus influenza (Chaturvedi et al., 2004; Demasi, 2007; Knobil et al., 1998). Le manganèse est également impliqué dans les mécanismes de stress oxydatifs en lien avec l'apoptose à travers la superoxyde dismutase (MnSOD). Les mouvements du manganèse pourraient aussi être reliés à ce mécanisme.

La distribution d'autres ions métalliques pourrait être modifiée lors de l'infection. Des pic calciques ont d'ailleurs déjà été rapportés lors de l'infection par le virus influenza (Ueda et al., 2010). Cependant, dans les conditions de l'expérience, aucune évolution dans la distribution du calcium n'a été observée lors de l'infection par le virus influenza A. Le calcium reste confiné majoritairement sur l'ensemble du noyau sans mouvement particulier.

Les liens étroits qui associent le virus de la grippe et le noyau des cellules infectées sont connus depuis longtemps. Les résultats obtenus par microscopie rayons-X montrent une fuite du manganèse des nucléoles vers le cytoplasme suggérant une interaction entre les protéines du virus influenza et les nucléoles. Ce phénomène ayant déjà été établi pour des virus à ARN, de plus profondes investigations seront nécessaires pour établir des liens entre la fuite du manganèse et la possible interaction des protéines virales et des nucléoles.

CONCLUSION GENERALE

L'hétérotrimère de l'ARN-polymérase ARN-dépendante du virus de la grippe constitue la clef de voûte du processus infectieux en orchestrant les processus réplicatifs et transcriptionnels conduisant à la prolifération virale. De nombreux laboratoires se sont heurtés à la difficulté de l'exprimer de manière recombinante et en grande quantité. Pour contourner ce problème, une nouvelle stratégie, unique et originale, a été mise en place. Elle a permis, pour la première fois d'obtenir des quantités importantes de l'hétérotrimère sous une forme tronquée et a été le point de départ d'un ambitieux projet visant à l'étudier sous les versants structuraux et fonctionnels pour comprendre les mécanismes moléculaires qui lui sont associés. Jusqu'à présent, personne au monde n'avait réussi à produire ce complexe en quantité convenable pour l'étudier structuralement. La caractérisation du complexe a fait l'objet d'une approche pluridisciplinaire tant sur le plan structural que fonctionnel qui a été extrêmement enrichissante. Les techniques majeures de biologie structurale ont été exploitées et le comportement du complexe ainsi que ses activités ont pu être vérifiés par un large panel de méthodes d'analyses biochimiques et enzymologiques. Enfin, l'étude de la distribution du manganèse menée sur des cellules infectées par le virus de la grippe a fourni l'opportunité d'intégrer les données biochimiques et biophysiques à l'échelle de la cellule entière.

Le système d'expression a permis d'exprimer une ARN-polymérase recombinante tronquée à 70 % au niveau de sa sous-unité PB2 mais n'a pas permis l'expression de l'hétérotrimère complet. Cette impasse entraîne de nombreuses questions. Les différentes constructions réalisées font converger l'origine du problème vers une région de PB2 en amont du domaine de fixation de la coiffe. L'intégration de tout ou partie de cette région engendre des baisses radicales d'expression des autres sous-unités de l'ARN-polymérase du virus influenza A. L'identification précise du problème d'expression fait encore l'objet d'un travail intensif du laboratoire. L'activité endonucléase portée par PA ne semble pas participer à ces problèmes d'expression puisque la version sauvage pour cette activité s'exprime aussi bien que la version mutante (PA-E80A). Une activité protéolytique a été décrite sur la sous-unité PA (Sanz-Ezquerro et al., 1995) et pourrait avoir un lien avec les problèmes rencontrés. Il est possible que l'ajout de la sous-unité PB2 puisse activer, par un changement de conformation, le site protéolytique de PA et conduire à la baisse d'expression globale observée mais cette hypothèse est peu probable. En effet, l'activité protéolytique devrait avoir des effets sur d'autres protéines, comme celles du baculovirus, ce qui ne semble pas être le cas puisque sa prolifération n'est pas affectée.

Afin d'obtenir la structure de la sous-unité PB1, une étude des différentes constructions a été réalisée et a permis de concevoir une construction minimale pour l'obtention de PB1 (PACter-PB1 Δ Cter). Cette construction a donné l'opportunité d'étudier PB1 complexée avec la partie C-terminale de PA à basse résolution à travers des expériences de diffusion aux petits angles (SAXS) et en cristallographie des rayons-X. La qualité des cristaux obtenus de PACter-PB1 Δ Cter n'a pas permis d'obtenir un jeu de données suffisant pour résoudre une structure à haute résolution, mais une reconstruction tridimensionnelle est en cours à 7,7 Å de résolution. Elle pourra être confrontée à l'enveloppe SAXS obtenue. La découverte à la fin des années 2000 du variant de PB1, PB1-N40 amène de nombreuses interrogations quant à la possibilité d'exprimer la sous-unité PB1 seule et soluble. Tronquée des 39 aa N-terminaux de PB1, PB1-N40 a été décrite pour n'avoir aucune interaction avec la sous-unité PA (Hutchinson et al., 2009; Wise et al., 2011) suggérant qu'elle se comporte seule. Or les différents tests d'expression ont montré que la partie C-terminale de PA était essentielle à la stabilisation de PB1. La

stabilisation de PB1-N40 dans la cellule est peut-être établie par d'autres partenaires qui, s'ils sont identifiés, pourraient permettre d'exprimer la sous-unité PB1 et autoriser son étude structurale à plus haute résolution.

L'ARN-polymérase tronquée produite se comporte en dimère en solution. Cette dimérisation est rompue en présence d'ARN, suggérant une dimérisation artefactuelle en raison de l'absence de la sous-unité PB2. Les différentes reconstructions de l'hétérotrimère tronqué témoignent d'une organisation compacte des sous-unités de l'ARN-polymérase tronquée malgré l'absence de soixante-dix pour cent de PB2. Il semble aussi que la fixation de l'ARN entraîne un changement conformationnel de l'ARN-polymérase qui adopterait une structure plus ouverte.

Un accent particulier a été mis sur l'interaction entre l'ARN-polymérase et l'ARN. Les affinités obtenues ont montré que l'ARN-polymérase tronquée possède une affinité significativement plus haute pour la région conservée 5' que pour la région conservée 3'. Cette différence peut s'expliquer en extrapolant ces données d'affinité aux mécanismes transcriptionnels et réplcatifs. Lors de la transcription, la haute affinité pour l'extrémité 5' assurerait sa fixation à l'ARN-polymérase durant l'élongation alors que l'affinité plus faible pour l'extrémité 3' autoriserait son déplacement nécessaire à la lecture du brin par l'ARN-polymérase. Concernant la réplication, ces données d'affinités semblent être en accord avec le modèle dit en *trans* décrivant le mécanisme réplcatif. En effet, la plus faible affinité entre l'extrémité 3' et l'ARN-polymérase faciliterait le relargage initial de l'extrémité 3' et sa fixation par une autre ARN-polymérase pour la réplication. L'extrémité 5', quant à elle, resterait fortement fixée à l'ARN-polymérase non réplcative avant d'être relâchée à la fin de la réplication. Par ailleurs, une région indispensable à la fixation de l'extrémité 3' a pu être identifiée, région qui impliquerait les parties C-terminale de PB1 et N-terminale de PB2.

Les études fonctionnelles ont mis en évidence un rôle important du manganèse. De même que l'activité endonucléase, déjà décrite sur le domaine endonucléase isolé, est strictement manganèse dépendante, l'ARN-polymérase montre une claire préférence pour le manganèse lors des tests d'activité de synthèse d'ARN. La coopérativité observée entre magnésium et manganèse suggère l'existence de sites spécifiques à chaque ion comme cela semble être le cas pour d'autres ARN-polymérase (Mönttinen et al., 2012; Poranen et al., 2008). La faible activité de l'ARN-polymérase n'a pas permis la détermination des paramètres enzymologiques classiques. Ce problème pourrait, selon toute vraisemblance, provenir d'une absence de relargage du brin néo-synthétisé qui resterait prisonnier de l'ARN-polymérase après sa synthèse. La raison tient probablement au fait que PB2 est absente. Ce problème rappelle aussi qu'un fossé gigantesque existe entre des enzymes recombinantes utilisées *in vitro* et la réalité biologique.

Le rôle du manganèse constaté dans les activités de l'ARN-polymérase *in vitro*, sa localisation au niveau nucléaire et ses déplacements observés lors de l'infection par le virus influenza A tendent à renforcer sinon à confirmer l'idée que le manganèse joue un rôle clef dans le cycle d'infection du virus de la grippe. Les informations sur sa localisation dans les nucléoles des cellules humaines alvéolaires a permis de renseigner le contexte cellulaire impliquant cet ion au moment de l'infection. La localisation nucléaire du manganèse est en accord avec les besoins en Mn^{2+} de l'ARN-polymérase. Sa localisation subnucléaire dans les nucléoles suggère qu'une interaction entre des protéines du virus (ARN-polymérase ?) et les structures nucléolaires pourrait exister. En effet, la fuite du manganèse depuis les nucléoles vers le cytoplasme pendant l'infection entraîne de nombreuses interrogations quant aux liens qui sont susceptibles d'exister entre le nucléole et les protéines du virus influenza. Plusieurs protéines du virus de la grippe telles que NS1 ou PB1-F2 semblent détourner des mécanismes cellulaires clefs. Il est donc envisageable qu'elles interagissent avec les nucléoles, pièces maîtresses de la machinerie cellulaire. De

plus, d'autres virus à ARN ont déjà été décrits pour se répliquer spécifiquement dans le nucléole ou interagir avec des protéines nucléolaires. L'hypothèse d'une interaction entre le virus de la grippe et le nucléole ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes d'infection. Les expériences *in vitro* et *in vivo* ont permis d'établir des liens entre le rôle du manganèse, sa localisation et ses déplacements cellulaires durant l'infection, témoignant s'il le fallait, de la complémentarité des études biochimiques, structurales et cellulaires.

BIBLIOGRAPHIE

Abergel, C. (2004). Spectacular improvement of X-ray diffraction through fast desiccation of protein crystals. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 1413–1416.

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

Albertini, A.A.V., Wernimont, A.K., Muziol, T., Ravelli, R.B.G., Clapier, C.R., Schoehn, G., Weissenhorn, W., and Ruigrok, R.W.H. (2006). Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313, 360–363.

Albo, C., Valencia, A., and Portela, A. (1995). Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J. Virol.* 69, 3799–3806.

An, Y., Meresse, P., Mas, P.J., and Hart, D.J. (2011). CoESPRIT: a library-based construct screening method for identification and expression of soluble protein complexes. *PloS One* 6, e16261.

Aramini, J.M., Ma, L.-C., Zhou, L., Schauder, C.M., Hamilton, K., Amer, B.R., Mack, T.R., Lee, H.-W., Ciccocanti, C.T., Zhao, L., et al. (2011). Dimer interface of the effector domain of non-structural protein 1 from influenza A virus: an interface with multiple functions. *J. Biol. Chem.* 286, 26050–26060.

Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., and Ortín, J. (2004). 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 308–313.

Artenstein, A.W. (2009). *Vaccines: A Biography: A Biography* (Springer Science & Business Media).

Arzt, S., Baudin, F., Barge, A., Timmins, P., Burmeister, W.P., and Ruigrok, R.W. (2001). Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology* 279, 439–446.

Babu, Y.S., Chand, P., Bantia, S., Kotian, P., Dehghani, A., El-Kattan, Y., Lin, T.H., Hutchison, T.L., Elliott, A.J., Parker, C.D., et al. (2000). BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J. Med. Chem.* 43, 3482–3486.

Bae, S.H., Cheong, H.K., Lee, J.H., Cheong, C., Kainosho, M., and Choi, B.S. (2001). Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10602–10607.

Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* 35, 235–241.

Bancroft, C.T., and Parslow, T.G. (2002). Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *J. Virol.* 76, 7133–7139.

Battye, T.G.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R., and Leslie, A.G.W. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 271–281.

- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., and Ruigrok, R.W. (1994). Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J.* 13, 3158.
- Beaton, A.R., and Krug, R.M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6282–6286.
- Bedford, T., Cobey, S., Beerli, P., and Pascual, M. (2010). Global migration dynamics underlie evolution and persistence of human influenza A (H3N2). *PLoS Pathog.* 6, e1000918.
- Bertini, I., and Sigel, A. (2001). *Handbook on Metalloproteins* (CRC Press).
- Beveridge, W.I.B. (1977). *Influenza: The Last Great Plague : an Unfinished Story of Discovery* (Heinemann).
- Biswas, S.K., Boutz, P.L., and Nayak, D.P. (1998). Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J. Virol.* 72, 5493–5501.
- Blanquet, S., Fayat, G., and Waller, J.P. (1974). The mechanism of action of methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. Mechanism of the amino-acid activation reaction catalyzed by the native and the trypsin-modified enzymes. *Eur. J. Biochem. FEBS* 44, 343–351.
- Bogs, J., Veits, J., Gohrbandt, S., Hundt, J., Stech, O., Breithaupt, A., Teifke, J.P., Mettenleiter, T.C., and Stech, J. (2010). Highly pathogenic H5N1 influenza viruses carry virulence determinants beyond the polybasic hemagglutinin cleavage site. *PloS One* 5, e11826.
- Bornholdt, Z.A., and Prasad, B.V.V. (2006). X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 559–560.
- Bornholdt, Z.A., and Prasad, B.V.V. (2008). X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Nature* 456, 985–988.
- Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W.H., and Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* 124, 12–21.
- Bouloy, M., Plotch, S.J., and Krug, R.M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4886–4890.
- Broor, S., Krishnan, A., Roy, D.S., Dhakad, S., Kaushik, S., Mir, M.A., Singh, Y., Moen, A., Chadha, M., Mishra, A.C., et al. (2012). Dynamic Patterns of Circulating Seasonal and Pandemic A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses From 2007–2010 in and around Delhi, India. *PLoS ONE* 7, e29129.
- Brownlee, G.G., and Sharps, J.L. (2002). The RNA polymerase of influenza a virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter. *J. Virol.* 76, 7103–7113.
- Bruenn, J.A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 31, 1821–1829.
- Bulletin of the World Health Organization (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull. World Health Organ.* 58, 585–591.

Bulletin of the World Health Organization (1985). Current status of amantadine and rimantadine as anti-influenza-A agents: memorandum from a WHO meeting. *Bull. World Health Organ.* 63, 51–56.

Bullido, R., Gómez-Puertas, P., Albo, C., and Portela, A. (2000). Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. *J. Gen. Virol.* 81, 135–142.

Bush, R.M., Bender, C.A., Subbarao, K., Cox, N.J., and Fitch, W.M. (1999). Predicting the evolution of human influenza A. *Science* 286, 1921–1925.

Calder, L.J., Wasilewski, S., Berriman, J.A., and Rosenthal, P.B. (2010). Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 10685–10690.

Chakrabarti, A.K., and Pasricha, G. (2013). An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. *Virology* 440, 97–104.

Chan, J., Holmes, A., and Rabadan, R. (2010). Network analysis of global influenza spread. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1001005.

Charron, C., Kadri, A., Robert, M.-C., Giegé, R., and Lorber, B. (2002). Crystallization in the presence of glycerol displaces water molecules in the structure of thaumatin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 2060–2065.

Chaturvedi, U.C., Shrivastava, R., and Upreti, R.K. (2004). Viral infections and trace elements : A complex interaction. *Curr. Sci.* 87, 1536–1554.

Chen, G.L., and Subbarao, K. (2009). Live attenuated vaccines for pandemic influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 333, 109–132.

Chen, B.J., Leser, G.P., Jackson, D., and Lamb, R.A. (2008). The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J. Virol.* 82, 10059–10070.

Chen, G.-W., Chang, S.-C., Mok, C., Lo, Y.-L., Kung, Y.-N., Huang, J.-H., Shih, Y.-H., Wang, J.-Y., Chiang, C., Chen, C.-J., et al. (2006). Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1353–1360.

Chen, H., Wurm, T., Britton, P., Brooks, G., and Hiscox, J.A. (2002). Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J. Virol.* 76, 5233–5250.

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

Chen, Y., Farquhar, E.R., Chance, M.R., Palczewski, K., and Kiser, P.D. (2012). Insights into Substrate Specificity and Metal Activation of Mammalian Tetrahedral Aspartyl Aminoamidase. *J. Biol. Chem.* 287, 13356–13370.

- Chenavas, S., Monod, A., Ruigrok, R.W., and Crépin, T. (2013a). Le complexe de transcription et de réplication des virus influenza, une cible pour de nouvelles molécules antivirales. *Virologie* 17, 6–16.
- Chenavas, S., Estrozi, L.F., Slama-Schwok, A., Delmas, B., Di Primo, C., Baudin, F., Li, X., Crépin, T., and Ruigrok, R.W.H. (2013b). Monomeric Nucleoprotein of Influenza A Virus. *PLoS Pathog.* 9, e1003275.
- Cheng, A., Wong, S.M., and Yuan, Y.A. (2009). Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res.* 19, 187–195.
- Cheong, H.K., Cheong, C., Lee, Y.S., Seong, B.L., and Choi, B.S. (1999). Structure of influenza virus panhandle RNA studied by NMR spectroscopy and molecular modeling. *Nucleic Acids Res.* 27, 1392–1397.
- Chevalier, C., Al Bazzal, A., Vidic, J., Février, V., Bourdieu, C., Bouguyon, E., Le Goffic, R., Vautherot, J.-F., Bernard, J., Moudjou, M., et al. (2010). PB1-F2 influenza A virus protein adopts a beta-sheet conformation and forms amyloid fibers in membrane environments. *J. Biol. Chem.* 285, 13233–13243.
- Chu, C.M., Dawson, I.M., and Elford, W.J. (1949). Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus. *Lancet* 1, 602.
- Claas, E.C., de Jong, J.C., van Beek, R., Rimmelzwaan, G.F., and Osterhaus, A.D. (1998a). Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine* 16, 977–978.
- Claas, E.C., Osterhaus, A.D., van Beek, R., De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F., and Webster, R.G. (1998b). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472–477.
- Coloma, R., Valpuesta, J.M., Arranz, R., Carrascosa, J.L., Ortín, J., and Martín-Benito, J. (2009). The Structure of a Biologically Active Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex. *PLoS Pathog.* 5, e1000491.
- Compans, R.W., and Choppin, P.W. (1975). Reproduction of Myxoviruses. In *Comprehensive Virology*, H. Fraenkel-Conrat, and R.R. Wagner, eds. (Springer US), pp. 179–252.
- Compans, R.W., Content, J., and Duesberg, P.H. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J. Virol.* 10, 795–800.
- Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G., and Paulson, J.C. (1994). Receptor Specificity in Human, Avian, and Equine H2 and H3 Influenza Virus Isolates. *Virology* 205, 17–23.
- Crépin, T., Dias, A., Palencia, A., Swale, C., Cusack, S., and Ruigrok, R.W.H. (2010). Mutational and Metal Binding Analysis of the Endonuclease Domain of the Influenza Virus Polymerase PA Subunit. *J. Virol.* 84, 9096–9104.
- Cros, J.F., and Palese, P. (2003). Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* 95, 3–12.

- Cros, J.F., García-Sastre, A., and Palese, P. (2005). An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic Cph. Den.* 6, 205–213.
- Csernoch, L., Bernengo, J.C., Szentesi, P., and Jacquemond, V. (1998). Measurements of Intracellular Mg²⁺ Concentration in Mouse Skeletal Muscle Fibers with the Fluorescent Indicator Mag-Indo-1. *Biophys. J.* 75, 957–967.
- Degelau, J., Somani, S.K., Cooper, S.L., Guay, D.R., and Crossley, K.B. (1992). Amantadine-resistant influenza A in a nursing facility. *Arch. Intern. Med.* 152, 390–392.
- DeLuca, D.S., Keskin, D.B., Zhang, G.L., Reinherz, E.L., and Brusic, V. (2011). PB1-F2 Finder: scanning influenza sequences for PB1-F2 encoding RNA segments. *BMC Bioinformatics* 12 Suppl 13, S6.
- Demasi, A.R. (2007). *Cellular Signaling and Apoptosis Research* (Nova Publishers).
- Deng, T., Vreede, F.T., and Brownlee, G.G. (2006). Different De Novo Initiation Strategies Are Used by Influenza Virus RNA Polymerase on Its cRNA and Viral RNA Promoters during Viral RNA Replication. *J. Virol.* 80, 2337–2348.
- Desselberger, U., Racaniello, V.R., Zazra, J.J., and Palese, P. (1980). The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* 8, 315–328.
- Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., and Ruigrok, R.W.H. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458, 914–918.
- Doan, L., Handa, B., Roberts, N.A., and Klumpp, K. (1999). Metal ion catalysis of RNA cleavage by the influenza virus endonuclease. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 5612–5619.
- Donald, H.B., and Isaacs, A. (1954). Counts of influenza virus particles. *J. Gen. Microbiol.* 10, 457–464.
- Dove, B., Brooks, G., Bicknell, K., Wurm, T., and Hiscox, J.A. (2006a). Cell cycle perturbations induced by infection with the coronavirus infectious bronchitis virus and their effect on virus replication. *J. Virol.* 80, 4147–4156.
- Dove, B.K., You, J.-H., Reed, M.L., Emmett, S.R., Brooks, G., and Hiscox, J.A. (2006b). Changes in nucleolar morphology and proteins during infection with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Cell. Microbiol.* 8, 1147–1157.
- Du, X., Dong, L., Lan, Y., Peng, Y., Wu, A., Zhang, Y., Huang, W., Wang, D., Wang, M., Guo, Y., et al. (2012). Mapping of H3N2 influenza antigenic evolution in China reveals a strategy for vaccine strain recommendation. *Nat. Commun.* 3, 709.
- Dubois, J., Terrier, O., and Rosa-Calatrava, M. (2014). Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less. *mBio* 5, e00070–14.

- Dudek, S.E., Wixler, L., Nordhoff, C., Nordmann, A., Anhlan, D., Wixler, V., and Ludwig, S. (2011). The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity. *Biol. Chem.* 392, 1135–1144.
- Dundon, W.G. (2012). Variability among the neuraminidase, non-structural 1 and PB1-F2 proteins in the influenza A virus genome. *Virus Genes* 44, 363–373.
- Dupeux, F., Röwer, M., Seroul, G., Blot, D., and Márquez, J.A. (2011). A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 915–919.
- Dutkowski, R., Thakrar, B., Froehlich, E., Suter, P., Oo, C., and Ward, P. (2003). Safety and pharmacology of oseltamivir in clinical use. *Drug Saf. Int. J. Med. Toxicol. Drug Exp.* 26, 787–801.
- Eichelberger, M.C., and Wan, H. (2014). Influenza Neuraminidase as a Vaccine Antigen. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J., and Digard, P. (2001). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J. Virol.* 75, 408–419.
- Emmott, E., Wise, H., Loucaides, E.M., Matthews, D.A., Digard, P., and Hiscox, J.A. (2010). Quantitative proteomics using SILAC coupled to LC-MS/MS reveals changes in the nucleolar proteome in influenza A virus-infected cells. *J. Proteome Res.* 9, 5335–5345.
- Enami, M., Sharma, G., Benham, C., and Palese, P. (1991). An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185, 291–298.
- Engelhardt, O.G., Smith, M., and Fodor, E. (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* 79, 5812–5818.
- Englund, J.A., Champlin, R.E., Wyde, P.R., Kantarjian, H., Atmar, R.L., Tarrand, J., Yousuf, H., Regnery, H., Klimov, A.I., Cox, N.J., et al. (1998). Common emergence of amantadine- and rimantadine-resistant influenza A viruses in symptomatic immunocompromised adults. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 26, 1418–1424.
- Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., Detitta, G.T., Dekker, N., and Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* 357, 289–298.
- Falcón, A.M., Marión, R.M., Zürcher, T., Gómez, P., Portela, A., Nieto, A., and Ortín, J. (2004). Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J. Virol.* 78, 3880–3888.
- Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P., and Laemmli, U.K. (1991). Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2567–2575.
- Ferrari, E., Wright-Minogue, J., Fang, J.W., Baroudy, B.M., Lau, J.Y., and Hong, Z. (1999). Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 73, 1649–1654.

- Fodor, E., and Smith, M. (2004). The PA Subunit Is Required for Efficient Nuclear Accumulation of the PB1 Subunit of the Influenza A Virus RNA Polymerase Complex. *J. Virol.* 78, 9144–9153.
- Fodor, E., Seong, B.L., and Brownlee, G.G. (1993). Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J. Gen. Virol.* 74, 1327–1333.
- Fodor, E., Pritlove, D.C., and Brownlee, G.G. (1994). The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J. Virol.* 68, 4092–4096.
- Fodor, E., Pritlove, D.C., and Brownlee, G.G. (1995). Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J. Virol.* 69, 4012–4019.
- Francis, T. (1940). A NEW TYPE OF VIRUS FROM EPIDEMIC INFLUENZA. *Science* 92, 405–408.
- Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., and Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J. Struct. Biol.* 116, 190–199.
- Franke, D., and Svergun, D.I. (2009). *DAMMIF* , a program for rapid *ab-initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 42, 342–346.
- Franzetti, B., Schoehn, G., Hernandez, J.-F., Jaquinod, M., Ruigrok, R.W.H., and Zaccari, G. (2002). Tetrahedral aminopeptidase: a novel large protease complex from archaea. *EMBO J.* 21, 2132–2138.
- Frey, M. (1994). Water structure associated with proteins and its role in crystallization. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 663–666.
- Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., and Kawaoka, Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2002–2007.
- Fujiyoshi, Y., Kume, N.P., Sakata, K., and Sato, S.B. (1994). Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J.* 13, 318–326.
- Furuta, Y., Takahashi, K., Kuno-Maekawa, M., Sangawa, H., Uehara, S., Kozaki, K., Nomura, N., Egawa, H., and Shiraki, K. (2005). Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 981–986.
- Gamblin, S.J., and Skehel, J.J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 285, 28403–28409.
- Gao, Q., Lowen, A.C., Wang, T.T., and Palese, P. (2010). A nine-segment influenza A virus carrying subtype H1 and H3 hemagglutinins. *J. Virol.* 84, 8062–8071.
- Garzoni, F., Bieniossek, C., and Berger, I. (2012). The MultiBac BEVS for producing proteins and their complexes (prot 54) | Complex Purification/Proteomics.
- GEIG (Groupe d'Expertise et d'Information sur la Grippe), <http://www.grippe-geig.com>

- Gerber, M., Isel, C., Moules, V., and Marquet, R. (2014). Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol.* 22, 446–455.
- Geremia, S., Campagnolo, M., Demitri, N., and Johnson, L.N. (2006). Simulation of Diffusion Time of Small Molecules in Protein Crystals. *Structure* 14, 393–400.
- Le Goffic, R., Bouguyon, E., Chevalier, C., Vidic, J., Da Costa, B., Leymarie, O., Bourdieu, C., Decamps, L., Dhorne-Pollet, S., and Delmas, B. (2010). Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 4812–4823.
- González, S., and Ortín, J. (1999a). Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.* 18, 3767–3775.
- González, S., and Ortín, J. (1999b). Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J. Virol.* 73, 631–637.
- Gorai, T., Goto, H., Noda, T., Watanabe, T., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Takano, R., Neumann, G., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2012). F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 4615–4620.
- Gorbalenya, A.E., Pringle, F.M., Zeddari, J.-L., Luke, B.T., Cameron, C.E., Kalkmakoff, J., Hanzlik, T.N., Gordon, K.H.J., and Ward, V.K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J. Mol. Biol.* 324, 47–62.
- Gorman, O.T., Donis, R.O., Kawaoka, Y., and Webster, R.G. (1990a). Evolution of influenza A virus PB2 genes: implications for evolution of the ribonucleoprotein complex and origin of human influenza A virus. *J. Virol.* 64, 4893–4902.
- Gorman, O.T., Bean, W.J., Kawaoka, Y., and Webster, R.G. (1990b). Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J. Virol.* 64, 1487–1497.
- Gorman, O.T., Bean, W.J., Kawaoka, Y., Donatelli, I., Guo, Y.J., and Webster, R.G. (1991). Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J. Virol.* 65, 3704–3714.
- Goto, H., and Kawaoka, Y. (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10224–10228.
- Goto, H., Muramoto, Y., Noda, T., and Kawaoka, Y. (2013). The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal. *J. Virol.* 87, 11316–11322.
- Graef, K.M., Vreede, F.T., Lau, Y.-F., McCall, A.W., Carr, S.M., Subbarao, K., and Fodor, E. (2010). The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *J. Virol.* 84, 8433–8445.

Grantham, M.L., Stewart, S.M., Lalime, E.N., and Pekosz, A. (2010). Tyrosines in the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail are critical for production of infectious virus particles. *J. Virol.* 84, 8765–8776.

GROG (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe), <http://www.grog.org/>

Gui, X., Li, R., Zhang, X., Shen, C., Yu, H., Guo, X., Kang, Y., Chen, J., Chen, H., Chen, Y., et al. (2014). An important amino acid in nucleoprotein contributes to influenza A virus replication by interacting with polymerase PB2. *Virology* 464-465C, 11–20.

Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R.W.H., Ortin, J., Hart, D.J., et al. (2008). The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat. Struct. 38 Mol. Biol.* 15, 500–506.

Guilligay, D., Chenavas, S., Cusack, S., Ruigrok, R.W.H., and Crépin, T. (2010). L'ARN polymérase du virus de la grippe: de la recherche fondamentale à l'élaboration de nouveaux antiviraux. *Biofutur* 48–52.

Gultyaev, A.P., Fouchier, R.A.M., and Olsthoorn, R.C.L. (2010). Influenza virus RNA structure: unique and common features. *Int. Rev. Immunol.* 29, 533–556.

Hagen, M., Chung, T.D., Butcher, J.A., and Krystal, M. (1994). Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J. Virol.* 68, 1509–1515.

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

Hale, B.G., Barclay, W.S., Randall, R.E., and Russell, R.J. (2008b). Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. *Virology* 378, 1–5.

Hale, B.G., Albrecht, R.A., and García-Sastre, A. (2010). Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol.* 5, 23–41.

Haller, O., Staeheli, P., and Kochs, G. (2009). Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 28, 219–231.

Hansen, J.L., Long, A.M., and Schultz, S.C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Struct. Lond. Engl.* 1993 5, 1109–1122.

Hara, K., Schmidt, F.I., Crow, M., and Brownlee, G.G. (2006). Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J. Virol.* 80, 7789–7798.

Harp, J.M., Hanson, B.L., Timm, D.E., and Bunick, G.J. (1999). Macromolecular crystal annealing: evaluation of techniques and variables. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55, 1329–1334.

Harris, A., Forouhar, F., Qiu, S., Sha, B., and Luo, M. (2001). The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology* 289, 34–44.

- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Brecher, M., White, J.M., and Steven, A.C. (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19123–19127.
- Harrison, S.C. (2008). Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 690–698.
- Hay, A.J., Lomniczi, B., Bellamy, A.R., and Skehel, J.J. (1977). Transcription of the influenza virus genome. *Virology* *83*, 337–355.
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J., and Smith, M.H. (1985). The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* *4*, 3021–3024.
- He, X., Zhou, J., Bartlam, M., Zhang, R., Ma, J., Lou, Z., Li, X., Li, J., Joachimiak, A., Zeng, Z., et al. (2008). Crystal structure of the polymerase PAC–PB1N complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* *454*, 1123–1126.
- Hemerka, J.N., Wang, D., Weng, Y., Lu, W., Kaushik, R.S., Jin, J., Harmon, A.F., and Li, F. (2009). Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J. Virol.* *83*, 3944–3955.
- Heras, B., and Martin, J.L. (2005). Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *61*, 1173–1180.
- Heras, B., Edeling, M.A., Byriel, K.A., Jones, A., Raina, S., and Martin, J.L. (2003). Dehydration converts DsbG crystal diffraction from low to high resolution. *Struct. Lond. Engl.* *1993 11*, 139–145.
- Herfst, S., Imai, M., Kawaoka, Y., and Fouchier, R. a. M. (2014). Avian Influenza Virus Transmission to Mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*
- Hernandez, J.E., Adiga, R., Armstrong, R., Bazan, J., Bonilla, H., Bradley, J., Dretler, R., Ison, M.G., Mangino, J.E., Maroushek, S., et al. (2011). Clinical experience in adults and children treated with intravenous peramivir for 2009 influenza A (H1N1) under an Emergency IND program in the United States. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *52*, 695–706.
- Heyduk, T., and Lee, J.C. (1990). Application of fluorescence energy transfer and polarization to monitor Escherichia coli cAMP receptor protein and lac promoter interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 1744–1748.
- Hindley, C.E., Davidson, A.D., and Matthews, D.A. (2007). Relationship between adenovirus DNA replication proteins and nucleolar proteins B23.1 and B23.2. *J. Gen. Virol.* *88*, 3244–3248.
- Hiromu Sakurai, Mikio Nishida, Tetsuhiko Yoshimura, Jitsuya Takada, and Mutsuo Koyama (1985). Partition of divalent and total manganese in organs and subcellular organelles of MnCl₂-treated rats studied by ESR and neutron activation analysis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *841*, 208–214.
- Hiscox, J.A. (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 119–127.

- Holsinger, L.J., and Lamb, R.A. (1991). Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* 183, 32–43.
- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K., and Ishihama, A. (1988). RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J. Biochem. (Tokyo)* 104, 1021–1026.
- Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (1994). Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J. Virol.* 68, 3120–3128.
- Hsu, M.T., Parvin, J.D., Gupta, S., Krystal, M., and Palese, P. (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8140–8144.
- Huang, S., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., and Spector, D.L. (1998). The perinucleolar compartment and transcription. *J. Cell Biol.* 143, 35–47.
- Huet, S., Avilov, S.V., Ferbitz, L., Daigle, N., Cusack, S., and Ellenberg, J. (2010). Nuclear import and assembly of influenza A virus RNA polymerase studied in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *J. Virol.* 84, 1254–1264.
- Hutchinson, E.C., and Fodor, E. (2013). Transport of the Influenza Virus Genome from Nucleus to Nucleus. *Viruses* 5, 2424–2446.
- Hutchinson, E.C., Curran, M.D., Read, E.K., Gog, J.R., and Digard, P. (2008). Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus. *J. Virol.* 82, 11869–11879.
- Hutchinson, E.C., Wise, H.M., Kudryavtseva, K., Curran, M.D., and Digard, P. (2009). Characterisation of influenza A viruses with mutations in segment 5 packaging signals. *Vaccine* 27, 6270–6275.
- Hutchinson, E.C., von Kirchbach, J.C., Gog, J.R., and Digard, P. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 91, 313–328.
- Hutchinson, E.C., Orr, O.E., Man Liu, S., Engelhardt, O.G., and Fodor, E. (2011). Characterization of the interaction between the influenza A virus polymerase subunit PB1 and the host nuclear import factor Ran-binding protein 5. *J. Gen. Virol.* 92, 1859–1869.
- Ilyushina, N.A., Bovin, N.V., Webster, R.G., and Govorkova, E.A. (2006). Combination chemotherapy, a potential strategy for reducing the emergence of drug-resistant influenza A variants. *Antiviral Res.* 70, 121–131.
- Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats (2005). *The Threat of Pandemic Influenza: Are We Ready? Workshop Summary* (Washington (DC): National Academies Press (US)).
- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K., and Kawaoka, Y. (2006). The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J. Virol.* 80, 5233–5240.

- Jackson, R.J., Cooper, K.L., Tappenden, P., Rees, A., Simpson, E.L., Read, R.C., and Nicholson, K.G. (2011). Oseltamivir, zanamivir and amantadine in the prevention of influenza: a systematic review. *J. Infect.* 62, 14–25.
- Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.-A., Wills, N.M., Xiao, Y.-L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., et al. (2012). An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337, 199–204.
- Jivraj, N., and Butler, A. (2013). The 1918-19 influenza pandemic revisited. *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 43, 347–352.
- De Jong, J.C., Claas, E.C., Osterhaus, A.D., Webster, R.G., and Lim, W.L. (1997). A pandemic warning? *Nature* 389, 554.
- Jorba, N., Coloma, R., and Ortín, J. (2009). Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog.* 5, e1000462.
- Joyce, C.M., and Steitz, T.A. (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme? *J. Bacteriol.* 177, 6321–6329.
- Junge, C. (2011). Morbidity: A personal response. *Nature* 480, S14–S15.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795–800.
- Kabsch, W. (2010a). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 133–144.
- Kabsch, W. (2010b). *XDS*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- Kapust, R.B., Tözsér, J., Fox, J.D., Anderson, D.E., Cherry, S., Copeland, T.D., and Waugh, D.S. (2001). Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* 14, 993–1000.
- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M.M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., et al. (2008). GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat. Methods* 5, 53–55.
- Kerry, P.S., Long, E., Taylor, M.A., and Russell, R.J.M. (2011a). Conservation of a crystallographic interface suggests a role for β -sheet augmentation in influenza virus NS1 multifunctionality. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 858–861.
- Kerry, P.S., Ayllon, J., Taylor, M.A., Hass, C., Lewis, A., García-Sastre, A., Randall, R.E., Hale, B.G., and Russell, R.J. (2011b). A transient homotypic interaction model for the influenza A virus NS1 protein effector domain. *PloS One* 6, e17946.
- Kim, H.J., Fodor, E., Brownlee, G.G., and Seong, B.L. (1997). Mutational analysis of the RNA-fork model of the influenza A virus vRNA promoter in vivo. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 2), 353–357.
- Klumpp, K., Doan, L., Roberts, N.A., and Handa, B. (2000). RNA and DNA hydrolysis are catalyzed by the influenza virus endonuclease. *J. Biol. Chem.* 275, 6181–6188.

Knobil, K., Choi, A.M., Weigand, G.W., and Jacoby, D.B. (1998). Role of oxidants in influenza virus-induced gene expression. *Am. J. Physiol.* 274, L134–L142.

Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., and Svergun, D.I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* 36, 1277–1282.

Konarev, P.V., Petoukhov, M.V., Volkov, V.V., and Svergun, D.I. (2006). ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* 39, 277–286.

Kowalinski, E., Zubieta, C., Wolkerstorfer, A., Szolar, O.H.J., Ruigrok, R.W.H., and Cusack, S. (2012). Structural analysis of specific metal chelating inhibitor binding to the endonuclease domain of influenza pH1N1 (2009) polymerase. *PLoS Pathog.* 8, e1002831.

Krumbholz, A., Philipps, A., Oehring, H., Schwarzer, K., Eitner, A., Wutzler, P., and Zell, R. (2011). Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 200, 69–75.

Kubota, S., Copeland, T.D., and Pomerantz, R.J. (1999). Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S25: common features shared with HIV-1 regulatory proteins. *Oncogene* 18, 1503–1514.

Kuzuhara, T., Kise, D., Yoshida, H., Horita, T., Murazaki, Y., Nishimura, A., Echigo, N., Utsunomiya, H., and Tsuge, H. (2009). Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue. *J. Biol. Chem.* 284, 6855–6860.

Lawrence, F., Blanquet, S., Poiret, M., Robert-Gero, M., and Waller, J.P. (1973). The mechanism of action of methionyl-tRNA synthetase. 3. Ion requirements and kinetic parameters of the ATP-PPi exchange and methionine-transfer reactions catalyzed by the native and trypsin-modified enzymes. *Eur. J. Biochem. FEBS* 36, 234–243.

Leahy, M.B., Dobbyn, H.C., and Brownlee, G.G. (2001a). Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity. *J. Virol.* 75, 7042–7049.

Leahy, M.B., Pritlove, D.C., Poon, L.L., and Brownlee, G.G. (2001b). Mutagenic analysis of the 5' arm of the influenza A virus virion RNA promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity. *J. Virol.* 75, 134–142.

Lee, M.T.M., Bishop, K., Medcalf, L., Elton, D., Digard, P., and Tiley, L. (2002). Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 30, 429–438.

Lee, M.-T.M., Klumpp, K., Digard, P., and Tiley, L. (2003). Activation of influenza virus RNA polymerase by the 5' and 3' terminal duplex of genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* 31, 1624–1632.

Leslie, A.G.W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Jt. CCP4 ESF-EAMCB Newsl. Protein Crystallogr.* 26.

- Leslie, A.G.W. (2006). The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 48–57.
- Leymarie, O., Jouvion, G., Hervé, P.-L., Chevalier, C., Lorin, V., Lecardonnel, J., Da Costa, B., Delmas, B., Escriou, N., and Le Goffic, R. (2013). Kinetic characterization of PB1-F2-mediated immunopathology during highly pathogenic avian H5N1 influenza virus infection. *PloS One* 8, e57894.
- Luo, G., Hamatake, R.K., Mathis, D.M., Racela, J., Rigat, K.L., Lemm, J., and Colonno, R.J. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J. Virol.* 74, 851–863.
- Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Parvin, J.D., and Palese, P. (1989). Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 59, 1107–1113.
- Marc, D., Barbachou, S., and Soubieux, D. (2012). The RNA-binding domain of influenzavirus non-structural protein-1 cooperatively binds to virus-specific RNA sequences in a structure-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 41, 434–449.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89, 951–961.
- Marsh, G.A., Hatami, R., and Palese, P. (2007). Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. *J. Virol.* 81, 9727–9736.
- Marsh, G.A., Rabadán, R., Levine, A.J., and Palese, P. (2008). Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging. *J. Virol.* 82, 2295–2304.
- Martin, K., and Helenius, A. (1991). Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* 65, 232–244.
- Martín-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., and Ortín, J. (2001). Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep.* 2, 313–317.
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J. Cell Biol.* 91, 601–613.
- Mayer, D., Molawi, K., Martínez-Sobrido, L., Ghanem, A., Thomas, S., Baginsky, S., Grossmann, J., García-Sastre, A., and Schwemmle, M. (2007). Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J. Proteome Res.* 6, 672–682.
- Maynard, L.S., and Cotzias, G.C. (1955). The partition of manganese among organs and intracellular organelles of the rat. *J. Biol. Chem.* 214, 489–495.
- Mazur, I., Anhlán, D., Mitzner, D., Wixler, L., Schubert, U., and Ludwig, S. (2008). The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell. Microbiol.* 10, 1140–1152.

- Mazza, C., Segref, A., Mattaj, I.W., and Cusack, S. (2002). Large-scale induced fit recognition of an m(7)GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *EMBO J.* 21, 5548–5557.
- McAuley, J.L., Hornung, F., Boyd, K.L., Smith, A.M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J.W., and McCullers, J.A. (2007). Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* 2, 240–249.
- McAuley, J.L., Chipuk, J.E., Boyd, K.L., Van De Velde, N., Green, D.R., and McCullers, J.A. (2010). PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog.* 6, e1001014.
- McCarthy, J.T., and Rajiv, K. (1999). Divalent Cation Metabolism: Magnesium. In *Atlas of Diseases of the Kidney*, T. Berl, and J.V. Bonventre, eds.
- McCown, M.F., and Pekosz, A. (2005). The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J. Virol.* 79, 3595–3605.
- McCown, M.F., and Pekosz, A. (2006). Distinct domains of the influenza a virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J. Virol.* 80, 8178–8189.
- McDevitt, J., Rudnick, S., First, M., and Spengler, J. (2010). Role of Absolute Humidity in the Inactivation of Influenza Viruses on Stainless Steel Surfaces at Elevated Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3943–3947.
- Melén, K., Kinnunen, L., Fagerlund, R., Ikonen, N., Twu, K.Y., Krug, R.M., and Julkunen, I. (2007). Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J. Virol.* 81, 5995–6006.
- Melén, K., Tynell, J., Fagerlund, R., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D., and Julkunen, I. (2012). Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. *Virol. J.* 9, 167.
- Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., Martín, J., Nieto, A., Ortín, J., and Portela, A. (1994). Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia virus-T7 RNA polymerase expression system. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 8), 2109–2114.
- Mena, I., Jambrina, E., Albo, C., Perales, B., Ortín, J., Arrese, M., Vallejo, D., and Portela, A. (1999). Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J. Virol.* 73, 1186–1194.
- Mi, Y., Wood, G., and Thoma, L. (2004). Cryoprotection mechanisms of polyethylene glycols on lactate dehydrogenase during freeze-thawing. *AAPS J.* 6, e22.
- Moeller, A., Kirchdoerfer, R.N., Potter, C.S., Carragher, B., and Wilson, I.A. (2012). Organization of the Influenza Virus Replication Machinery. *Science* 338, 1631–1634.
- Mönttinen, H.A.M., Ravantti, J.J., and Poranen, M.M. (2012). Evidence for a Non-Catalytic Ion-Binding Site in Multiple RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS ONE* 7, e40581.

- Morello, M., Canini, A., Mattioli, P., Sorge, R.P., Alimonti, A., Bocca, B., Forte, G., Martorana, A., Bernardi, G., and Sancesario, G. (2008). Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. *Neurotoxicology* 29, 60–72.
- Müller, R., Poch, O., Delarue, M., Bishop, D.H., and Bouloy, M. (1994). Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 6), 1345–1352.
- Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2006). Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J. Virol.* 80, 2318–2325.
- Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., and Kawaoka, Y. (2013). Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J. Virol.* 87, 2455–2462.
- Murti, K.G., Brown, P.S., Bean, W.J., and Webster, R.G. (1992). Composition of the helical internal components of influenza virus as revealed by immunogold labeling/electron microscopy. *Virology* 186, 294–299.
- Nabel, G.J., Wei, C.-J., and Ledgerwood, J.E. (2011). Vaccinate for the next H2N2 pandemic now. *Nature* 471, 157–158.
- Naffakh, N., Tomoiu, A., Rameix-Welti, M.-A., and van der Werf, S. (2008). Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 403–424.
- Nakada, S., Creager, R.S., Krystal, M., Aaronson, R.P., and Palese, P. (1984). Influenza C virus hemagglutinin: comparison with influenza A and B virus hemagglutinins. *J. Virol.* 50, 118–124.
- Nakada, S., Graves, P.N., Desselberger, U., Creager, R.S., Krystal, M., and Palese, P. (1985). Influenza C virus RNA 7 codes for a nonstructural protein. *J. Virol.* 56, 221–226.
- Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H., and Barman, S. (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* 143, 147–161.
- Neumann, G., Hughes, M.T., and Kawaoka, Y. (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* 19, 6751–6758.
- Neumann, G., Brownlee, G.G., Fodor, E., and Kawaoka, Y. (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 283, 121–143.
- Newcomb, L.L., Kuo, R.-L., Ye, Q., Jiang, Y., Tao, Y.J., and Krug, R.M. (2009). Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J. Virol.* 83, 29–36.
- Ng, A.K.-L., Zhang, H., Tan, K., Li, Z., Liu, J., Chan, P.K.-S., Li, S.-M., Chan, W.-Y., Au, S.W.-N., Joachimiak, A., et al. (2008). Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 3638–3647.

- Ng, A.K.-L., Lam, M.K.-H., Zhang, H., Liu, J., Au, S.W.-N., Chan, P.K.-S., Wang, J., and Shaw, P.-C. (2012). Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein. *J. Virol.* **86**, 6758–6767.
- Noble, E., Cox, A., Deval, J., and Kim, B. (2012). Endonuclease substrate selectivity characterized with full-length PA of influenza A virus polymerase. *Virology* **433**, 27–34.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H., and Kawaoka, Y. (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**, 490–492.
- Noti, J.D., Blachere, F.M., McMillen, C.M., Lindsley, W.G., Kashon, M.L., Slaughter, D.R., and Beezhold, D.H. (2013). High Humidity Leads to Loss of Infectious Influenza Virus from Simulated Coughs. *PLoS ONE* **8**, e57485.
- Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J.R.H., and Park, S.-Y. (2008). The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* **454**, 1127–1131.
- Obenauer, J.C., Denson, J., Mehta, P.K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D.B., Xu, X., Wang, J., Ma, J., Fan, Y., et al. (2006). Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* **311**, 1576–1580.
- Oestereich, L., Lüdtke, A., Wurr, S., Rieger, T., Muñoz-Fontela, C., and Günther, S. (2014). Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res.* **105**, 17–21.
- Oliva, A., Llabrés, M., and Fariña, J.B. (2004). Applications of multi-angle laser light-scattering detection in the analysis of peptides and proteins. *Curr. Drug Discov. Technol.* **1**, 229–242.
- Olson, M.O.J. (2004). Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2004**, pe10.
- Olson, M.O.J. (2009). Induction of apoptosis by viruses: what role does the nucleolus play? *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 3452–3453.
- Olson, M.O.J., and Dundr, M. (2005). The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* **123**, 203–216.
- Olson, A.C., Rosenblum, E., and Kuchta, R.D. (2010). Regulation of influenza RNA polymerase activity and the switch between replication and transcription by the concentrations of the vRNA 5' end, the cap source, and the polymerase. *Biochemistry (Mosc.)* **49**, 10208–10215.
- Olson, M.O.J., Hingorani, K., and Szebeni, A. (2002). Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* **219**, 199–266.
- O'Neill, R.E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., and Moroianu, J. (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J. Biol. Chem.* **270**, 22701–22704.

- O'Neill, R.E., Talon, J., and Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 17, 288–296.
- Ortega, J., Martín-Benito, J., Zürcher, T., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., and Ortín, J. (2000). Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J. Virol.* 74, 156–163.
- Ozawa, M., Fujii, K., Muramoto, Y., Yamada, S., Yamayoshi, S., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2007). Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J. Virol.* 81, 30–41.
- Palese, P., and Compans, R.W. (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J. Gen. Virol.* 33, 159–163.
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., and Compans, R.W. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61, 397–410.
- Pan, C., Cheung, B., Tan, S., Li, C., Li, L., Liu, S., and Jiang, S. (2010). Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *PloS One* 5, e9549.
- Park, C.-J., Bae, S.-H., Lee, M.-K., Varani, G., and Choi, B.-S. (2003). Solution structure of the influenza A virus cRNA promoter: implications for differential recognition of viral promoter structures by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 31, 2824–2832.
- Parks, T.D., Howard, E.D., Wolpert, T.J., Arp, D.J., and Dougherty, W.G. (1995). Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. *Virology* 210, 194–201.
- Paterson, D., and Fodor, E. (2012). Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLoS Pathog.* 8, e1003019.
- Patterson, K.D. (1985). Pandemic and epidemic influenza, 1830-1848. *Soc. Sci. Med.* 1982 21, 571–580.
- Pekosz, A., and Lamb, R.A. (1997). The CM2 protein of influenza C virus is an oligomeric integral membrane glycoprotein structurally analogous to influenza A virus M2 and influenza B virus NB proteins. *Virology* 237, 439–451.
- Pendle, A.F., Clark, G.P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y.W., Andersen, J., Mann, M., Lamond, A.I., Brown, J.W.S., and Shaw, P.J. (2005). Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol. Biol. Cell* 16, 260–269.
- Perez, D., Rimstad, E., Smith, G., Kochs, G., and McAuley, J. (2011). Family - Orthomyxoviridae. In *Virus Taxonomy*, A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, and E.J. Lefkowitz, eds. (San Diego: Elsevier), pp. 749–762.
- Perez, J.T., Varble, A., Sachidanandam, R., Zlatev, I., Manoharan, M., García-Sastre, A., and tenOever, B.R. (2010). Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11525–11530.

- Petoukhov, M.V., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., and Svergun, D.I. (2007). ATSAS 2.1 – towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* *40*, 223–228.
- Petoukhov, M.V., Franke, D., Shkumatov, A.V., Tria, G., Kikhney, A.G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H.D.T., Konarev, P.V., and Svergun, D.I. (2012). New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* *45*, 342–350.
- Pielak, R.M., and Chou, J.J. (2011). Influenza M2 proton channels. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 522–529.
- Pingoud, A., Wilson, G.G., and Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases-a historical perspective and more. *Nucleic Acids Res.*
- Pinto, L.H., and Lamb, R.A. (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* *281*, 8997–9000.
- Plotch, S.J., Bouloy, M., and Krug, R.M. (1979). Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 1618–1622.
- Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I., and Krug, R.M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* *23*, 847–858.
- Plotkin, J.B., and Dushoff, J. (2003). Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7152–7157.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., and Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* *8*, 3867–3874.
- Poon, L.L., Pritlove, D.C., Fodor, E., and Brownlee, G.G. (1999). Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J. Virol.* *73*, 3473–3476.
- Poranen, M.M., Salgado, P.S., Koivunen, M.R.L., Wright, S., Bamford, D.H., Stuart, D.I., and Grimes, J.M. (2008). Structural explanation for the role of Mn²⁺ in the activity of 6 RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* *36*, 6633–6644.
- Portela, A., and Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* *83*, 723–734.
- Price, S.R., Ito, N., Oubridge, C., Avis, J.M., and Nagai, K. (1995). Crystallization of RNA-protein complexes I. Methods for the large-scale preparation of RNA suitable for crystallographic studies. *J. Mol. Biol.* *249*, 398–408.
- Pritlove, D.C., Poon, L.L., Devenish, L.J., Leahy, M.B., and Brownlee, G.G. (1999). A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro. *J. Virol.* *73*, 2109–2114.
- Pyper, J.M., Clements, J.E., and Zink, M.C. (1998). The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J. Virol.* *72*, 7697–7702.

- Rambo, R.P., and Tainer, J.A. (2013). Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering. *Nature* 496, 477–481.
- Rameix-Welti, M.-A., Tomoiu, A., Dos Santos Afonso, E., van der Werf, S., and Naffakh, N. (2009). Avian Influenza A virus polymerase association with nucleoprotein, but not polymerase assembly, is impaired in human cells during the course of infection. *J. Virol.* 83, 1320–1331.
- Rehwinkel, J., Tan, C.P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E., et al. (2010). RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* 140, 397–408.
- Reis, A.L., and McCauley, J.W. (2013). The influenza virus protein PB1-F2 interacts with IKK β and modulates NF- κ B signalling. *PloS One* 8, e63852.
- Reperant, L.A., Rimmelzwaan, G.F., and Kuiken, T. (2009). Avian influenza viruses in mammals. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 28, 137–159.
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Zamarreño, N., Fernández, Y., Juárez, S., and Ortín, J. (2008). The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PloS One* 3, e3904.
- Resa-Infante, P., Recuero-Checa, M.A., Zamarreno, N., Llorca, O., and Ortin, J. (2010). Structural and Functional Characterization of an Influenza Virus RNA Polymerase-Genomic RNA Complex. *J. Virol.* 84, 10477–10487.
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R., and Ortín, J. (2011). The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol.* 8, 207–215.
- Richardson, J.C., and Akkina, R.K. (1991). NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch. Virol.* 116, 69–80.
- Ritchey, M.B., Palese, P., and Kilbourne, E.D. (1976). RNAs of influenza A, B, and C viruses. *J. Virol.* 18, 738–744.
- Robertson, J.S. (1979). 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res.* 6, 3745–3757.
- Rodriguez, A., Pérez-González, A., and Nieto, A. (2007). Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* 81, 5315–5324.
- Rossmann, J.S., and Lamb, R.A. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411, 229–236.
- Rossmann, J.S., Jing, X., Leser, G.P., Balannik, V., Pinto, L.H., and Lamb, R.A. (2010). Influenza virus m2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *J. Virol.* 84, 5078–5088.
- Rowland, R.R.R., and Yoo, D. (2003). Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Res.* 95, 23–33.

- Rowland, R.R.R., Schneider, P., Fang, Y., Wootton, S., Yoo, D., and Benfield, D.A. (2003). Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 316, 135–145.
- Rudolph, M.G., Kraus, I., Dickmanns, A., Eickmann, M., Garten, W., and Ficner, R. (2003). Crystal structure of the borna disease virus nucleoprotein. *Struct. Lond. Engl.* 1993 11, 1219–1226.
- Ruigrok, R.W.H., and Crépin, T. (2010). Nucleoproteins of negative strand RNA viruses; RNA binding, oligomerisation and binding to polymerase co-factor. *Viruses* 2, 27–32.
- Ruigrok, R.W., Calder, L.J., and Wharton, S.A. (1989). Electron microscopy of the influenza virus submembranal structure. *Virology* 173, 311–316.
- Ruigrok, R.W., Barge, A., Durrer, P., Brunner, J., Ma, K., and Whittaker, G.R. (2000). Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology* 267, 289–298.
- Ruigrok, R.W.H., Crépin, T., and Kolakofsky, D. (2011). Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 504–510.
- Russell, C.A., Jones, T.C., Barr, I.G., Cox, N.J., Garten, R.J., Gregory, V., Gust, I.D., Hampson, A.W., Hay, A.J., Hurt, A.C., et al. (2008). The Global Circulation of Seasonal Influenza A (H3N2) Viruses. *Science* 320, 340–346.
- Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454, 523–527.
- Sanz-Ezquerro, J.J., De La Luna, S., Ortín, J., and Nieto, A. (1995). Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J. Virol.* 69, 2420–2426.
- Schmitt, A.P., and Lamb, R.A. (2005). Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. *Adv. Virus Res.* 64, 383–416.
- Schnell, J.R., and Chou, J.J. (2008). Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* 451, 591–595.
- Schoehn, G., and Ruigrok, R.W.H. (2008). Electron Microscopy of Viruses. In *Encyclopedia of Virology* (Third Edition), B.W.J. Mahy, and M.H.V.V. Regenmortel, eds. (Oxford: Academic Press), pp. 78–86.
- Schramm, V.L. (1986). *Manganese in Metabolism and Enzyme Function* (Elsevier).
- Selman, M., Dankar, S.K., Forbes, N.E., Jia, J.-J., and Brown, E.G. (2012). Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg. Microbes Infect.* 1, e42.
- Sha, B., and Luo, M. (1997). Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat. Struct. Biol.* 4, 239–244.

- Shaw, M.L., and Palese, P. (2013). Chapter 40, Orthomyxoviridae. In *Fields Virology* 6th Edition, D.M. Knipe, and P. Howley, eds. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1151–1185.
- Shope, R.E. (1931). SWINE INFLUENZA : I. EXPERIMENTAL TRANSMISSION AND PATHOLOGY. *J. Exp. Med.* *54*, 349–359.
- Shortridge, K.F. (1992). Pandemic influenza: a zoonosis? *Semin. Respir. Infect.* *7*, 11–25.
- Shortridge, K.F. (1999). Poultry and the influenza H5N1 outbreak in Hong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation. *Vaccine 17 Suppl 1*, S26–S29.
- Shortridge, K.F., Zhou, N.N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kawaoka, Y., Kodihalli, S., Krauss, S., Markwell, D., Murti, K.G., et al. (1998). Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* *252*, 331–342.
- Skorko, R., Summers, D.F., and Galarza, J.M. (1991). Influenza A virus in vitro transcription: Roles of NS1 and NP proteins in regulating RNA synthesis. *Virology* *180*, 668–677.
- Smith, D.J., Lapedes, A.S., de Jong, J.C., Bestebroer, T.M., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E., and Fouchier, R.A.M. (2004). Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* *305*, 371–376.
- Smith, G.E., Summers, M.D., and Fraser, M.J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* *3*, 2156–2165.
- Smith, W., Andrewes, C.H., and Laidlaw, P.P. (1933). A VIRUS OBTAINED FROM INFLUENZA PATIENTS. *The Lancet* *222*, 66–68.
- Solé, V.A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., and Susini, J. (2007). A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* *62*, 63–68.
- Song, L. (2014). It is unlikely that influenza viruses will cause a pandemic again like what happened in 1918 and 1919. *Epidemiology* *2*, 39.
- Song, M.K., and Hunt, J.A. (1988). Specific role of manganese and magnesium on RNA synthesis in rabbit bone marrow erythroid cell nuclei. *Biol. Trace Elem. Res.* *16*, 203–219.
- St Angelo, C., Smith, G.E., Summers, M.D., and Krug, R.M. (1987). Two of the three influenza viral polymerase proteins expressed by using baculovirus vectors form a complex in insect cells. *J. Virol.* *61*, 361–365.
- Stark, H. (2010). GraFix: stabilization of fragile macromolecular complexes for single particle cryo-EM. *Methods Enzymol.* *481*, 109–126.
- Steitz, T.A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature* *391*, 231–232.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* *189*, 113–130.

Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., et al. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279, 393–396.

Sugiyama, K., Obayashi, E., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Tame, J.R.H., Nagata, K., and Park, S.-Y. (2009). Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *EMBO J.* 28, 1803–1811.

Sugrue, R.J., and Hay, A.J. (1991). Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* 180, 617–624.

Svergun, D.I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* 25, 495–503.

Svergun, D.I. (1999). Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. *Biophys. J.* 76, 2879–2886.

Sylte, M.J., and Suarez, D.L. (2009). Influenza neuraminidase as a vaccine antigen. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 333, 227–241.

Tafforeau, L., Chantier, T., Pradezynski, F., Pellet, J., Mangeot, P.E., Vidalain, P.-O., Andre, P., Rabourdin-Combe, C., and Lotteau, V. (2011). Generation and comprehensive analysis of an influenza virus polymerase cellular interaction network. *J. Virol.* 85, 13010–13018.

Van-Tam, J., and Sellwood, C. (2013). *Pandemic Influenza (CABI)*.

Tappenden, P., Jackson, R., Cooper, K., Rees, A., Simpson, E., Read, R., and Nicholson, K. (2009). Amantadine, oseltamivir and zanamivir for the prophylaxis of influenza (including a review of existing guidance no. 67): a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* 13, iii, ix – xii, 1–246.

Tarendeau, F., Boudet, J., Guilligay, D., Mas, P.J., Bougault, C.M., Boulo, S., Baudin, F., Ruigrok, R.W.H., Daigle, N., Ellenberg, J., et al. (2007). Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 229–233.

Tarendeau, F., Crepin, T., Guilligay, D., Ruigrok, R.W.H., Cusack, S., and Hart, D.J. (2008). Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog.* 4, e1000136.

Tarus, B., Bakowicz, O., Chenavas, S., Duchemin, L., Estrozi, L.F., Bourdieu, C., Lejal, N., Bernard, J., Moudjou, M., Chevalier, C., et al. (2012). Oligomerization paths of the nucleoprotein of influenza A virus. *Biochimie* 94, 776–785.

Tawar, R.G., Duquerroy, S., Vonnrhein, C., Varela, P.F., Damier-Piolle, L., Castagné, N., MacLellan, K., Bedouelle, H., Bricogne, G., Bhella, D., et al. (2009). Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326, 1279–1283.

Taylor, R.M. (1949). Studies on survival of influenza virus between epidemics and antigenic variants of the virus. *Am. J. Public Health Nations Health* 39, 171–178.

- Thierry, F., and Danos, O. (1982). Use of specific single stranded DNA probes cloned in M13 to study the RNA synthesis of four temperature-sensitive mutants of HK/68 influenza virus. *Nucleic Acids Res.* *10*, 2925–2938.
- Tholey, G., Ledig, M., Mandel, P., Sargentini, L., Frivold, A.H., Leroy, M., Grippo, A.A., and Wedler, D.F.C. (1988). Concentrations of physiologically important metal ions in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem. Res.* *13*, 45–50.
- Tiley, L.S., Hagen, M., Matthews, J.T., and Krystal, M. (1994). Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J. Virol.* *68*, 5108–5116.
- Timasheff, S.N. (1995). Solvent stabilization of protein structure. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ *40*, 253–269.
- Timasheff, S.N., and Arakawa, T. (1988). Mechanism of protein precipitation and stabilization by co-solvents. *J. Cryst. Growth* *90*, 39–46.
- Tomassini, J., Selnick, H., Davies, M.E., Armstrong, M.E., Baldwin, J., Bourgeois, M., Hastings, J., Hazuda, D., Lewis, J., and McClements, W. (1994). Inhibition of cap (m7GpppXm)-dependent endonuclease of influenza virus by 4-substituted 2,4-dioxobutanoic acid compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* *38*, 2827–2837.
- Tomescu, A.I., Robb, N.C., Hengrung, N., Fodor, E., and Kapanidis, A.N. (2014). Single-molecule FRET reveals a corkscrew RNA structure for the polymerase-bound influenza virus promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., et al. (2013). New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog* *9*, e1003657.
- Torreira, E., Schoehn, G., Fernandez, Y., Jorba, N., Ruigrok, R.W.H., Cusack, S., Ortin, J., and Llorca, O. (2007). Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res.* *35*, 3774–3783.
- Trowitzsch, S., Bieniossek, C., Nie, Y., Garzoni, F., and Berger, I. (2010). New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. *J. Struct. Biol.* *172*, 45–54.
- Turan, K., Mibayashi, M., Sugiyama, K., Saito, S., Numajiri, A., and Nagata, K. (2004). Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res.* *32*, 643–652.
- Turrell, L., Lyall, J.W., Tiley, L.S., Fodor, E., and Vreede, F.T. (2013). The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* *4*, 1591.
- Ueda, M., Daidoji, T., Du, A., Yang, C.-S., Ibrahim, M.S., Ikuta, K., and Nakaya, T. (2010). Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induces extracellular Ca²⁺ influx, leading to apoptosis in avian cells. *J. Virol.* *84*, 3068–3078.

- Valleron, A.-J., Cori, A., Valtat, S., Meurisse, S., Carrat, F., and Boëlle, P.-Y. (2010). Transmissibility and geographic spread of the 1889 influenza pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 8778–8781.
- Varga, Z.T., Grant, A., Manicassamy, B., and Palese, P. (2012). Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane potential. *J. Virol.* *86*, 8359–8366.
- Vettori, M.V., Gatti, R., Orlandini, G., Belletti, S., Alinovi, R., Smargiassi, A., and Mutti, A. (1999). An in vitro model for the assessment of manganese neurotoxicity. *Toxicol. In Vitro* *13*, 931–938.
- Viboud, C., Alonso, W.J., and Simonsen, L. (2006). Influenza in tropical regions. *PLoS Med.* *3*, e89.
- Volkov, V.V., and Svergun, D.I. (2003). Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* *36*, 860–864.
- Volmer, R., Mazel-Sanchez, B., Volmer, C., Soubies, S.M., and Guérin, J.-L. (2010). Nucleolar localization of influenza A NS1: striking differences between mammalian and avian cells. *Virol. J.* *7*, 63.
- Vreede, F.T., and Brownlee, G.G. (2007). Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J. Virol.* *81*, 2196–2204.
- Vreede, F.T., Ng, A.K.-L., Shaw, P.-C., and Fodor, E. (2011). Stabilization of Influenza Virus Replication Intermediates Is Dependent on the RNA-Binding but Not the Homo-Oligomerization Activity of the Viral Nucleoprotein. *J. Virol.* *85*, 12073–12078.
- Wan, Z., Ye, J., Xu, L., Shao, H., Jin, W., Qian, K., Wan, H., and Qin, A. (2014). Antigenic mapping of the hemagglutinin of an H9N2 avian influenza virus reveals novel critical amino acid positions in antigenic sites. *J. Virol.* *88*, 3898–3901.
- Wang, L., Ren, X., Xing, J., and Zheng, A.C. (2010). The nucleolus and viral infection. *Virol. Sin.* *25*, 151–157.
- Ward, A.C., Castelli, L.A., Lucantoni, A.C., White, J.F., Azad, A.A., and Macreadie, I.G. (1995). Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus. *Arch. Virol.* *140*, 2067–2073.
- Watanabe, A., Chang, S.-C., Kim, M.J., Chu, D.W.-S., Ohashi, Y., and MARVEL Study Group (2010). Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate versus oseltamivir for treatment of influenza: A double-blind, randomized, noninferiority clinical trial. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *51*, 1167–1175.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* *56*, 152–179.
- Weycker, D., Edelsberg, J., Halloran, M.E., Longini, I.M., Jr, Nizam, A., Ciuryla, V., and Oster, G. (2005). Population-wide benefits of routine vaccination of children against influenza. *Vaccine* *23*, 1284–1293.

- Wise, H.M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R.M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E.C., Barclay, W.S., and Digard, P. (2009). A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J. Virol.* 83, 8021–8031.
- Wise, H.M., Barbezange, C., Jagger, B.W., Dalton, R.M., Gog, J.R., Curran, M.D., Taubenberger, J.K., Anderson, E.C., and Digard, P. (2011). Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. *Nucleic Acids Res.* 39, 7775–7790.
- Wise, H.M., Hutchinson, E.C., Jagger, B.W., Stuart, A.D., Kang, Z.H., Robb, N., Schwartzman, L.M., Kash, J.C., Fodor, E., Firth, A.E., et al. (2012). Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLoS Pathog* 8, e1002998.
- Wolff, T., and Ludwig, S. (2009). Influenza viruses control the vertebrate type I interferon system: factors, mechanisms, and consequences. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 29, 549–557.
- Wolstenholme, A.J., Barrett, T., Nichol, S.T., and Mahy, B.W. (1980). Influenza virus-specific RNA and protein syntheses in cells infected with temperature-sensitive mutants defective in the genome segment encoding nonstructural proteins. *J. Virol.* 35, 1–7.
- Wong, I., and Lohman, T.M. (1993). A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5428–5432.
- World Health Organization | Influenza, <http://www.who.int/topics/influenza/en/>
- Wright, P.F., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2013). Chapter 41, Orthomyxoviruses. In *Fields Virology* 6th Edition, D.M. Knipe, and P. Howley, eds. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1186–1243.
- Wurm, T., Chen, H., Hodgson, T., Britton, P., Brooks, G., and Hiscox, J.A. (2001). Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J. Virol.* 75, 9345–9356.
- Wyatt, P.J. (1991). Combined differential light scattering with various liquid chromatography separation techniques. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 485.
- Wyatt, P.J. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta* 272, 1–40.
- Yamashita, M. (2010). Laninamivir and its prodrug, CS-8958: long-acting neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza. *Antivir. Chem. Chemother.* 21, 71–84.
- Yang, H., Makeyev, E.V., and Bamford, D.H. (2001). Comparison of polymerase subunits from double-stranded RNA bacteriophages. *J. Virol.* 75, 11088–11095.
- Yang, H., Makeyev, E.V., Butcher, S.J., Gaidelyte, A., and Bamford, D.H. (2003). Two distinct mechanisms ensure transcriptional polarity in double-stranded RNA bacteriophages. *J. Virol.* 77, 1195–1203.

Yap, T.L., Chen, Y.L., Xu, T., Wen, D., Vasudevan, S.G., and Lescar, J. (2007). A multi-step strategy to obtain crystals of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase that diffract to high resolution. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 78–83.

Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., and Ishihama, A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**, 249–255.

Ye, Q., Krug, R.M., and Tao, Y.J. (2006). The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**, 1078–1082.

Yeh, J.I., and Hol, W.G.J. (1998). A flash-annealing technique to improve diffraction limits and lower mosaicity in crystals of glycerol kinase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 479–480.

Yoon, S.-W., Webby, R.J., and Webster, R.G. (2014). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*

Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., Chen, S., Zhou, J., He, X., Lv, Z., Ge, R., Li, X., Deng, T., et al. (2009). Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**, 909–913.

Zell, R., Krumbholz, A., Eitner, A., Krieg, R., Halbhuber, K.-J., and Wutzler, P. (2007). Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **88**, 536–546.

Zhang, S., Weng, L., Geng, L., Wang, J., Zhou, J., Deubel, V., Buchy, P., and Toyoda, T. (2010). Biochemical and kinetic analysis of the influenza virus RNA polymerase purified from insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 570–574.

Zhirnov, O.P., and Grigoriev, V.B. (1994). Disassembly of influenza C viruses, distinct from that of influenza A and B viruses requires neutral-alkaline pH. *Virology* **200**, 284–291.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNc	Acide RiboNucléique complémentaire
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNv	Acide Ribonucléique viral
ATP	Adenosine TriPhospahte
CBC	Cap Binding Domain (domaine de fixation de la coiffe)
CFP	Cyan Fluo Protein
CTP	Cytidine TriPhosphate
DEAE	Diethylaminoethyl
DPBA	2,4-dioxo-4-phenylbutanoic acid
DTT	Dithiothreitol
EG	Ethylene Glycol
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
FAM	Fluorescein
FBA	Filter Binding Assay
GTP	Guanidine TriPhosphate
HA	Hémagglutinine
HEF	Hemagglutinine Esterase Fusion
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ISPyB	Information System for Protein CrystallographY Beamlines
NA	Neuraminidase
NLS	Nuclear Localisation Signal
NoLS	Nucleolar Localization Sequence
NP	Nucléoprotéine
NS1	Non Structural Protein 1
NS2 / NEP	Non Structural Protein / Nuclear Export Protein
PA	Protéine Acide
PB1	Protein Basique

PB2	Protéine Basique 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene Glycol
PFA	Paraformaldehyde
PSB	Partnership for Structural Biology
PVDF	PolyVinyl DiFluoride
R _g	Rayon de giration
RNP	RiboNucléoProtéine
RNP _c	RiboNucléoProtéine complémentaire
RNP _v	RiboNucléoProtéine virale
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel
SST	Sodium Silico Tungstate
TBE	Tris Borate EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
TEV	Tobacco Etch Virus
T _m	Melting Temperature
TSA	Thermal Shift Assay
UTP	Uridine TriPhosphate
UTR	UnTranslated Region
V _c	Volume correlation
V _m	Vitesse maximum
wt	Wild type, sauvage
YFP	Yellow Fluorescent Protein

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Grippe saisonnière 2013 / 2014	3
Figure 2 : La grippe, les évènements majeurs	5
Figure 3 : La particule virale du virus influenza	8
Figure 4 : Organisation du génome des virus influenza A, protéines codées par chaque segment et leurs fonctions	9
Figure 5 : Organisation d'un segment d'ARN viral	10
Figure 6 : Changements conformationnels de l'hémagglutinine (HA) à pH acide	11
Figure 7 : La nucléoprotéine (NP) du virus de la grippe	13
Figure 8 : Structure de la protéine M1 et son organisation au sein de la particule virale	15
Figure 9 : Structure et organisation de la protéine NS1	17
Figure 10 : Structure du domaine C-terminal de NEP/NS2	18
Figure 11 : Cycle viral	19
Figure 12 : Illustration de l'import nucléaire des RNP du virus influenza	20
Figure 13 : Modèle d'import nucléaire des sous-unités de l'ARN-polymérase du virus influenza	21
Figure 14 : Illustration de l'export nucléaire des RNPv du virus influenza	22
Figure 15 : Réassortiment	24
Figure 16 : Evolution des virus de la grippe de type A circulants chez l'humain	25
Figure 17 : Réservoirs des virus influenza A et transmissibilité	26
Figure 18 : Transcription versus Réplication	27
Figure 19 : Mécanisme de transcription coiffe-dépendant du virus influenza ou « vol de coiffe »	28
Figure 20 : Différentes stratégies d'initiation sont utilisées par l'ARN-polymérase de la grippe sur les promoteurs ARNc et ARNv pour la réplication de l'ARN viral	30
Figure 21 : Modèles pour la seconde étape de réplication de l'ARN du virus influenza	31
Figure 22 : Reconstructions 3D disponibles de l'ARN-polymérase	33
Figure 23 : Etat des connaissances structurales sur l'ARN-polymérase du virus de la grippe	34
Figure 24 : La comparaison de la structure du domaine NLS seul obtenue par RMN (A) avec celle du domaine complexé avec l'importine $\alpha 5$ obtenue par diffraction des rayons X (B)	36
Figure 25 : Procédures standards d'expression en cellules d'insectes	43
Figure 26 : Résumé des étapes de production d'ARN par transcription <i>in vitro</i>	47
Figure 27 : ARN produits par transcription <i>in vitro</i> avant purification (A) et après purification sur gel 15 % polyacrylamide 8 M urée (B)	48
Figure 28 : Stratégie d'expression de l'ARN-polymérase hétérotrimérique du virus influenza	59
Figure 29 : Exemple de suivi de la production des gènes rapporteurs YFP et CFP au cours de l'infection par le baculovirus	59
Figure 30 : Représentation schématique des constructions de l'ARN-polymérase du virus influenza A qui ont été testées	61
Figure 31 : Résultat du fractionnement nucléaire / cytoplasmique	62
Figure 32 : Suivi de l'expression en cellules d'insecte de l'ARN-polyérase tronquée	63
Figure 33 : Etapes de purification de l'ARN-polymérase tronquée du virus influenza	64
Figure 34 : Représentation schématique du dispositif de SEC-MALLS-RI	66
Figure 35 : Principe général des mesures de la masse moléculaire lors d'une expérience de SEC-MALLS-RI	66
Figure 36 : Effet de l'ARN sur l'ARN-polymérase tronquée visualisé par une expérience de SEC-MALLS-RI	67
Figure 37 : Purification de l'ARN-polymérase tronquée sous sa forme monomérique	69
Figure 38 : Etapes de purification de PACter-PB1 Δ Nter	70

Figure 39 : La chromatographie sur Héparine permet d'éliminer l'excès de PACter et de sélectionner les complexes viables pour la fixation de l'ARN.....	71
Figure 40 : Le complexe PACter-PB1ΔCter se comporte en dimère	72
Figure 41 : Les différentes étapes de la coloration négative	76
Figure 42 : Reconstitutions de l'ARN-polymérase tronquée du virus influenza obtenues en microscopie électronique.....	78
Figure 43 : Méthode de trempage pour retirer le glycérol de l'échantillon.....	79
Figure 44 : Principe de la méthode GraFix utilisée pour la stabilisation du dimère d'hétérotrimères.....	80
Figure 45 : Echantillon d'ARN-polymérase tronquée sous forme dimérique obtenu par la méthode GraFix	81
Figure 46 : Comparaison entre les reconstitutions de l'ARN-polymérase tronquée (A) et celles de l'hétérotrimère complet (B)	84
Figure 47 : Données de SAXS brutes	86
Figure 48 : Fonction de la distribution des distances et modèles ab initio générés à partir des données SAXS	87
Figure 49 : Enveloppe SAXS à basse résolution du dimère de PACter-PB1ΔCter	88
Figure 50 : Principe de cristallisation d'une protéine	89
Figure 51 : Séquences des molécules d'ARN utilisées lors du test de stabilité thermique	90
Figure 52 : L'extrémité 5' conservée de l'ARNv stabilise PACter-PB1ΔCter	91
Figure 53 : Cristaux de PACter-PB1ΔCter initiaux obtenus à 4 °C par criblage haut-débit grâce à un robot de cristallisation.....	92
Figure 54 : Cristaux de PACter-PB1ΔCter	93
Figure 55 : Contrôle de la composition des cristaux obtenus sur gel de polyacrylamide	94
Figure 56 : Organigramme des stratégies suivies pour améliorer la qualité des cristaux	95
Figure 57 : Décongélation flash du cristal	96
Figure 58 : Méthode de déshydratation cristalline adoptée.....	97
Figure 59 : Le cristal constitue un ensemble de plans réticulaires sur lesquels le faisceau de rayons-X se réfléchit.....	98
Figure 60 : Photo d'un cristal et cliché de diffraction associé.....	99
Figure 61 : Activité endonucléase manganèse-dépendante de l'ARN-polymérase tronquée	102
Figure 62 : Mécanisme d'action du DPBA.....	103
Figure 63 : Les versions sauvage et mutante PA-E80A de l'ARN-polymérase tronquée sont toutes les deux actives pour la synthèse d'ARN.....	105
Figure 64 : Motif de transcription type	106
Figure 65 : Contrôle de l'activité de synthèse d'ARN	107
Figure 66 : Inhibition de l'activité de synthèse d'ARN par le DPBA.....	108
Figure 67 : Effet du pH sur l'activité de synthèse portée par l'ARN-polymérase tronquée.....	109
Figure 68 : Influence de la concentration en sels sur l'activité de synthèse d'ARN	110
Figure 69 : Effet de la température sur l'activité de synthèse d'ARN	111
Figure 70 : Effet coopératif entre Mg ²⁺ et Mn ²⁺	112
Figure 71 : Essai de transcription en présence de NP	113
Figure 72 : Effet de la concentration d'ARN matrice sur la réaction de synthèse d'ARN.....	114
Figure 73 : Les ions manganèse déstabilisent l'ARN-polymérase tronquée sous forme monomérique	117
Figure 74 : Modèles des structures secondaires proposés pour les extrémités promotrices de l'ARNv.....	118
Figure 75 : Séquences des molécules d'ARN utilisées pour la mesure des affinités par FBA et anisotropie de fluorescence	119

Figure 76 : Effet de la vitesse de diffusion rotationnelle (réorientation et rotation des spins sur leur axe) sur l'anisotropie de la lumière émise d'une molécule d'ADN marquée par un fluorophore	121
Figure 77 : Affinité de l'ARN-polymérase tronquée et de PA-PB1ΔCter pour les extrémités 3' et 5' conservées de l'ARNv mesurée par anisotropie de fluorescence	121
Figure 78 : Identification d'une région indispensable à la fixation de l'extrémité 3'	122
Figure 79 : Résultats des marquages au P^{32} des ARN visualisés sur gel polyacrylamide 8 M urée.....	123
Figure 80 : Principe du FBA à double filtration (A) et visualisation des résultats de filtration (B).....	124
Figure 81 : Courbes des affinités mesurées par FBA entre l'ARN-polymérase tronquée et différents ARN.....	125
Figure 82 : Affinités de l'ARN-polymérase pour les extrémités 3' et 5' conservées en présence (A) et en absence (B) de PB2Nter	126
Figure 83 : Préparation des échantillons pour la microscopie rayons-X	131
Figure 84 : Organisation schématique de la ligne ID21	132
Figure 85 : Spectre global de fluorescence des rayons-X d'une zone irradiée correspondant à l'aire occupée par une cellule	133
Figure 86 : Cartographie du signal de fluorescence des rayons-X de différents éléments de cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549)	134
Figure 87 : Distribution du manganèse dans la cellule avant et pendant l'infection par un virus influenza A	135
Figure 88 : Image de microscopie optique des cellules (au temps T6) après irradiation aux rayons-X	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : La grippe en chiffres, un problème de santé publique	4
Tableau 2 : Liste et caractéristiques des anticorps utilisés	46
Tableau 3 : Pourcentages des gels d'acrylamide:Bis-acrylamide 19:1 en fonction de la taille de l'ARN à purifier	49
Tableau 4 : Conditions d'acquisition et données cristallographiques	100
Tableau 5 : Affinités obtenues par anisotropie de fluorescence	122
Tableau 6 : Affinités mesurées par FBA.....	125

PUBLICATIONS

- Les constructions recombinantes de l'ARN-polymérase des virus influenza A/H3N2 et A/H5N1 réalisées (Figure 30, p 61) ont fait l'objet d'un dépôt de brevet.
- Chenavas, S., Monod, A., Ruigrok, R.W., and Crépin, T. (2013). Le complexe de transcription et de réplication des virus influenza, une cible pour de nouvelles molécules antivirales. *Virologie* 17, 6–16.

Cette revue, rédigée en français pour le journal *Virologie*, s'intéresse aux complexes protéine:ARN impliqués dans les processus d'amplification du matériel génétique du virus de la grippe. Elle résume les données structurales actuelles ayant trait à ces complexes et établit des liens entre leur mode de fonctionnement et la conception de nouvelles molécules antivirales.

- Dégut, C., Monod, A., Brachet, F., Crépin, T., and Tisné, C. (2014). *In vitro / in vivo* production of tRNA for X-ray studies (*soumis*).

Lors de ce projet de thèse, la méthode de production d'ARN par transcription *in vitro* a occupé une place centrale. Elle a en effet permis de produire, en routine, différents ARN mimant l'ARN viral pour l'étude de leur interaction avec l'ARN-polymérase du virus de la grippe. Cette méthode, ainsi que la stratégie de purification des ARN utilisée ont été détaillées dans cet article de méthodologie à travers la production d'ARNt destinés aux études par diffraction des rayons-X.

PUBLICATION N° 1

Chenavas, S., Monod, A., Ruigrok, R.W., and Crépin, T. (2013).

Le complexe de transcription et de réplication des virus influenza,
une cible pour de nouvelles molécules antivirales.

Virologie 17, 6–16.

Cette revue, rédigée en français pour le journal *Virologie*, s'intéresse aux complexes protéine:ARN impliqués dans les processus d'amplification du matériel génétique du virus de la grippe. Elle résume les données structurales actuelles ayant trait à ces complexes et établit des liens entre leur mode de fonctionnement et la conception de nouvelles molécules antivirales.

Le complexe de transcription et de réplication des virus influenza, une cible pour de nouvelles molécules antivirales

Sylvie Chenavas

Alexandre Monod

Rob W.H. Ruigrok

Thibaut Crépin

UMI3265 UJF-EMBL-CNRS,

Biologie structurale des interactions
entre virus et cellule hôte,

6, rue Jules-Horowitz,

BP 181, 38042 Grenoble cedex 9,

France

<crepin@embl.fr>

Résumé. Les étapes de transcription et de réplication permettent l'amplification du matériel génétique du virus de la grippe. Elles sont orchestrées par des complexes protéine-ARN appelés ribonucléoprotéines (RNP). Chaque particule virale possède huit de ces complexes, chacun étant formé d'un des huit segments d'ARN constituant le génome viral, de nombreuses copies de la nucléoprotéine et d'une copie de l'ARN polymérase. L'ARN polymérase ARN-dépendante est elle-même formée de trois sous-unités : PA, PB1 et PB2. Des laboratoires du monde entier ont fourni un effort considérable afin de résoudre la structure à l'échelle atomique de la nucléoprotéine de différentes souches virales ainsi que des domaines isolés de PA et PB2. Pour PB1, seules les structures des interfaces avec les deux autres sous-unités sont connues. Bien que loin encore de pouvoir intégrer leurs implications dans la compréhension globale du cycle viral, les structures obtenues ont révélé le mode d'oligomérisation de la nucléoprotéine et de son interaction avec l'ARN. Elles montrent également l'interaction entre l'ARN polymérase et le pré-ARN messager (ARNm) cellulaire coiffé et son clivage, générant *in fine* une amorce coiffée à partir de laquelle le complexe synthétise son propre ARNm (mécanisme du vol de coiffe). Outre leur aspect fondamental, les structures tridimensionnelles sont également à l'origine de travaux de conception de nouvelles molécules antivirales. Une première génération d'inhibiteurs de l'oligomérisation de la nucléoprotéine, de l'interaction entre PB1 et PA ou encore de l'activité vol de coiffe a ainsi été obtenue. De tels inhibiteurs pourraient évoluer vers de nouvelles molécules hautement spécifiques ciblant le virus de la grippe.

Mots clés : grippe, transcription, réplication, ARN polymérase, nucléoprotéine

Abstract. Transcription and replication by influenza virus are carried out by protein-RNA complexes named RNPs. There are eight of these complexes, each containing one of the eight segments of viral RNA, multiple copies of the viral nucleoprotein and each complex carries a copy of the viral RNA-dependent RNA polymerase. The polymerase itself is a complex of three subunits: PB1, PB2 and PA. Through an effort by laboratories from all over the world, atomic structures have been determined of nucleoproteins of several viral strains and of protein domains of PA and PB2. For PB1, only the structures of the small interfaces with PA and PB2 have been determined. Even though a full understanding of the fundamental processes in the viral life cycle is still lacking, the structures have revealed how nucleoprotein can oligomerize and binds to RNA, how PB1 binds to PA and how the polymerase binds to capped cellular pre-messenger RNA (mRNA) and cleaves this RNA in order to make a capped primer for its own mRNAs (cap-snatching mechanism). The structures also stimulated structure-aided drug design efforts and first generation inhibitors against nucleoprotein oligomerization, binding of PB1 to PA and the cap-snatching activity have been published. Such inhibitors may be developed into new anti-influenza drugs.

Key words: influenza, transcription, replication, RNA polymerase, nucleoprotein

Tirés à part : T. Crépin

Introduction

L'agent infectieux à l'origine de la grippe est le virus influenza dont il existe trois types, nommés A, B et C. Le virus de type C, essentiellement présent chez l'Homme, provoque seulement des maladies bénignes des voies respiratoires et ne fait pas l'objet d'une attention particulière. Le virus influenza de type B, uniquement à l'origine de gripes saisonnières, infecte presque exclusivement l'Homme. Le virus influenza de type A possède quant à lui un spectre nettement plus large, infectant l'Homme mais également d'autres mammifères (porc, cheval, furet...) ainsi que les oiseaux. Le virus de type A humain provoque des gripes saisonnières mais peut parfois, à la suite de réassortiments génétiques avec un virus d'origine animale et/ou de transmissions inter-espèces, engendrer des pandémies à très grande échelle comme ce fut le cas en 1918, 1957, 1968 et 2009. Des phénomènes pandémiques peuvent également résulter de la résurgence dans la population de virus antérieurs comme lors de l'épisode pandémique de 1977. La meilleure protection contre la grippe saisonnière est la vaccination. Cependant, les variations continues du virus rendent indispensables l'actualisation annuelle du vaccin. Ainsi, chaque année, l'OMS doit tenter d'estimer quelles seront les souches virales en circulation, et ce afin de délivrer ses recommandations pour une fabrication du vaccin avec une disponibilité la plus rapide possible, généralement courant octobre. La vaccination n'est pas la bonne stratégie en cas de pandémie. D'une part, personne ne peut anticiper l'origine de la souche virale animale engendrant la pandémie et, d'autre part, la fabrication d'un vaccin après caractérisation du nouveau virus pandémique prend environ six mois. Des molécules ciblant spécifiquement le virus de la grippe existent (l'amantadine et l'oseltamivir) et peuvent être utilisées en cas de pandémie. Cependant, l'amantadine possède de sérieux effets secondaires. De plus, divers phénomènes de résistance ont déjà été mis en évidence avec les deux types de molécules. Afin de développer de nouvelles cibles antivirales, plusieurs groupes dans le monde ont démarré l'étude des protéines impliquées dans la transcription et la réplication du virus de la grippe. Cette revue décrit les progrès récents dans ce domaine et aborde le développement d'inhibiteurs de la prolifération virale qui résultent de ces travaux.

Le complexe ribonucléoprotéique du virus de la grippe

Le génome du virus de la grippe (ARNv) se compose de huit segments d'ARN simple brin de polarité négative. Chaque segment est recouvert de multiples copies de nucléopro-

téines (NP) virales. Chacune des extrémités 3' et 5' des huit segments d'ARN, strictement conservées, interagissent avec une ARN polymérase formant ainsi un complexe ribonucléoprotéique (RNP) (*figure 1*), entité fondamentale de la prolifération virale. Directement purifiées des virus, les RNP forment des ultrastructures sur-enroulées dont l'aspect circulaire peut être visualisé à faible concentration de sel (*figure 1A*). Leur grande flexibilité rend l'identification de l'ARN polymérase et des protomères de NP délicate et, à ce jour, malgré de nombreux efforts, la compréhension précise des bases moléculaires du fonctionnement du complexe réplcatif/transcriptionnel dans son entier demeure largement spéculative. Une enveloppe tridimensionnelle a tout de même été obtenue par microscopie électronique à partir de RNP recombinantes formées d'un ARNv de 248 nucléotides, de neuf copies de NP et d'une copie de l'hétérotrimère de l'ARN polymérase [1]. L'ARN polymérase virale a été identifiée par marquage avec des anticorps spécifiques [2]. Récemment, à partir de ce même matériel, une nouvelle reconstruction a été obtenue à haute résolution par cryomicroscopie électronique (*figure 1B*) permettant de visualiser les protomères de NP et l'ARN polymérase avec respectivement une résolution de 12 et 18 Å [3]. La comparaison des reconstructions obtenues par coloration négative de l'ARN polymérase seule et celle engagée dans les RNP montre des différences, suggérant son réarrangement structural lorsqu'elle interagit avec l'ARNv et la NP [4].

Mécanismes de la transcription et de la réplication

Dans la cellule infectée, l'ARN polymérase fonctionne uniquement au sein d'une RNP. Ce complexe macromoléculaire est responsable à la fois de la réplication du génome viral mais aussi de sa transcription en ARN messagers (ARNm), deux processus moléculaires distincts se déroulant uniquement dans le noyau des cellules infectées. Le manque d'information structurale à haute résolution limite actuellement la compréhension précise de ces deux mécanismes moléculaires. Notamment, leur ordre et leur déroulement restent l'objet de nombreuses spéculations. La phase de transcription correspond à la synthèse d'ARNm à partir de l'ARNv. Les ARNm sont synthétisés par un mécanisme particulier, appelé vol de coiffe (*figure 2A*) [5], propre aux *Orthomyxoviridae* (virus grippaux entre autres), aux *Bunyaviridae* (virus de La Crosse, virus Hanta, virus de la vallée du Rift et virus Crimée-Congo) ou encore aux *Arenaviridae* (virus Lassa) [6]. Dans le cas du virus de la grippe, l'ARN polymérase virale reconnaît spécifiquement le 7-méthyl-guanosine (^{7m}G) de la coiffe (^{7m}GpppN), situé

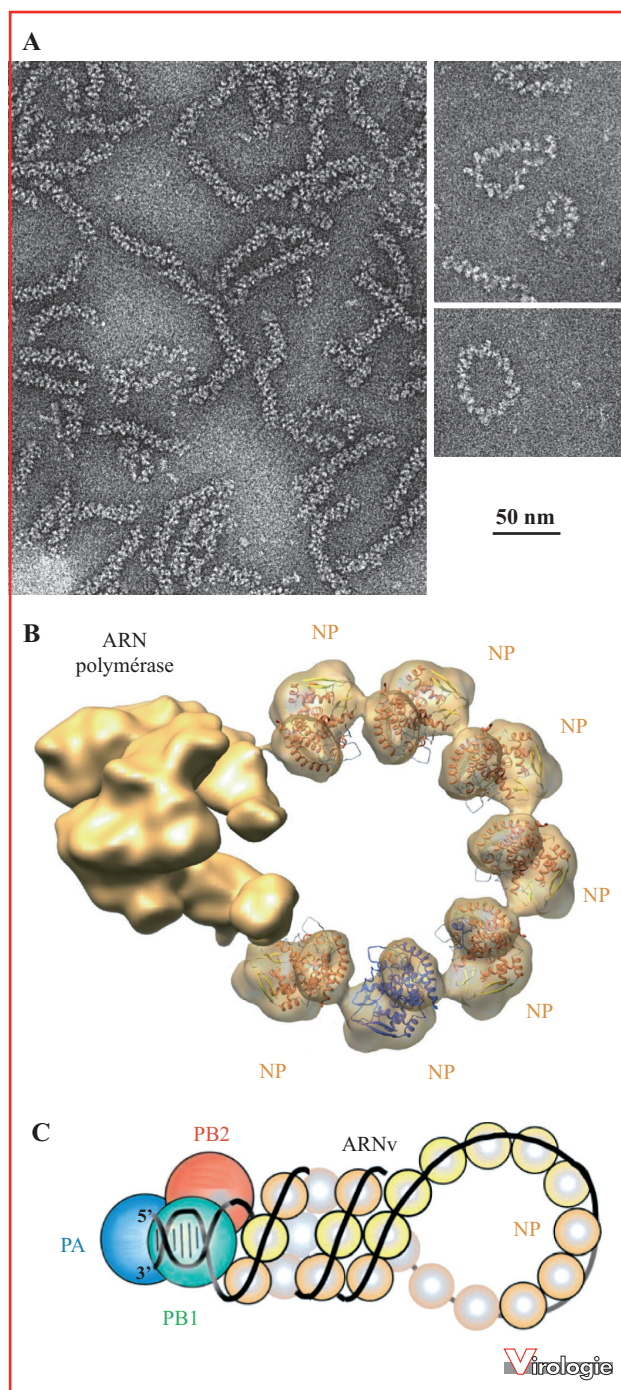


Figure 1. La particule ribonucléoprotéique (RNP) du virus de la grippe. **A)** Micrographes obtenus en microscopie électronique (coloration négative) de RNP purifiées de virions, à une concentration physiologique en sel (gauche) et à faible concentration en sel (droite) [55]. **B)** Reconstitution d'une mini-RNP composée de neuf monomères de nucléoprotéine (NP) et d'une ARN polymérase hétérotrimérique par cryomicroscopie électronique. La structure cristallographique de la NP a été ajustée dans la densité des

à l'extrémité 5' des pré-ARNm cellulaires (figure 2A-1). Elle clive ensuite, grâce à une activité endonucléase, les pré-ARNm 10 à 13 nucléotides après la coiffe (figure 2A-2). Ces petits oligonucléotides d'ARN cellulaires coiffés servent alors d'amorces pour initier la production des ARNm viraux (figure 2A-3). La transcription est alors processive et durant tout le processus, l'ARN polymérase virale resterait liée à l'extrémité 5' de l'ARNv. En fin de transcription, l'ARN polymérase ajoute une queue poly-A à l'extrémité 3' des ARNm viraux, par un mécanisme de bégaiement à partir d'une courte séquence poly-U localisée à l'extrémité 5' de l'ARNv (figure 2A-4). Ce bégaiement pourrait être dû à une gêne stérique résultant de la constante interaction entre l'ARN polymérase et l'extrémité 5' de l'ARNv tout au long de cette étape [7-10]. Les ARNm viraux produits sont reconnus comme des ARNm endogènes par la machinerie cellulaire et traduits en protéines. La phase de réplication, quant à elle, correspond à l'amplification du matériel génétique du virus. Pour ce faire, une première copie complémentaire (ARNc) et colinéaire de l'ARNv est synthétisée puis encapsidée par l'ARN polymérase et la NP formant alors des RNP complémentaires (RNPc). L'ARNc de polarité positive, porté par les RNPc, sert de matrice pour la synthèse de nouveaux ARNv qui, encapsidés à leur tour, forment les RNPv à l'origine des nouveaux virions. Très peu de choses sont connues de la régulation de l'amplification de l'ARN viral et notamment l'enchaînement des deux processus que sont la transcription et la réplication. Synthétisés par la même enzyme, les molécules d'ARN résultantes ont des destinées différentes. *In vitro*, il a été montré que les RNPv seraient capables de synthétiser l'ARNm et l'ARNc [11]. Des études anciennes sur les cellules infectées ont montré que la phase de réplication nécessiterait une étape initiale de transcription et par conséquent d'expression des protéines virales [12]. Il a depuis été établi que la NP serait un facteur essentiel pour l'accumulation des molécules d'ARNc [13-15] mais aussi pour leur stabilité [16]. La NP serait alors une sorte d'interrupteur faisant basculer l'ARN polymérase de la phase transcriptionnelle dite précoce à la phase répllicative tardive [15]. Une autre source de spéculation concerne le déroulement de la réplication ayant fait, pendant de nombreuses années, l'objet de controverses. En effet, comment expliquer les différences mises en évidence entre les RNPv et les RNPc, différences observées sur

Figure 1. Suite

sept NP n'interagissant pas avec l'ARN polymérase virale (avec la permission de [3]). **C)** Représentation schématique d'une RNP montrant l'encapsidation de l'ARNv par NP ainsi que la liaison de ses extrémités 3' et 5' conservées sur l'ARN polymérase hétérotrimérique (avec la permission de [45]).

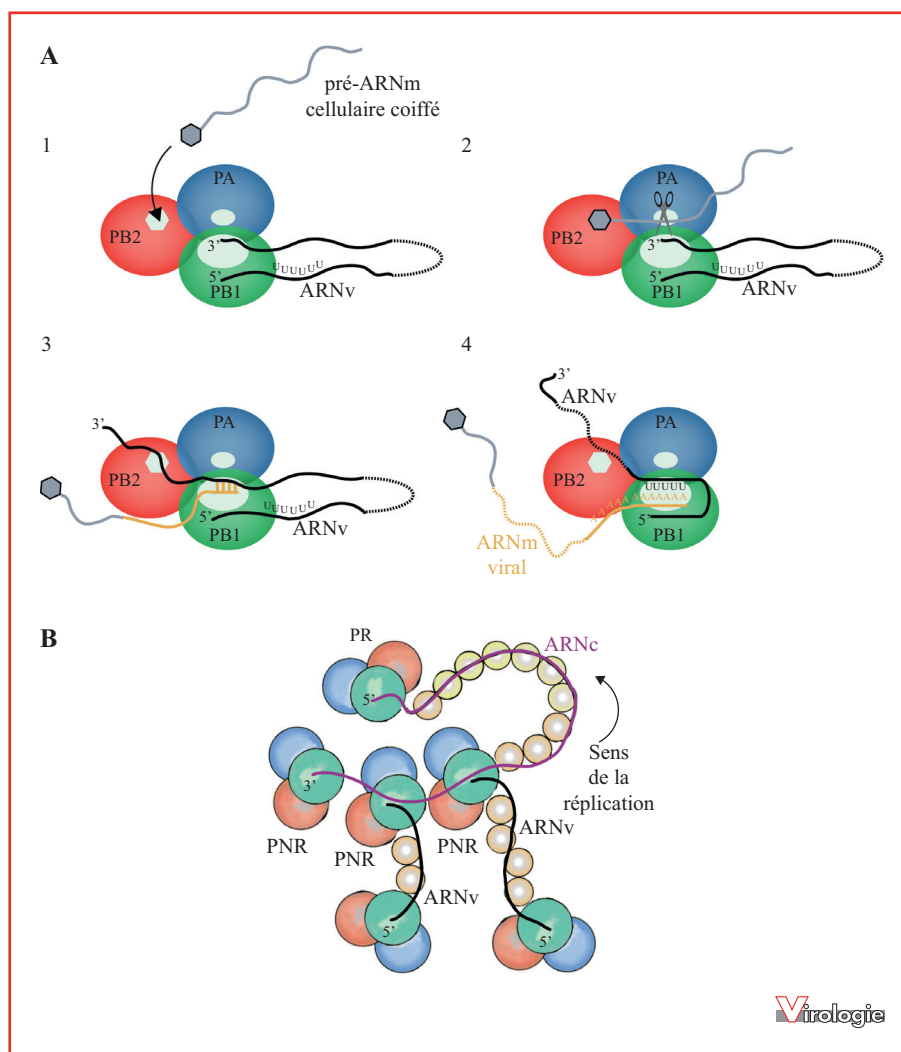


Figure 2. L'amplification du matériel génétique du virus de la grippe. **A)** La transcription coiffe-dépendante. Pour plus de lisibilité de cette partie, les protomères de nucléoprotéine (NP) ont été volontairement omis de la représentation schématique. **(1)** Le pré-ARNm cellulaire (gris) est reconnu par le site de liaison à la coiffe porté par la sous-unité PB2 puis **(2)** coupé dix à 13 nucléotides après la coiffe par le site endonucléase porté par la sous-unité PA. **(3)** Le petit oligonucléotide d'ARN cellulaire coiffé sert alors d'amorce pour initier la transcription des ARNm viraux **(4)**, qui sont polyadénylés par bégaiement de l'ARN polymérase au niveau d'une séquence poly-U présente à l'extrémité 5' de l'ARNv. **B)** La réplication en *trans*. Lors d'une première phase, l'ARNc (violet), synthétisé à partir de l'ARNv, est encapsidé par une ARN polymérase hétérotrimérique dite « résidente » (PR) et des protomères de NP. Son extrémité 3' serait accessible à des complexes hétérotrimériques « non-résidents » (PNR) produisant les ARNv (noir) qui, à leur tour encapsidés, formeraient les ribonucléoprotéiques (RNP) amplifiées. Figure adaptée de [25].

l'efficacité de synthèse et d'accumulation de l'ARN [17-19] mais également sur la capacité des RNPv de réaliser une transcription coiffe-dépendante à l'inverse des RNPc [18, 20] ? À partir des nombreuses données génétiques obtenues, un mécanisme réplcatif en *trans* faisant intervenir des complexes polymérasiques solubles indépendants a été proposé (figure 2B) [21-25]. Au cours d'une première étape, l'ARNc synthétisé à partir de l'ARNv serait

encapsidé par une ARN polymérase dite « résidente » (PR) et des protomères de NP. L'activation de la synthèse de l'ARNv résulterait de l'interaction d'un complexe polymérasique soluble dit « non-résident » (PNR) néosynthétisé, avec les RNPc. Cette interaction libérerait l'extrémité 3' de l'ARNc qui, une fois accessible, permettrait la synthèse de l'ARNv. Dans ce modèle, l'ARN polymérase « résidente » ne participerait en aucune manière à la synthèse d'ARNv,

l'encapsidation des ARNv néosynthétisés se faisant au fur et à mesure de leur élongation. Bien qu'elles n'interagissent alors pas avec le même complexe polymérasique, ce modèle satisfait les données selon lesquelles les extrémités 3' et 5' sont toutes deux requises pour assurer une réplication efficace [11, 26, 27].

L'ARN polymérase du virus de la grippe

Outre la segmentation de leur génome, une particularité des virus de la famille des *Orthomyxoviridae* est de posséder une ARN polymérase virale résultant de l'assemblage de trois sous-unités distinctes (figure 3C). Les trois protéines sont appelées PB1, PB2 (pour protéine basique 1 et 2) et PA (protéine acide). L'assemblage du complexe hétérotrimérique résulte de l'interaction de l'extrémité C-terminale d'une des sous-unités avec l'extrémité N-terminale d'une deuxième, avec dans l'ordre PA-PB1-PB2 (figure 3C). Les différentes activités indispensables à l'activité de transcription coiffe-dépendante sont réparties sur les trois protéines du complexe. La sous-unité PB1 porte le domaine polymérase [28], responsable de l'activité de synthèse de l'ARN [29]. PB2 fixe la coiffe présente à l'extrémité 5' des pré-ARNm cellulaires [30, 31]. La sous-unité PA, quant à elle, porte l'activité endonucléase impliquée dans le mécanisme de vol de coiffe [32-34]. Ce complexe hétérotrimérique seul ne peut être produit qu'en cellules d'insecte ou en cellules de mammifère. Les quantités obtenues dans ce cas sont adéquates pour des études biochimiques [35] ainsi que des études structurales en microscopie électronique à coloration négative [4] mais en aucune manière suffisantes pour des études structurales, même menées par cryomicroscopie électronique. Pour progresser sur le chemin de son fonctionnement, la stratégie employée dans les années écoulées a consisté dans le découpage de l'hétérotrimère en domaines isolés. Cette stratégie a été la source d'avancées importantes dans la compréhension du mécanisme moléculaire de la transcription.

La sous-unité PA

Des trois sous-unités constituant l'ARN polymérase virale, seule PA peut être produite seule, sous forme soluble, uniquement en cellules d'insecte. Sa protéolyse ménagée libère deux fragments, respectivement, de 25 et de 55 kDa [36]. Le large fragment C-terminal de PA complexé à un court peptide correspondant à l'extrémité N-terminale de PB1 a été cristallisé par deux laboratoires (figure 3B) [37, 38]. La cavité de la sous-unité PA accommodant l'extrémité

N-terminale de PB1 est formée de résidus fortement conservés au sein des différentes souches des virus influenza de type A. Mis à part son rôle dans la formation du complexe PA-PB1, la fonction biologique du domaine C-terminal de PA demeure encore largement inconnue. L'analyse des deux structures obtenues montre que le domaine possède une face chargée négativement comme attendu pour cette sous-unité acide, mais également une face opposée présentant un sillon chargé positivement, contenant des résidus hautement conservés, dans lequel pourrait se loger un ARN simple brin.

La structure de la partie N-terminale de PA a également été résolue conjointement par deux laboratoires (figure 3A) [32, 33]. La structure montre un domaine organisé autour d'un repliement similaire à celui des enzymes de restriction de type II et plus généralement celui de la famille de nucléases de type PD-(D/E)XK. Le domaine présente une surface globalement chargée négativement avec une cavité encore plus acide [32, 39]. Yuan *et al.* ont cristallisé le domaine en présence de magnésium et ont pu identifier un ion Mg^{2+} interagissant avec les résidus acides conservés présents dans cette cavité. Les études fonctionnelles réalisées en parallèle sur l'ARN polymérase recombinante indiquent que la mutation de ces résidus conservés de PA affecte spécifiquement l'activité de transcription ARN-dépendante alors que l'activité de réplication est conservée [33]. Dias *et al.* ont quant à eux cristallisé le domaine en présence de manganèse. Structuralement, ils ont mis en évidence la présence de deux ions Mn^{2+} dans la cavité chargée négativement. L'un des ions occupe la même position que celle de l'ion Mg^{2+} de la première structure citée, alors que le second Mn^{2+} se trouve dans un site localisé à 4 Å du premier, suggérant un mécanisme catalytique impliquant deux métaux. De façon inhabituelle pour cette famille d'enzymes, le second Mn^{2+} interagit avec une histidine présente dans la cavité acide, résidu connu pour interagir spécifiquement avec le manganèse. Cela explique l'absence d'un second Mg^{2+} dans la structure obtenue par Yuan *et al.* Dias *et al.* ont également montré que le domaine isolé possédait une activité endonucléase dépendante de la présence d'ions Mn^{2+} , Co^{2+} ou Mg^{2+} sur des ARN et des ADN simples brins, comme cela avait été précédemment décrit dans le cadre de la RNP [40]. Les deux groupes ont ainsi montré conjointement que l'activité endonucléase du mécanisme de vol de coiffe incombait au domaine N-terminal de la sous-unité PA. La mutation de chacun des résidus impliqués dans la stabilisation du manganèse a été effectuée et a montré leurs implications dans l'activité de dégradation de l'ARN [39]. La cavité acide présente à la surface du domaine correspond au site actif autour duquel des résidus conservés chargés positivement pourraient être impliqués dans le positionnement du pré-ARNm cellulaire en vue

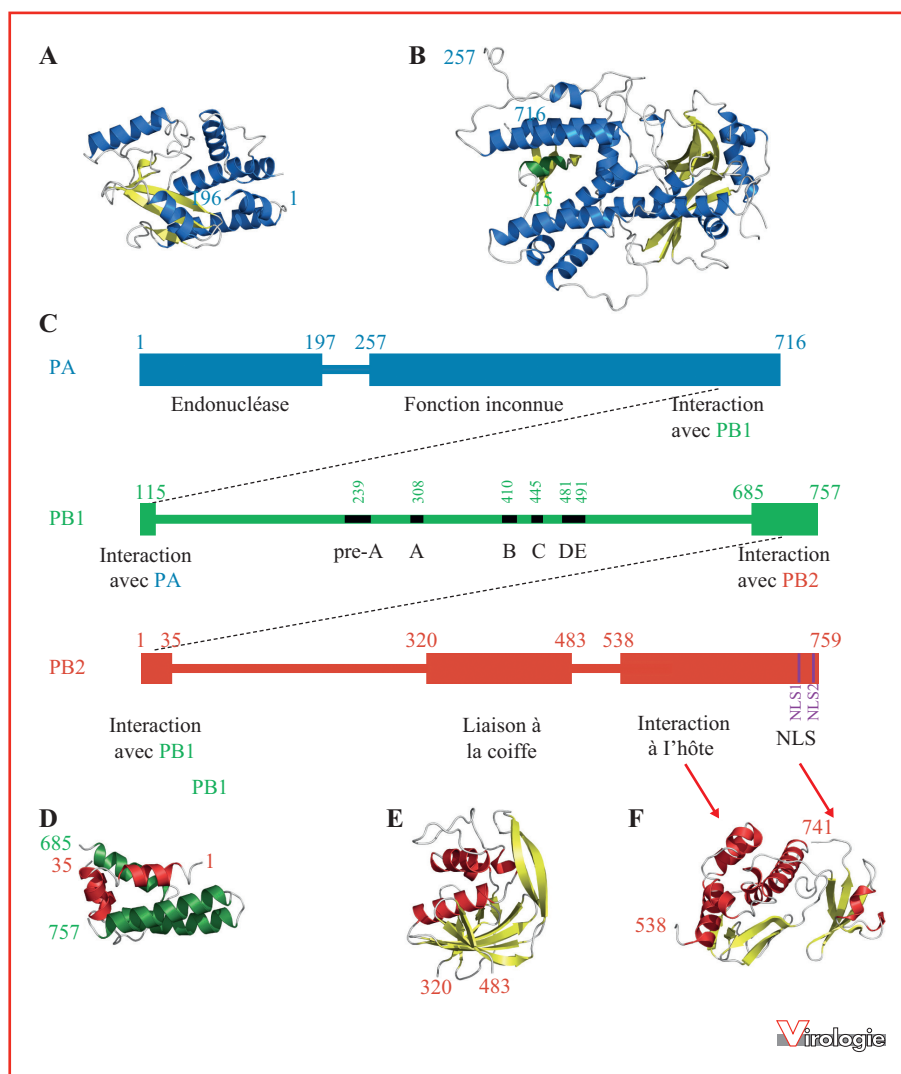


Figure 3. L'ARN polymérase du virus de la grippe. **A)** Structure du domaine endonucléase de PA de la souche humaine H3N2 (numéro d'accès PDB 2W69) avec les hélices- α représentées en bleu et les feuillets- β en jaune. **B)** Structure du large domaine C-terminal de PA de la souche aviaire H5N1 (numéro d'accès PDB 3CM8) avec les hélices- α représentées en bleu et les feuillets- β en jaune, en complexe avec l'extrémité N-terminale de PB1 (hélice- α verte). **C)** Diagramme représentant les structures primaires de PA (bleu), PB1 (vert) et PB2 (rouge) sur lesquelles sont indiquées les régions de structures et de fonctions connues (parties plus épaisses). Les numéros colorés correspondent aux limites exactes des domaines correspondants. PB1 interagit à la fois avec PA par son extrémité N-terminale et avec PB2 par son extrémité C-terminale (pointillés) et porte les motifs caractéristiques des ARN polymérases ARN-dépendante (pré-A et A à E dont les positions correspondent aux chiffres verts). **D)** Structure du complexe entre les extrémités C-terminale de PB1 (hélices- α vertes) et N-terminale de PB2 (hélices- α rouges) de la souche humaine H1N1 (numéro d'accès PDB 3A1G). **E)** Structure du domaine de liaison à la coiffe de PB2 de la souche humaine H3N2 (numéro d'accès PDB 2VQZ) avec les hélices- α représentées en rouge et les feuillets- β en jaune. **F)** Structure du double domaine 627-NLS de PB2 de la souche humaine H3N2 (numéro d'accès PDB 2VY6) avec les hélices- α représentées en rouge et les feuillets- β en jaune.

de sa coupure [32, 39]. Initialement attribuée à la sous-unité PB1 [30], la localisation de l'activité endonucléase sur PA était tout à fait inattendue, démontrant s'il le fallait, une fois de plus, l'importance de l'association des études structurales et fonctionnelles.

La sous-unité PB2

De tous les fragments de l'hétérotrimère connus à ce jour, le premier dont la structure a été résolue est le domaine correspondant à l'extrémité C-terminale de PB2 (résidus

686-759) [41], aussi appelé domaine *nuclear localisation signal* (NLS) car contenant la séquence de localisation nucléaire bipartite (*figures 3C et F*). La structure de ce domaine a été obtenue sous deux formes, par RMN sous forme isolée en solution et par cristallographie complexée à l'importine- $\alpha 5$ humaine [41]. La comparaison des deux formes met en avant des différences significatives. Ainsi, dans la structure obtenue par RMN, la séquence NLS bipartite est repliée contre le cœur globulaire du domaine, alors que dans la forme complexée, la même séquence présente une conformation étendue se logeant dans le sillon présent à la surface de l'importine- α . Couplé à la GFP, le domaine NLS permet de localiser la fluorescence intrinsèque de cette sonde dans le noyau des cellules transfectées, démontrant ainsi son implication dans le transport nucléaire de PB2. Il a également été mis en évidence que certaines mutations ponctuelles dans cette séquence NLS bipartite inhibaient l'import de PB2 dans le noyau [41].

Le second domaine (résidus 320-483) de PB2, dont la structure a été déterminée, correspond au domaine central [31]. La structure révèle un domaine possédant un repliement jamais décrit auparavant, impliqué dans la fixation de la coiffe de l'ARNm, processus indispensable au mécanisme de vol de coiffe (*figure 2A-1 et figure 3E*). Obtenue en présence de $^7\text{mGTP}$, molécule analogue de la coiffe, la structure a permis d'identifier les résidus impliqués dans la reconnaissance spécifique de la 7-méthyl-guanine, tous strictement conservés dans les souches du virus influenza de type A. Cette structure a également mis fin à la controverse concernant la localisation exacte du site de reconnaissance de la coiffe sur PB2. La base méthylée chargée positivement du $^7\text{mGTP}$ est prise en sandwich entre les résidus aromatiques (His-357 et Phe-404), les résidus Glu-361 et Lys-376 étant quant à eux impliqués dans la reconnaissance spécifique de la guanine. Le mode de reconnaissance de la coiffe présente des similarités avec ceux précédemment décrits pour le complexe nucléaire CBC (*cap-binding complex*) ou le facteur d'initiation de la traduction eIF4E [42, 43]. Cependant, l'affinité pour la coiffe est bien plus faible dans le cas de PB2 que pour ces protéines cellulaires, cela pouvant s'expliquer par un positionnement du substrat beaucoup moins optimal. Dans le contexte d'une mini-RNP reconstituée *in cellulo*, la mutation ponctuelle de ces résidus clés abolit l'activité de transcription coiffe-dépendante alors que l'activité de réplication, elle, est conservée [31].

Le dernier domaine de PB2 (résidus 538-678), dont la structure cristallographique a été résolue, présente également un nouveau repliement (*figure 3F*) [44]. Ce domaine contient le résidu 627, important pour la spécificité du virus de la grippe pour son hôte. Ce résidu est presque exclusivement une lysine chez les virus de type A humains (sauf dans la souche pandémique A-H1N1 de 2009) et presque exclusivement

un glutamate chez les virus de type A aviaires. La mutation E627K entraîne une augmentation de l'activité polymérase dans les cellules de mammifère, notamment à basse température. Elle pourrait ainsi favoriser la réplication virale dans les parties hautes de l'appareil respiratoire chez l'Homme, lieu où la température est plus basse, comparé à l'intestin des oiseaux, siège principal de la réplication [45]. La structure du domaine montre que la lysine 627 est exposée au solvant, en surface d'une région fortement chargée positivement. La mutation en glutamate perturbe la surface électrostatique du domaine [44]. Néanmoins, le mécanisme moléculaire sous-jacent de l'implication du résidu Lys/Glu627 dans la prolifération du virus n'est pas clairement établi [45]. La structure du double domaine 627-NLS a également été résolue, montrant que les deux domaines sont connectés par une partie flexible correspondant à la région allant des résidus 678-685 [44, 46]. La superposition de la structure obtenue pour le double domaine 627-NLS avec celle du domaine NLS en complexe avec l'importine- $\alpha 5$ montre que l'orientation du domaine NLS par rapport au domaine 627 est incompatible avec celle observée lors de son interaction avec l'importine- α , suggérant un réarrangement de ces domaines lors du processus d'assemblage de l'ARN polymérase virale. Les surfaces du domaine de reconnaissance de la coiffe et du double domaine 627-NLS présentent toutes deux une charge électrostatique majoritairement positive, suggérant une implication potentielle dans la fixation de l'ARN. L'agencement spatial de ces domaines au sein du complexe hétérotrimérique est peut-être une hypothèse pour expliquer la taille des amorces, nécessaire à l'ARN polymérase virale lors de l'initiation de la phase transcriptionnelle. Dix à 13 nucléotides pourraient être la distance relative entre le domaine de liaison à la coiffe porté par PB2 et le site endonucléase porté par PA.

La sous-unité PB1

PB1 est le cœur de l'hétérotrimère, interagissant à la fois avec PA par son extrémité N-terminale et avec PB2 par son extrémité C-terminale (*figure 3C*). Les zones d'interaction avec les deux autres sous-unités sont les seules parties de PB1 dont les structures ont été résolues à ce jour, représentant 12 % de la protéine. Une petite hélice- α N-terminale (résidus 1-15) vient se loger dans la cavité présente au niveau du large domaine C-terminal de PA (*figure 3B*) [37, 38] et un fagot de trois hélices- α formant la partie C-terminale (résidus 685-757 de PB1) interagit avec les résidus 1-35 de PB2, également en hélices- α (*figure 3D*) [47]. Ces zones d'interaction sont essentielles au bon fonctionnement de l'ARN polymérase virale. Ainsi, certaines mutations dans ces régions affectent drastiquement à la fois

l'activité transcriptionnelle coiffe-dépendante et l'activité réplicative. La région centrale de PB1 comporte les motifs conservés A-D spécifiques des ARN polymérases ARN-dépendantes [28] ainsi que le pré-motif A et le motif E (*figure 3C*), ce dernier étant quant à lui spécifique des virus à ARN négatif segmenté [48]. À ce jour, aucune structure du domaine ARN polymérase ARN-dépendante de virus à ARN négatif (segmenté ou non) n'a été résolue, alors que celles de nombreuses ARN polymérases ARN-dépendantes de virus à ARN de polarité positive sont connues (par exemple, celles du poliovirus ou du virus de l'hépatite C [49]).

La nucléoprotéine

La NP est un partenaire à part entière du complexe de réplication/transcription. Elle participe à l'architecture de la RNP en recouvrant et protégeant les huit segments d'ARNv. Du point de vue fonctionnel, elle posséderait un rôle clé dans le transport des RNP et dans la régulation des mécanismes de réplication et de transcription de l'ARNv [15, 45] et pourrait notamment être le facteur déterminant du basculement entre les phases transcriptionnelle et réplicative [50].

L'étude cristallographique des partenaires isolés du complexe RNP viral a chronologiquement commencé par l'obtention de la structure de la NP (*figure 4*). Elle présente un repliement différent de celui de la NP d'autres virus à ARN négatif, telles que celles des rhabdovirus [51], des paramyxovirus [52] ou des bornavirus [53] (pour comparaison [54, 55]). Depuis 2006, trois structures cristallographiques ont été résolues, toutes en absence d'ARN et sous une forme oligomérique : NP de type A-H1N1 et A-H5N1 en trimère [56, 57], alors que celle de type B, résolue récemment, forme un tétramère [58]. Quel que soit le type et/ou la souche, la NP présente une boucle de 27 résidus exposée à l'extérieur du corps de la protéine, permettant l'oligomérisation (*figure 4B*). À l'opposé de cette boucle, la surface présente un sillon chargé positivement, possible site d'interaction avec l'ARN (*figure 4A*). L'interaction entre la NP du virus de la grippe et l'ARN viral (ARNv + ARNc) ne dépend d'aucune séquence nucléotidique ni d'aucun motif consensus [59]. La longueur du fragment d'ARN couvert par un protomère de NP est relativement importante. Elle serait de 24 nucléotides [15, 60, 61] et doit être comparée à celles de virus à ARN non segmenté comme le virus de la rage ou encore le virus respiratoire syncytial pour lesquels les NP couvrent, respectivement, neuf et sept nucléotides [51, 52, 55].

Aux vues des structures (*figure 4B*) et des données biochimiques obtenues, la NP apparaît être un partenaire

extrêmement dynamique. Il a été récemment montré que NP pouvait être stabilisée sous une forme monomérique ou oligomérique en fonction de la force ionique [62]. Une fois le monomère de NP stabilisé, il est possible *in vitro* de déplacer l'équilibre monomère/oligomère en présence d'ARN de tailles différentes. Avec un ARN de 25 nucléotides, l'équilibre tendra vers un mélange trimère-tétramère alors qu'en utilisant un ARN de 51 bases, des anneaux de tailles hétérogènes peuvent être obtenus (*figure 4C*). Ces anneaux semblent très proches dans leur organisation aux RNP virales dépliées (*figure 1A*) et aux mini-RNP recombinantes (*figure 1B*) [2, 3, 61]. Il est ainsi possible d'imaginer que l'interaction d'un protomère de NP avec l'ARN stabilise sa boucle d'oligomérisation dans une conformation lui permettant alors d'interagir dans ces conditions, de façon stable avec un autre protomère et ainsi amorcer un processus d'assemblage comparable au processus menant à la formation des RNP.

Vers de nouvelles molécules antivirales

Dès la publication des premières structures, les compagnies pharmaceutiques établies ainsi que les émergentes ont commencé à développer des molécules organiques ciblant la transcription coiffe-dépendante et la réplication [63, 64]. À ce jour, dans le cas de la NP, les molécules développées provoquent soit son oligomérisation et limitent alors son transport nucléaire [65, 66], soit au contraire limitent son oligomérisation *via* sa boucle d'oligomérisation [67]. Concernant l'ARN polymérase, la première cible envisagée est la cavité présente au niveau du domaine C-terminal de PA, cavité assurant l'interface avec la partie N-terminale de PB1 (voir ci-dessus). Des travaux ont montré qu'un peptide de 25 acides aminés, homologue à l'extrémité N-terminale de PB1, pouvait inhiber l'activité de l'ARN polymérase et la réplication du virus [68, 69]. Récemment, de petites molécules inhibitrices ont été conçues pour perturber cette interface [70]. Enfin, des deux sites actifs que sont le site de liaison de la coiffe porté par PB2 et le site endonucléase de PA, seuls ont abouti des inhibiteurs de l'activité endonucléase liant deux ions métalliques dans le site actif [71, 72], aucun inhibiteur de haute affinité contre le site de liaison à la coiffe n'ayant été rapporté jusqu'à présent.

Remerciements. Ce travail a été partiellement financé par le contrat de la Commission européenne (*grant agreement No. 259751, Flupharm project : New drugs targeting influenza virus polymerase, 11/2010-05/2014*), le contrat ANR NUCLEOVIR, Lyon Biopôle et la fondation FINOVI.

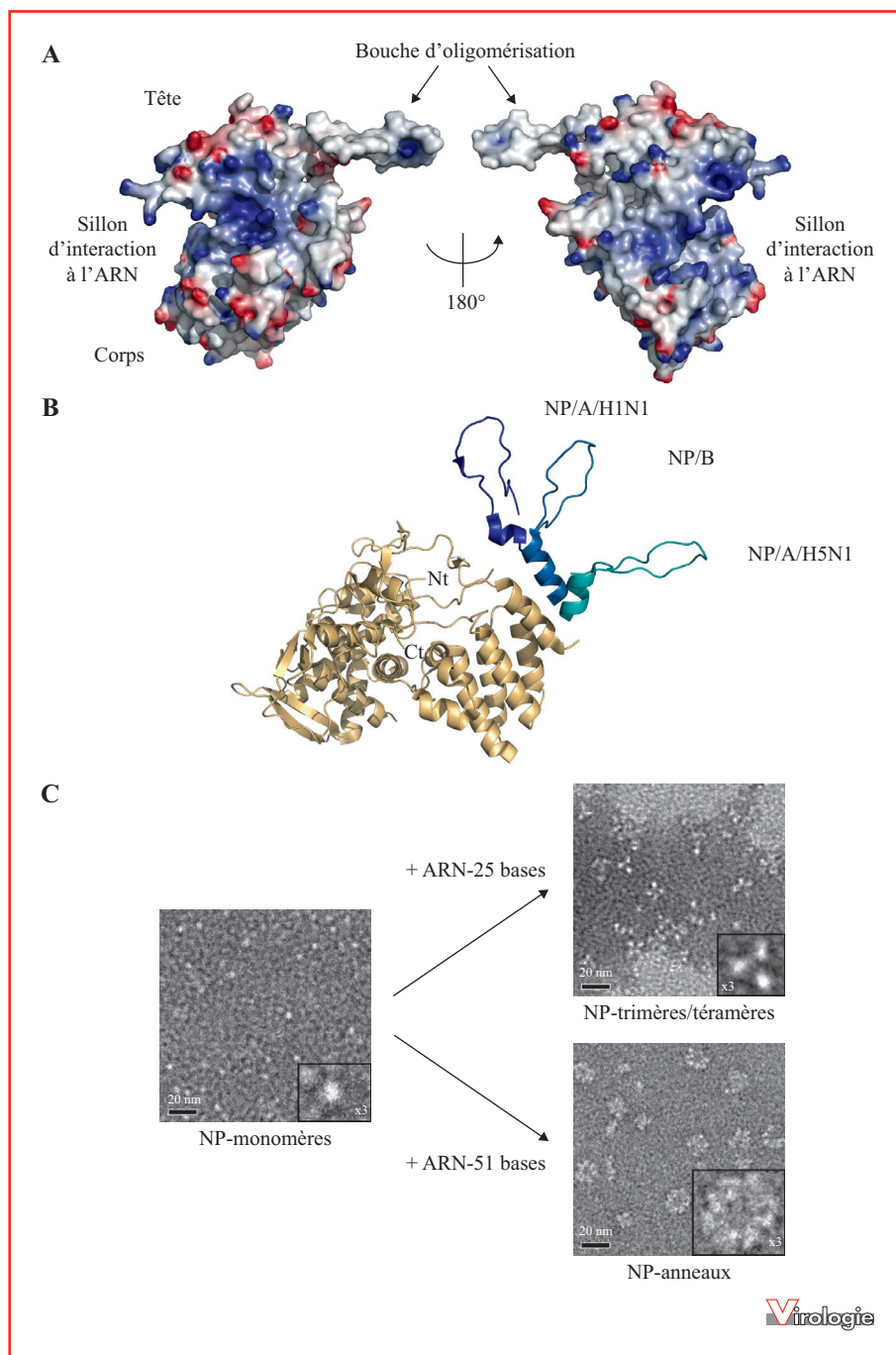


Figure 4. La nucléoprotéine (NP) du virus de la grippe. **A)** Surface électrostatique de la NP de la souche humaine H1N1 (numéro d'accès PDB 2IQH) montrant la boucle d'oligomérisation ainsi que le sillon chargé positivement, site potentiel de liaison à l'ARN. **B)** Superposition des structures de la NP des souches humaine H1N1 et aviaire H5N1 (numéro d'accès PDB 2Q06) avec celle du virus de type B (numéro d'accès PDB 3TJ0). Le corps de ces NP se superposant parfaitement, seul celui de la NP de la souche humaine H1N1 est représenté en beige. La boucle d'oligomérisation de chaque NP est indiquée respectivement en bleu nuit, bleu marine et cyan, présentant l'éventail de positions observées. **C)** Micrographes obtenus par microscopie électronique en coloration négative de la NP de la souche humaine H1N1 monomérique seule et en présence d'ARN de tailles différentes. À température ambiante, un ARN de 25 bases déplace l'équilibre vers des trimères-tétramères alors qu'un ARN de 51 bases permet la formation d'anneaux de NP de taille hétérogène [62].

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

- Martin-Benito J, Area E, Ortega J, *et al.* Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* 2001 ; 2 : 313-7.
- Area E, Martin-Benito J, Gastaminza P, *et al.* 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 308-13.
- Coloma R, Valpuesta JM, Arranz R, Carrascosa JL, Ortin J, Martin-Benito J. The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* 2009 ; 5 : e1000491.
- Torreira E, Schoehn G, Fernandez Y, *et al.* Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : 3774-83.
- Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* 1981 ; 23 : 847-58.
- Jin H, Elliott RM. Non-viral sequences at the 5' ends of Dugbe naivirus S mRNAs. *J Gen Virol* 1993 ; 74 (Pt 10) : 2293-7.
- Tiley LS, Hagen M, Matthews JT, Krystal M. Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol* 1994 ; 68 : 5108-16.
- Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG. The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* 1994 ; 68 : 4092-6.
- Poon LL, Pritlove DC, Fodor E, Brownlee GG. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* 1999 ; 73 : 3473-6.
- Gonzalez S, Ortin J. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J* 1999 ; 18 : 3767-75.
- Vreede FT, Brownlee GG. Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA *in vitro*. *J Virol* 2007 ; 81 : 2196-204.
- Hay AJ, Lomniczi B, Bellamy AR, Skehel JJ. Transcription of the influenza virus genome. *Virology* 1977 ; 83 : 337-55.
- Beaton AR, Krug RM. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 ; 83 : 6282-6.
- Medcalf L, Poole E, Elton D, Digard P. Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol* 1999 ; 73 : 7349-56.
- Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multi-functional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 2002 ; 83 : 723-34.
- Vreede FT, Ng AK, Shaw PC, Fodor E. Stabilization of influenza virus replication intermediates is dependent on the RNA-binding but not the homo-oligomerization activity of the viral nucleoprotein. *J Virol* 2011 ; 85 : 12073-8.
- Marion RM, Zurcher T, de la Luna S, Ortin J. Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes *in vivo*. *J Gen Virol* 1997 ; 78 (Pt 10) : 2447-51.
- Honda A, Endo A, Mizumoto K, Ishihama A. Differential roles of viral RNA and cRNA in functional modulation of the influenza virus RNA polymerase. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 31179-85.
- Falcon AM, Marion RM, Zurcher T, *et al.* Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol* 2004 ; 78 : 3880-8.
- Cianci C, Tiley L, Krystal M. Differential activation of the influenza virus polymerase *via* template RNA binding. *J Virol* 1995 ; 69 : 3995-9.
- Nakagawa Y, Kimura N, Toyoda T, *et al.* The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis. *J Virol* 1995 ; 69 : 728-33.
- Lee MT, Bishop K, Medcalf L, Elton D, Digard P, Tiley L. Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30 : 429-38.
- Honda A, Mizumoto K, Ishihama A. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; 99 : 13166-71.
- Jorba N, Coloma R, Ortin J. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* 2009 ; 5 : e1000462.
- Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol* 2011 ; 8 : 207-15.
- Hagen M, Chung TD, Butcher JA, Krystal M. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J Virol* 1994 ; 68 : 1509-15.
- Olson AC, Rosenblum E, Kuchta RD. Regulation of influenza RNA polymerase activity and the switch between replication and transcription by the concentrations of the vRNA 5' end, the cap source, and the polymerase. *Biochemistry* 2010 ; 49 : 10208-15.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 1989 ; 8 : 3867-74.
- Biswas SK, Nayak DP. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* 1994 ; 68 : 1819-26.
- Li ML, Rao P, Krug RM. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J* 2001 ; 20 : 2078-86.
- Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, *et al.* The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* 2008 ; 15 : 500-6.
- Dias A, Bouvier D, Crepin T, *et al.* The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 2009 ; 458 : 914-8.
- Yuan P, Bartlam M, Lou Z, *et al.* Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* 2009 ; 458 : 909-13.
- Dias A, Bouvier D, Cusack S, Ruigrok RW, Crepin T. New strategy for targeting influenza virus replication. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 352-4.
- Newcomb LL, Kuo RL, Ye Q, Jiang Y, Tao YJ, Krug RM. Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol* 2009 ; 83 : 29-36.
- Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG. Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* 2006 ; 80 : 7789-98.
- He X, Zhou J, Bartlam M, *et al.* Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* 2008 ; 454 : 1123-6.
- Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, *et al.* The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 2008 ; 454 : 1127-31.
- Crepin T, Dias A, Palencia A, Swale C, Cusack S, Ruigrok RW. Mutational and metal binding analysis of the endonuclease domain of the influenza virus polymerase PA subunit. *J Virol* 2010 ; 84 : 9096-104.
- Doan L, Handa B, Roberts NA, Klumpp K. Metal ion catalysis of RNA cleavage by the influenza virus endonuclease. *Biochemistry* 1999 ; 38 : 5612-9.
- Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, *et al.* Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 2007 ; 14 : 229-33.

42. Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 1997; 89: 951-61.
43. Mazza C, Segref A, Mattaj JW, Cusack S. Large-scale induced fit recognition of an m(7)GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *EMBO J* 2002; 21: 5548-57.
44. Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S, Hart DJ. Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000136.
45. Naffakh N, Tomoiu A, Rameix-Welti MA, van der Werf S. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* 2008; 62: 403-24.
46. Kuzuhara T, Kise D, Yoshida H, et al. Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue. *J Biol Chem* 2009; 284: 6855-60.
47. Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, et al. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *EMBO J* 2009; 28: 1803-11.
48. Muller R, Poch O, Delarue M, Bishop DH, Bouloy M. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol* 1994; 75 (Pt 6): 1345-52.
49. Ng KK, Arnold JJ, Cameron CE. Structure-function relationships among RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 320: 137-56.
50. Skorko R, Summers DF, Galarza JM. Influenza A virus *in vitro* transcription: roles of NS1 and NP proteins in regulating RNA synthesis. *Virology* 1991; 180: 668-77.
51. Albertini AA, Wernimont AK, Muziol T, et al. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 2006; 313: 360-3.
52. Tawar RG, Duquerroy S, Vornheim C, et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 2009; 326: 1279-83.
53. Rudolph MG, Kraus I, Dickmanns A, Eickmann M, Garten W, Ficner R. Crystal structure of the Borna disease virus nucleoprotein. *Structure* 2003; 11: 1219-26.
54. Ruigrok RW, Crepin T. Commentary: nucleoproteins of negative strand RNA viruses; RNA binding, oligomerisation and binding to polymerase co-factor. *Viruses* 2010; 2: 27-32.
55. Ruigrok RW, Crepin T, Kolakofsky D. Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14: 504-10.
56. Ye Q, Krug RM, Tao YJ. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* 2006; 444: 1078-82.
57. Ng AK, Zhang H, Tan K, et al. Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J* 2008; 22: 3638-47.
58. Ng AK, Lam MK, Zhang H, et al. Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein. *J Virol* 2012; 86: 6758-67.
59. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J* 1994; 13: 3158-65.
60. Compans RW, Content J, Duesberg PH. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* 1972; 10: 795-800.
61. Ortega J, Martin-Benito J, Zurcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortin J. Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* 2000; 74: 156-63.
62. Tarus B, Bakowicz O, Chenavas S, et al. Oligomerization paths of the nucleoprotein of influenza A virus. *Biochimie* 2012; 94: 776-85.
63. Das K, Aramini JM, Ma LC, Krug RM, Arnold E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 530-8.
64. Das K. Antivirals targeting influenza A virus. *J Med Chem* 2012; 55: 6263-77.
65. Kao RY, Yang D, Lau LS, et al. Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 600-5.
66. Gerritz SW, Cianci C, Kim S, et al. Inhibition of influenza virus replication via small molecules that induce the formation of higher-order nucleoprotein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 15366-71.
67. Shen YF, Chen YH, Chu SY, et al. E339...R416 salt bridge of nucleoprotein as a feasible target for influenza virus inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 16515-20.
68. Ghanem A, Mayer D, Chase G, et al. Peptide-mediated interference with influenza A virus polymerase. *J Virol* 2007; 81: 7801-4.
69. Wunderlich K, Mayer D, Ranadheera C, et al. Identification of a PA-binding peptide with inhibitory activity against influenza A and B virus replication. *PLoS One* 2009; 4: e7517.
70. Muratore G, Goracci L, Mercorelli B, et al. Small molecule inhibitors of influenza A and B viruses that act by disrupting subunit interactions of the viral polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 6247-52.
71. Dubois RM, Slavish PJ, Baughman BM, et al. Structural and biochemical basis for development of influenza virus inhibitors targeting the PA endonuclease. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002830.
72. Kowalinski E, Zubieta C, Wolkerstorfer A, Szolar OH, Ruigrok RW, Cusack S. Structural analysis of specific metal chelating inhibitor binding to the endonuclease domain of influenza pH1N1 (2009) polymerase. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002831.

PUBLICATION N°2

Dégut, C., Monod, A., Brachet, F., Crépin, T., and Tisné, C. (2014).

In vitro/in vivo production of tRNA for X-ray studies

(*soumis*)

Lors de ce projet de thèse, la méthode de production d'ARN par transcription *in vitro* a occupé une place centrale. Elle a en effet permis de produire, en routine, différents ARN mimant l'ARN viral pour l'étude de leur interaction avec l'ARN-polymérase du virus de la grippe. Cette méthode, ainsi que la stratégie de purification des ARN utilisée ont été détaillées dans cet article de méthodologie à travers la production d'ARNt destinés aux études par diffraction des rayons-X.

***In vitro/in vivo* production of tRNA for X-ray studies**

Clément Dégut¹, Alexandre Monod^{2,3,4}, Franck Brachet¹, Thibaut Crépin^{2,3,4}, Carine Tisné¹

(1) Laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques, CNRS, Paris Sorbonne Cité, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris.

(2) Univ. Grenoble Alpes, UVHCI, F-38000 Grenoble, France

(3) CNRS, UVHCI, F-38000 Grenoble, France

(4) Unit for Virus Host-Cell Interactions, Univ. Grenoble Alpes-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 France.

Abstract

tRNA occupy a central role in the cellular life and they are involved in a broad range of biological processes that relies on their interaction with proteins and RNA. Crystallization and structure resolution of tRNA or/and tRNA/partner complexes can yield in valuable information on structural organizations of key elements of cellular machinery. However, crystallization of RNA, is often challenging. Here we review two methods to produce and purify tRNA in quantity and quality to perform X-ray studies.

Key words: *in vitro* transcription, *in vivo* production, tRNA purification, crystallization

1. Introduction

tRNAs are universally conserved key components of the translation machinery, linking the genetic code with the amino acid sequence of proteins. tRNAs have a length of 73–90 nucleotides (nt) and have a characteristic secondary structure in cloverleaf and a tertiary structure in the so-called « L-shape » (Fig. 1.). tRNA represent one of the most abundant cellular transcripts and amount up to 15% of the total cellular RNAs. They belong to the most stable RNAs in a cell (1) with half lives of hours to days. Folding and stability of tRNA molecules is further controlled by numerous post-transcriptional modifications that cluster primarily in the anticodon-, the D- and T-arms (2). Since structural and functional integrity of tRNA molecules is crucial for proper cellular functioning, many control pathways evolved, which recognize and degrade misfolded or hypomodified tRNA molecules rapidly (3).

2014 celebrates respectively the 40th anniversary of the first high resolution tRNA crystal structure (4, 5) and the 25th anniversary of the first crystal structure of a complex between an aminoacyl-tRNA synthetase and its cognate tRNA (6). 40 years and they are still matter of research in structural biology since advances in biochemistry, crystallization, collection and treatment of X-ray data allow to tackle more complex biological assembly involving, for instance, tRNA in the ribosome (7-10), or in complex with enzyme involved in the processing and/or maturation of tRNA. Moreover, newly discovered functions of tRNA have boosted new structural studies with tRNA molecules. For instance, tRNAs have been shown to act as stress-sensors by regulating numerous metabolic and cellular processes, in both prokaryotes and eukaryotes. For example, in *E. coli*, uncharged tRNAs act as signaling molecules under nutritional stress, activating the stringent response pathway and thereby promoting cell survival (11). A similar function in gene expression has been described in yeast and human cells (12). Upon binding to T-box elements located in the 5' UTR of cistronic bacterial mRNAs, tRNA are capable of regulating aminoacyl-tRNA synthetase genes or genes involved in amino acid biosynthesis and uptake (13, 14). Besides, tRNAs can also serve as primers for the replication of viruses, participate in cell wall synthesis, and in the biosynthesis of certain porphyrines and amino acids (15).

These newly discovered functions involve newly discovered partners for tRNA and make that tRNA and/or tRNA co-crystallization is still relevant nowadays. In this paper, we detail protocols used in our labs to produce tRNA by *in vivo* or *in vitro* strategies ready for crystallization assay and X-ray studies (16-19). We will focus on the production of *B. subtilis* tRNA^{Ser} (GGA) that is 92 nucleotides long since it has a large variable loop. This tRNA is under study in one of our group as the substrate of a modifying enzyme.

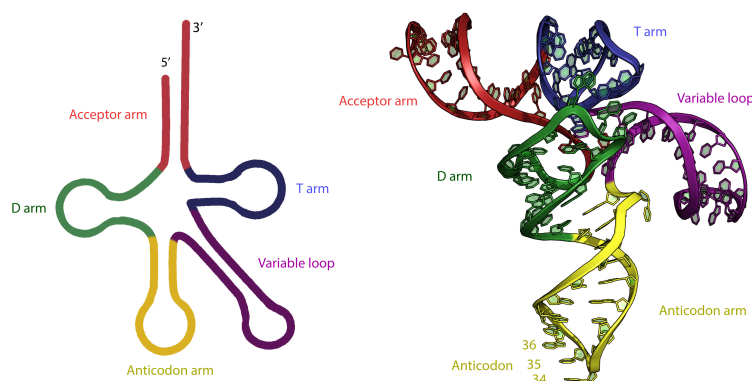


Fig.1. Secondary and tertiary structures of tRNA^{Ser} (PDB ID 3W3S) showing the cloverleaf and the “L-shape” organization of tRNA.

2. Materials

2.1 *in vitro* T7 transcription of tRNA

1. pAR1219 plasmid available from Sigma-Aldrich
2. Electro-competent *Escherichia coli* cells: BL21(DE3)
3. Ni-NTA HiTrap column (5mL, GE Healthcare), AKTApurifier (GE Healthcare) or a similar chromatographic system
4. Sonicator (Bandelin Sonoplus 100W)
5. Oligonucleotides for the PCR were purchased from EUROGENTEC.
6. Pfu (30 U/ μ L, Thermo Scientific), 10X Pfu buffer
7. dNTP (100 mM each, Sigma Aldrich), prepare a stock solution containing a mix of each dNTP at 10 mM in water.
8. rNTP (mix at 100 mM, Jena Bioscience)
9. Orange G loading dye 10X (0.4%(w/v) orange G, 30%(v/v) glycerol).
10. Blue loading buffer 5X (300 mM Tris.Cl pH 6.8, 1% (w/v) SDS, 1% (w/v) bromophenol blue)
11. Culture media: 2xTY ; LB
12. Ampicilin (Sigma-Aldrich)
13. Lysis buffer (20 mM Tris.Cl pH 8.0, 50 mM NaPhosphate pH 8.0, 20 mM NaCl, Lysozyme 100 mg.mL⁻¹, PMSF 0.1 M, and optionally: Benzamidine 0.1 M, Pepstatine 1 μ g.mL⁻¹, Leupeptine 2 μ g.mL⁻¹)
14. Buffer A (50 mM Phosphate buffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.5 mM DTT, 20 mM Imidazole, PMSF at 20 μ g.mL⁻¹)
15. Buffer B (Buffer A supplemented with 500 mM Imidazole pH 8.0)
16. Buffer C (20 mM phosphate buffer pH 7.7, 100 mM NaCl, 50% Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA).
17. Thermocycler (Eppendorf Mastercycler®)
18. Agarose (Sigma-Aldrich)
19. SYBR® Safe (Life Technologies)
20. 10X TAE Buffer (48.4 g of Tris-base [tris(hydroxymethyl)aminomethane], 11.4mL of glacial acetic acid, 3.7 g of EDTA disodium salt complete to 1L)
21. Water bath
22. 40% acrylamide/Bis-acrylamide 19:1 (Sigma-Aldrich)
23. BioRad MiniProtean® protein gel electrophoresis system
24. Gel electrophoresis power supply
25. Portable UV lamp
26. *In vitro* transcription buffer concentrated 10-times (T10 buffer): 400 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM spermidine, 50 mM DTT, 1% Triton X-100

2.2 *in vivo* production of tRNA

1. Oligonucleotides encompassing the tRNA gene were purchased from EUROGENTEC.
2. Enzymes: NEB T4 polynucleotide kinase 3'phosphatase free (10 U/ μ L, NEB), T4 DNA ligase (400 U/ μ L, NEB), PstI-HF (20 U/ μ L, NEB), EcoRI-HF (20 U/ μ L, NEB), SmaI (20 U/ μ L, NEB)
3. pBSTNAV plasmid available from addgene (ID 45801) (see note 1).
4. Electro-competent *E. coli* cells: JM101TR strain

2.3 Gel purification

1. 10x concentrated solution of Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer: 890 mM Tris base, 890 mM boric acid, 20 mM EDTA pH 8.4

2. Urea powder
3. Loading blue: dissolve urea at 8 M in 1 x TBE buffer and add a small amount of Xylene cyanol and bromophenol blue
RNA loading buffer (1X TBE, 8 M urea, 0.01% xylene cyanol and bromophenol blue)
4. Tetramethylethylenediamine (TEMED) and 10% (w:v) ammonium persulfate solution (APS)
5. 40 % Acrylamide:Bis-acrylamide 19:1 solution
6. High-voltage power supply, Generator for DNA sequencing
7. DNA sequencing-like gel migration system
8. Syringe and needle
9. UV lamp
10. 0.2% methylene blue staining
11. Steel spoon
12. 3 M sodium acetate pH 5.2
13. 0.2 µm Millipore RNase free Stericup-GP Express PLUS (PES) 150 mL
14. RNase free plastic spoon
15. DEAE sepharose resin (GE Healthcare)
16. Small empty column and tubing

2.4 Chromatography purification

1. Mono Q HR 10/10 column (GE Healthcare), Phenyl Superose HR 10/10 column (GE Healthcare)
2. Äkta Purifier system (GE Healthcare) or a similar chromatographic system
3. buffer A (50 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM MgCl₂)
4. buffer B (buffer A supplemented with 1 M NaCl)
5. buffer B2 (50 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 1.7 M sulfate d'ammonium)

2.5 Concentration

1. Amicon Ultra-15 concentrators (10000 MWCO, Millipore)

2.6 Crystallization

1. Greiner Bio One Cristalquick, 96-well plates
2. Sparse-matrix kits : Natrix (Hampton Research) or Nucleix (Quiagen)

3. Methods

It is important to always use gloves during sample preparation and manipulation as human skin is rich of RNases. For materials that cannot be exclusively used for RNA preparation or than are not single use, wash them when possible with 1M NaOH and rinse extensively with bi-distilled water. When adjusting pH of an RNase-free solution, avoid inserting a pH meter electrode into the solution, prefer paper pH-indicator strips. Store RNase-free solution at low temperature or frozen when possible, and keep them sterile. The use of bi-distilled water (18.2 M Ω) is sufficient to assure RNase-free condition, provided that the water purification system is well-maintained.

3.1. *In vitro* production: Preparation of T7 RNA polymerase

1. Transform by electroporation BL21(DE3) competent cells with the pAR1219 plasmid expressing the T7 RNA polymerase (98 kDa). Put 1 mL of LB medium and incubate the cells at 37°C for 15 minutes. Spread 10 to 100 μ L of this solution on a LB-agar plate supplemented with 50 μ g.mL⁻¹ of Ampicillin. Incubate the plate at 37°C overnight.

2. The next evening, start a a pre-culture (5 mL culture in LB supplemented with 50 μ g.mL⁻¹ of Ampicillin) inoculate with one isolated colony of bacteria containing the pAR1219 plasmid. Incubate overnight at 37°C.

3. Start a 1L culture in 2xTY medium supplemented with Ampicillin (50 μ g.mL⁻¹, final concentration) with the necessary volume of the overnight culture to obtain a starting optical density at 665 nm (OD₆₆₅) around 0.05. Incubate the remaining culture at 37°C with vigorous shaking. When the OD₆₆₅ reached 0.6, add 1 mM (final concentration) of IPTG to induce the expression of T7 RNA polymerase. Let the bacteria grow during 3 to 4 hours.

4. Pellet the bacteria by centrifugation (6 000 g for 30 min).

5. Resuspend the pellet in the lysis buffer. Sonicate the cell suspension with 10 short burst of 10 secondes (45W) followed by intervals of 30 secondes for cooling. Keep the suspension on ice as much as possible. Remove cell debris by centrifugation at 4°C, 30 min at 20 000 g.

6. Purify the T7 RNA polymerase at 4°C. Equilibrate the Ni-NTA column with 5 volume of buffer A. Inject the supernatant at 2 mL.min⁻¹, wash the column with buffer A until the baseline is recovered to be sure that all the flow-through is gone. Then, eluate the T7 RNA polymerase using a 100 mL gradient (from 0% to 100% of buffer B). Collect 2 mL fractions. Analyse the fractions on a SDS-PAGE gel (10 %). Pool the fractions that contain the T7 RNA polymerase and dialyze it at 4°C against 2 L of buffer C (20 mM phosphate buffer pH 7.7, 100 mM NaCl, 50% Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA). The volume in the dialysis chamber will be roughly reduced by a factor 3.

7. Recover the solution and aliquote the T7 RNA polymerase by 1 mL in eppendorfs for long-term storage at -80°C. Approximately, 7 mL of T7 RNA polymerase (15 mg.mL⁻¹) can be obtained from 1 L of culture.

3.2. *In vitro* production: Preparation of DNA template for *in vitro* transcription

1. The DNA template for *in vitro* transcription of tRNA^{Ser} was designed as described in Fig. 2., using two consecutive PCR (Polymerase Chain Reaction) (see Note 1). The construct must include the T7 promoter sequence upstream the tRNA gene (in bold in Fig. 2.A). The first two oligonucleotides must cover all the sequence of the DNA template and should be designed so

that they share complementary sequences between the 3' of oligonucleotide 1 and the 5' of oligonucleotide 2 (Fig. 2. B). We recommend at least 20 base pairs between oligonucleotides 1 and 2. The two other oligonucleotides are primers for classic PCR that allows the amplification of the DNA template.

A T7 DNA template

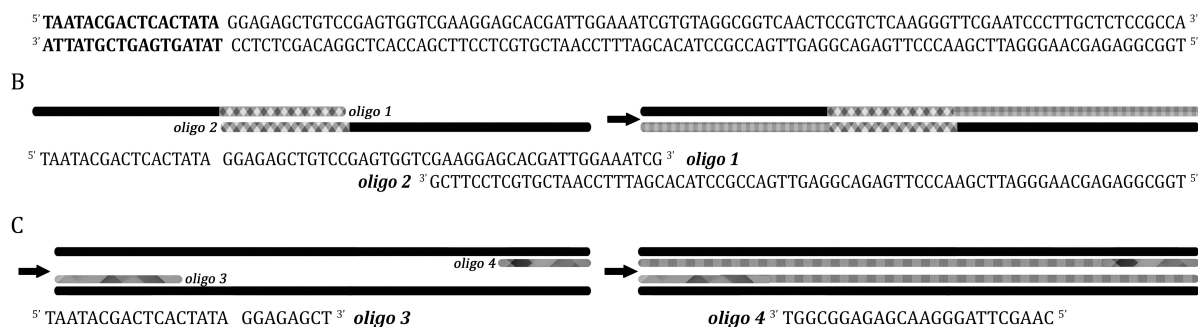


Fig. 2. Design of the DNA template for *in vitro* T7 transcription. The gene encoding *B. Subtilis* tRNA^{Ser} (GGA) has been assembled by two consecutive PCR. (A) DNA template of *B. Subtilis* tRNA^{Ser}. (B) Oligonucleotide 1 and 2 are needed during the first PCR to generate the double-stranded DNA template (C) Amplification of the DNA template by a second PCR using oligonucleotides 3 and 4.

2. For the first PCR (Fig. 2. B), mix 40 μ L of 10x Pfu buffer, 8 μ L of the dNTP mix, 1 μ L of oligonucleotides 1 and 2 (previously dissolved in a volume of water necessary to have them at a concentration of 100 μ M), 8 μ L of Pfu DNA polymerase, complete the volume to 400 μ L with water. Dispatch the reaction by 50 μ L in PCR tubes. On a thermocycler, start with the first step of denaturation by heating to 95°C during 1.5 minutes, then repeat two times the following cycle: 35 s of denaturation at 95°C, 35 s of annealing at 55°C and 30 s of elongation at 72°C. Carry on the reaction by a final step of elongation at 72°C during 5 min and then hold the samples at 4°C.

3. For the second PCR (Fig. 2. C.), mix 120 μ L of 10x Pfu buffer, 24 μ L of the dNTP mix, 12 μ L of oligonucleotides 3 and 4 (previously dissolved in a volume of water necessary to have them at a final concentration of 100 μ M), 1 μ L of the PCR1 product, 24 μ L of Pfu DNA polymerase and complete the volume of reaction to 1.2 mL with water. Dispatch the reaction by 50 μ L in PCR tubes. Repeat 25 times the PCR cycle described in section 2. This PCR product can be used immediately as DNA template for *in vitro* T7 transcription without any further treatment. For long-term conservation, keep it at -20°C.

4. Analyze the PCR product on a 2% agarose gel stained with SYBR® Safe. Weight 0.5 g of agarose, add 2.5 mL of 10X TAE buffer and complete to 25 mL with water. Melt the agarose powder until complete dissolution in a microwave at 20% power. Let cool down the solution until you can hold the vessel with your bare hands and add 2 μ L of SYBR® Safe. Pour the solution in an agarose gel mold. Put the comb and wait for gel solidification. Take 10 μ L of your PCR reaction and add 5 μ L of orange G loading dye. Run the gel at 100 V for 15 min in 1X TAE buffer. Orange G dye runs like a 50 base-pairs DNA fragment so the PCR product (109 base pairs) should be a little bit above.

3.3. *In vitro* production: T7 transcription

The optimal *in vitro* transcription conditions depend on the concentrations of the DNA template, NTP and/or MgCl₂ concentrations (Fig. 3.). These concentrations should be adjusted to optimize the yield of the RNA of interest. It is recommended to test small-scale reactions (currently 100 μ L) before large-scale production of RNA (5 to 20 mL). In practice, we usually vary the concentration of MgCl₂ in small-scale reactions (Table 1) and analyzed the yield of transcript RNA by SDS-PAGE (Fig. 3., Note 2). The conditions described in Table 1 are good starting point. Concentrations of T7 RNA polymerase and DNA template can also be further optimized. For small RNA (<50 nucleotides), the addition of 5%(w/v) final of PEG 4000 should be tested.

1. To investigate the impact of MgCl₂ concentration on the yield of RNA, prepare in eppendorfs the mixtures detailed in Table 1. The T7 RNA polymerase is used 10-fold diluted compared to the stock obtained in section 3.1.7.

Assays	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[MgCl ₂] (mM)	6	9	12	15	18	21	24	27	30
DNA template	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
T10 buffer	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
rATP (100 mM)	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
rUTP (100 mM)	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
rGTP (100 mM)	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
rCTP (100 mM)	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
MgCl ₂ (300mM)	2 μ L	3 μ L	4 μ L	5 μ L	6 μ L	7 μ L	8 μ L	9 μ L	10 μ L
H ₂ O	58 μ L	57 μ L	56 μ L	55 μ L	54 μ L	53 μ L	52 μ L	51 μ L	52 μ L
T7 RNA polymerase (1/10)	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L

Table 1: Examples of small-scale assays used to define the optimal MgCl₂ concentration

2. Run the test reactions for 3-4 hours at 37°C. The appearance of a white precipitate due to magnesium pyrophosphate is most of the time visible and can be used to monitor the transcription efficiency.

3. Store at -20°C or analyse immediately by SDS-PAGE. Alternatively, the reaction can be stopped by adding 10 μ L of 0.5 M EDTA pH 8.0.

4. To analyse the products of transcription, prepare a SDS-PAGE gel using the same materials as those used for protein SDS-PAGE analysis. The percentage of gel depends on the length of the expected product. For a tRNA of 92 nucleotides, pour a gel of 14 %. For 2 gels running back to back, for the running part, mix 3.5 mL of acrylamide/Bis-acrylamide 19:1, 3.75 mL Tris.Cl pH 8.8, 50 μ L SDS 20% and adjust the volume to 10 mL with water. Add 140 μ L of APS 10% and 10 μ L of TEMED just before applying the running gel between the glass plates. Leave a sufficient space at the top of the glass plates to pour then the stacking gel. For the stacking gel, mix 0.5 mL of acrylamide/Bis-acrylamide 19:1, 630 μ L of Tris.Cl pH 6.8, 50 μ L of SDS 20 % and complete to 5 mL with water. Add just before pouring, 100 μ L of APS and 5 μ L of TEMED. Put the comb immediately and before the gel has polymerized. The stacking gel should take one third of the total volume of the gel.

5. Take an aliquote of each small-scale reaction (typically 5 μ L) and add 5 μ L of loading Blue. Do not heat the samples before loading them on the gel. Load your samples on the wells and run the gel for 1 hour at 24 mA.

6. The visualization is then done by UV-shadowing. Carefully remove one of the glass plate, leaving the gel on the other one. Put a clear plastic wrap over the gel and pull carefully the gel away from the second glass plate. Put the plastic wrap bearing the gel on a piece of white paper and then illuminate the gel with a portable UV lamp (254 nm). You should see clear shadows that correspond to the RNA in the gel. The gel corresponding to the assays described in Table 1 and revealed by UV-shadowing is shown in Fig. 3. The best yield in our case is obtained for a concentration of MgCl_2 around 18 mM. This concentration is thus used for large-scale preparation of this tRNA. One can see that the yield of RNA is very sensitive to the concentration of MgCl_2 . We recommend to carry out these small-scale assays each time that a new preparation of DNA template is used, even if the protocol of preparation is the same.

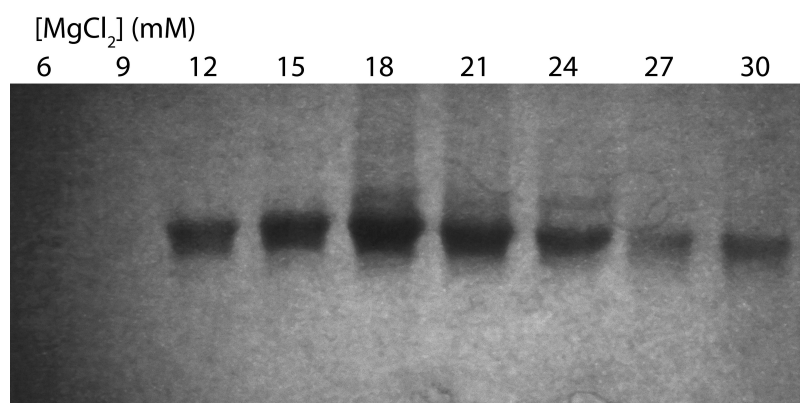


Fig. 3. Sensitivity to the magnesium concentration of the RNA production by *in vitro* T7 transcription. SDS-PAGE gel at 14% revealed by UV-shadowing showing the analysis of small-scale assays of Table 1 testing the production of tRNA^{Ser} by T7 transcription.

3.4. *In vitro* production: tRNA purification using denaturing polyacrylamide gel

For large scale *in vitro* transcription reaction (more than 5 mL), sequencing-like gel migration system can be adapted to purify the RNA transcripts. It is often the best method to obtain an homogeneous sample of tRNA ready for crystallization assay. The problem with *in vitro* transcription is that it generates n-1 and/or n+1 product in addition to the desired RNA. These species (n-1, n+1) can be a bottleneck to get diffracting crystals (Note 3).

1. One volume of RNA loading buffer is added to one volume of transcription reaction. For really large transcription (up to 25 mL), in order to minimize the loading volume, a 8 M urea concentration can be possibly obtained by adding the corresponding urea mass as a powder to the transcription reaction and a 50-fold concentrated xylene cyanol and bromophenol blue solution.

2. The plates (420 x 330 x 3.5 mm) for the gel and the spacers (420 x 20 x 2 mm) are washed and assembled using clamps and tape (at the bottom), in RNase-free conditions. To prepare 300 mL of 12 % polyacrylamide and 8 M urea gel, dissolve 144 g urea in 30 mL 10X TBE and 90 mL 19:1 polyacrylamide:Bis-acrylamide. Add just before pouring, 5 mL of APS 10 % and 250 μL of TEMED. Put a unique large comb (100 x 265 x 2 mm) immediately before the gel has polymerized. After polymerization, the transcription solution containing the RNA loading buffer is loaded on the gel. It is recommended to check the *in vitro* transcription efficiency on small 8 M urea gel or SDS-PAGE gel before making the final one. The

appropriate percentage of 19:1 polyacrylamide gel is determined according to the size of the RNA molecule (Table 2). The gel is pre-run for 2 hours in 1X TBE running buffer to reach an optimal migration temperature. Power is the only one limitation: 65 Watts for 1 large gel and 80 Watts for 2. The well is washed with running buffer before loading the transcription reaction. Syringe and needle are used for these two steps. The migration runs 6 to 8 hours depending on the percentage of polyacrylamide gel.

Table 2: Percentage of 19:1 polyacrylamide:Bis-acrylamide gel according to the size of the RNA. For each percentage, the volumes of acrylamide:Bis-acrylamide 19:1 have been indicated to prepare a 10 mL, 50 mL or 300 mL gel solution respectively.

RNA molecule (nucleotides)	19:1 acrylamide (%)	10 mL gel (mL)	50 mL gel (mL)	300 mL gel (mL)
Less than 50	15	3.75	18.75	112.5
50	12	3	15	90
100	10	2.5	12.5	75
More than 100	8	2	10	60

3. There are 2 options to visualize the band corresponding to the tRNA molecule:

i) Using the UV-shadowing technic. The gel is removed from the system, protected with a thin plastic wrap, taken down on a silica plate and exposed to UV (wavelength closed to 254 nm) using a short-wave UV lamp. Silica reflects the UV while the RNA bases absorb UV. A shadow corresponding to the tRNA band can thus be observed on the silica.

ii) Using methylene blue. The gel is removed from the system. A small band is cut along the gel, stained with a 0.2% methylene blue solution for few seconds and destained with water. In that case, a small quantity of tRNA is lost, compared to the first option.

4. The band corresponding to the tRNA is excised with a blade and the gel slice is put into a 50 mL Falcon tube. The gel is then crushed with an RNase-free steel spoon. tRNA is eluted by diffusion with 40 mL of 0.3 M sodium acetate pH 5.2 on the rotating wheel at 4°C for several hours. The time required depends on the size of the RNA, the acrylamide gel concentration and the size of the crushed gel particles. The eluate is filtered on a 0.2 µm Millipore system. Acrylamide crumbs are recovered with an RNase free splastic spoon and put back in the same 50 mL Falcon tube for a second elution. This step can be repeated once more.

5. The sample (in 0.3 M sodium acetate pH 5.2) is concentrated using DEAE sepharose resin and a small column. A small column apparatus was linked by tubing to a 50 mL syringe that is used as a reservoir. Before use, the home-made system is cleaned with 1M NaOH and rinsed extensively with water. 1 mL of DEAE sepharose resin is packed into the column. The resin is equilibrated with 0.3 M sodium acetate pH 5.2. The sample is then loaded and the system is washed with 10 mL of 0.3 M sodium acetate pH 5.2. The tRNA is finally eluted with 7 mL of 3 M sodium acetate pH 5.2 and ethanol precipitated by adding 21 mL of ethanol. The sample is then put at -20°C.

3.5. *In vitro* production: tRNA concentration and folding

1. After ethanol-precipitation, the tRNA is centrifuged at 4°C and 6000 g. The pellet is then washed three times with 70% ethanol, dried under vacuum and dissolved in 1 mL of pure water for 1 mL of transcription reaction. For the tRNA folding, the sample is incubated for 1 min at 85°C and slowly (*ie* 45 min) cooled to room temperature by switching off the heating of water bath. The tRNA can be further concentrated, and buffer exchanged by using a centrifugal concentration unit (Amicon© milipore). The conservation buffer can be 50 mM Tris.CL pH 8.0, 100 mM KCl and 10 mM MgCl₂. Typically, a concentration of 10 mg/mL is a good stock concentration to conduct crystallization assays with this tRNA. Adding 10 mM MgCl₂ in the final buffer can greatly improve tRNA folding and is sometimes necessary to stabilize the tertiary interactions between the D- and T-loops. Keep your sample at -20°C.

2. The folding of tRNA can be analyzed by NMR spectroscopy (Fig. 4. And note 4). Put the tRNA in the NMR buffer (10 mM KPO₄ pH 6.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂) at a concentration around 0.2 mM in a 3 mm NMR tube. In this kind of tube, only 150 µL of sample is needed. Put 135 µL of tRNA and 15 µL of D₂O. Record a 1D proton spectrum using a watrgate sequence to supress the water signal (20). The imino protons are carried by G and U nucleotides and resonate between 10 and 15 ppm. They constitute the signature of base-pair within a folded RNA. The NMR spectrum of tRNA^{Ser} imino protons produced *in vitro* is consistent with one molecular species and showed about 25 peaks (uncertainty due to overlap), which is consistent with the number of base-pairs expected in the 3D structure of this tRNA. These data support folding of the tRNA into its correct tertiary structure.

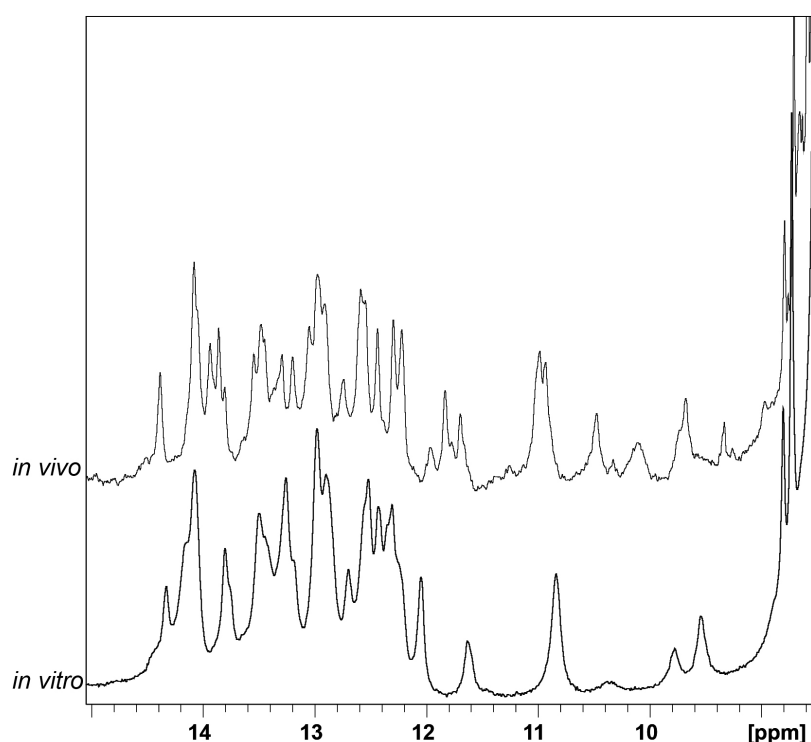


Fig. 4. 1D ¹H NMR spectra of tRNA^{Ser} produced by *in vitro* transcription (lower spectrum) and *in vivo* in *E. coli* (top spectrum). The spectra were recorded at 35°C on a Bruker DRX 600 MHz NMR spectrometer. The samples were put in a 10 mM KPO₄ pH 6.5 with 50 mM KCl and 10 mM MgCl₂.

3.6. *In vivo* production: Cloning a tRNA gene in the pBSTNAV vector

tRNA can also be easily produced *in vivo* in *E. coli* using the pBSTNAV vector (16, 17, 19, 21). The cloning procedure of the tRNA^{Ser} gene in this plasmid and the expression and purification of tRNA^{Ser} are described in the following paragraphs.

1. Phosphorylate oligonucleotides 2, 3, 5 (Fig. 5.). In an Eppendorf, put 1 µL of each oligonucleotide previously diluted at a concentration of 100 µM in water. Add 10 U of T4 polynucleotide kinase 3'-phosphatase free and 1.5 µL of the buffer recommended by the manufacturer. Complete with water to 15 µL (final volume of the reaction). Incubate at 37°C during 30 minutes. Leave 10 minutes at 65°C to inactivate the kinase.

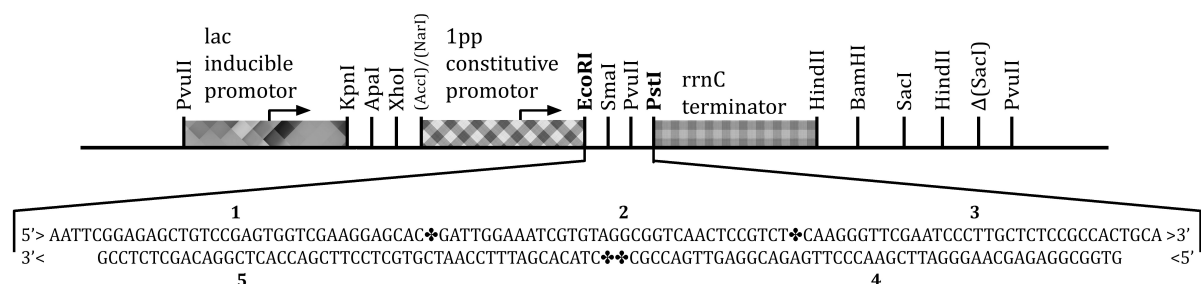


Fig. 5. Schematic representation of the cloning region of pBSTNAV plasmid and sequence of DNA coding for *B. subtilis* tRNA^{Ser} (GGA) inserted between EcoRI and PstI restriction sites. In pBSTNAV, the lpp promoter upstream of the tRNA gene, one of the strongest natural *E. coli* promoters that controls the transcription of the mRNA of the lipoprotein, allows production of high levels of recombinant transcripts. Accumulation of stable recombinant RNA throughout the transcription phase can be achieved by the combined use of a strong promoter and a multicopy plasmid. Yields reach a maximum within the first few hours of the stationary phase.

2. Add in the eppendorf 1 µL of oligonucleotides 1 and 4 previously diluted at a concentration of 100 µM in water. To hybridise the oligonucleotides as indicated in Fig. 4 in order to make the insert, put the previous mix 2 minutes at 95°C, let them cool down slowly to 37°C. Add 10U of T4 DNA ligase in the appropriate buffer that should contain ATP. Complete with water to a volume of reaction of 30 µL. Incubate 1h30 at 37°C.

3. Preparation of the pBSTNAV plasmid. To linearize the pBSTNAV plasmid, digest it with PstI and EcoRI restriction enzymes. For 10 µg of plasmid, add 3 µL of PstI-HF and EcoRI-HF, 10 µL of NEB cutsmart buffer and complete the volume of the reaction with water to reach a volume of 100 µL. Incubate 1h30 at 37°C. Add 250 µL of ethanol and 10 µL of NaCl 5M and pellet plasmid by centrifugating the mix during 15 minutes at 4°C and at 7000 g. Remove carefully the ethanol and dry the sample in a speedvac. Dissolve the linearized plasmid in 30 µL of water.

4. To insert and ligate the oligonucleotide containing the tRNA^{Ser} gene into the linearized pBSTNAV plasmid, mix 2 µL of the linearized plasmid, 15 µL of the insert, 4 µL of the T4 DNA ligase, 3 µL of the manufacturer recommended T4 ligase buffer (X10), and complete the volume to 30 µL. Incubate one night at 14°C. Put the mix during 2 minutes at 95°C to inactivate the ligase.

5. Counter-selection by SmaI (see Note 5). After the ligation step, add 100 µL ethanol and 3 µL NaCl (5 M) and recover the pellet DNA by centrifugating during 15 minutes at 4°C and

7000 g. Redissolve the plasmid in 10 μ L of water. Add 3.5 μ L of SmaI and 1.5 μ L of NEB cutsmart buffer. Incubate at 20°C during 1h30. Then, add 50 μ L of ethanol and 1 μ L NaCl (5M), centrifugate during 15 minutes at 4°C and 7000 g. Carefully remove the supernatant and wash by ethanol 70% (add 50 μ L of cold ethanol 70% mix and centrifugate during 15 minutes at 4°C and 7000 g). After the wash, remove as much as possible ethanol and dry the sample in a speedvac. Dissolve DNA in 15 μ L of water and store at -20°C.

3.7. *In vivo* production: Expression in *E. coli* and total tRNA extraction

1. Transform *E. coli* electro-competent cells (JM101TR strain) by electroporation. The bacteria are grown overnight at 37°C in LB medium supplemented with 50 μ g/mL of ampicillin (see Note 6).

2. Recover the bacteria by centrifugation during 30 minutes at 6000 g.

3. Resuspend the bacteria in 10 mL of a buffer containing 1 mM Tris.Cl pH 7.4 and 10 mM magnesium acetate. Add 10 mL of phenol saturated in the same buffer.

4. Mix slowly 1 hour at room temperature. Centrifuge during 30 minutes, 8000 g at 15°C. Carefully recover the soluble phase.

5. Do a counter-extraction with 2 mL of buffer. Recover again the soluble phase and add 0.1 volume of NaCl 5M and 2 volumes of ethanol to the soluble phase that contains total nucleic acids extracted from the bacteria. Centrifuge during 30 minutes, 8000 g at 4°C and.

6. Resuspend the pellet in 5 mL of NaCl 1M (see note 7). Centrifuge during 30 minutes at 4°C and at 8000 g. Recover the supernatant and add 2.5 volume of ethanol. Centrifuge during 30 minutes, 8000 g at 4°C. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 2 mL of TrisCl 2M pH 8.0 and incubate the mix at 37°C during 2 hours to insure a full deacylation of the tRNA molecules (see note 8).

7. Precipitate the total extract of tRNA by adding 2 volumes of ethanol. Centrifuge during 30 minutes, 8000 g at 4°C. Redissolve the pellet in the desired buffer, commonly 50 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM MgCl₂.

3.8. *In vivo* production: tRNA purification using chromatography columns

tRNAs produced *in vivo* in *E. coli* have the advantages to be correctly folded and matured by the enzymes of the host. Therefore, even if the purification by denaturing polyacrylamide gel is still an option, it could be advantageous to optimize a protocol of purification using anion-exchange and hydrophobic chromatography. This protocol is detailed in the next section.

1. First, wash the ÄktaPurifier (or other FPLC purification system) and the columns with 1M NaOH and rinse them extensively with bi-distilled water to work in RNase free conditions. After the total tRNA extraction (section 3.7), load the tRNA sample on a Mono Q HR 10/10 column (8 mL) previously equilibrated with buffer A. Wash by several volume of column with buffer A. Then, separate the tRNAs using a gradient from 35% to 55% of buffer B with a length of 240 mL and a flow of 4 mL/min. Collect the eluate putting 2 mL/fraction. Noticeably, the gradient has to be optimized according to the size and the sequence of the tRNA to purify.

2. You then need to analyze the content of the fractions to identify the fractions containing the overexpressed tRNA. One simple experiment is to perform gel-shift assay using SDS-PAGE (Fig. 5.). First, design a DNA that is complementary to the overexpressed tRNA in a region that is not well-conserved in the other *E. coli* tRNAs. In our case, we select a DNA complementary to the anticodon arm and the large variable loop (Fig. 6). Take 5 μ L of each fraction to analyze and mix with 1 μ L of the complementary DNA (previously dissolved in water at 100 μ M). In a thermocycler, heat the samples at 95°C during 2 minutes and cold down to 4°C. The loading blue is added after this operation, the shift will not appear if it is present when samples are heated.

3. Load the samples on a 14% SDS-PAGE gel (see section 3.3.4). Visualize the RNA present in each fraction by UV-Shadowing. tRNA^{Ser} can be easily discriminated from *E. coli* tRNAs by a shift of its species in presence of the complementary DNA (arrows in Fig. 5.). Indeed, the band of tRNA^{Ser} has disappeared in the presence of the DNA and a band of higher molecular weight has appeared.

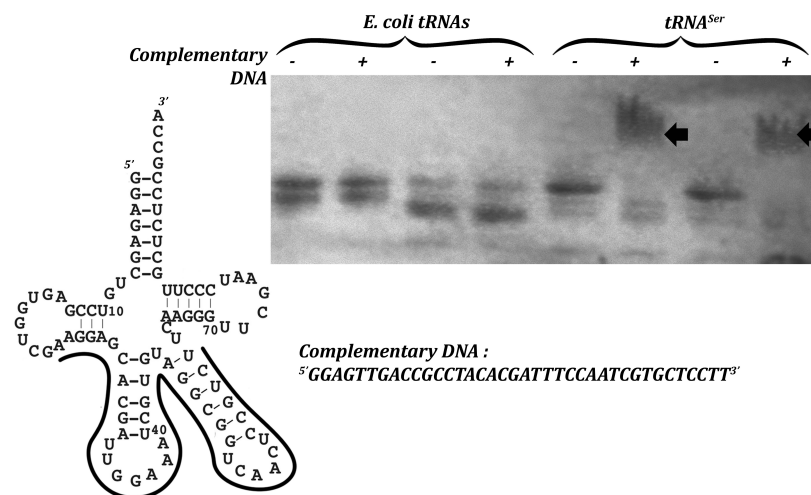


Fig. 6. Gel-shift assays (SDS-PAGE 14%) realized on fractions obtained after the Mono Q column. This simple experiment allows to discriminate the tRNA of interest from those of *E. coli* using an hybridation test of a complementary DNA to tRNAs present in the different fractions.

4. Pool the fractions that contain the tRNA of interest. The next step consists in further purifying the tRNA by hydrophobic chromatography. First, put in your tRNA sample the quantity of ammonium sulfate in powder necessary to have your sample in 1.7 M sulfate d'ammonium before loading it on the phenyl superose. Equilibrate the Phenylsuperose with buffer B2 Then, separate the tRNAs using a gradient from 10% to 45% of buffer A with a length of 240 mL and a flow of 0.7 mL/min. Collect 1 mL/fraction.

5. Analyze the fractions with a 14% SDS-PAGE gel (see section 3.8.3). The high concentration of ammonium sulfate (>1M) prevents the good migration of RNA samples in SDS-PAGE. You should take 5 μ L of each fraction and dilute them in 20 μ L of water to avoid migration problem. Visualize the bands by UV-shadowing. Pool the fractions that contain the tRNA of interest (Note 9).

6. The tRNA of interest has then to be desalted to get rid of the large amount of ammonium sulfate. This can be done by extensive dialysis or by using a desalting column (Hiprep 26/10 desalting column, GE healthcare). The storage buffer can be 50 mM Tris.Cl pH 8.0, 100 mM KCl and 10 mM MgCl₂. Concentrate to the desired concentration using amicon ultra (15 ml). Typically, a concentration of 10 mg/mL is a good storage concentration to conduct crystallization assays with this tRNA. Keep your sample at -20°C.

7. Optionally, you can check the homogeneity of your tRNA sample and its folding by recording a 1D NMR spectrum (Fig. 4.). The NMR spectrum of tRNA^{Ser} produced *in vivo* compared to that produced *in vitro* is noticeably different.

3.9. tRNA crystallization free or in complex

1. Prepare the tRNA sample as described in previous subheadings.

2. Automated initial crystallization screen can be performed using a robot (CyBi®-Crystal Creator in our lab, Cybio) that use 96-well microplates. For initial screening, sparse matrix crystallization screens (Nucleix or Natrix) give good results. Several concentrations of tRNA should be tested (typically 3 mg/mL, 5mg/mL and 10 mg/ml). The robot mixes the same volume (0.7 µL in our case) of tRNA sample and of the reservoir solution. Screening of crystallization conditions is carried out with the sitting drop, vapor diffusion technique. Put the crystallization plate in an incubator set at a temperature between 4°C to 25°C. We usually tested 4°C and 18°C.

3. Check for crystals the next day, in 3 days, and then every week. Crystals may appear after several hours, after several months, or never. It is important to check for crystals on a regular basis as they can disappear. If precipitate is observed in most of the crystallisation condition, then proceed to new assays but lower the concentration of tRNA.

4. When crystals are observed, optimize crystallization conditions by varying the ratio between the volumes of the sample and that of the reservoir solution in the drop, the concentration of tRNA in the drop, the concentration of the precipitant or salts in the reservoir solution, the buffer, the pH, various additives... For tRNA^{Ser}, the diffraction quality of crystals were improved by modifying the precipitant and its concentration in 2 µL drops.

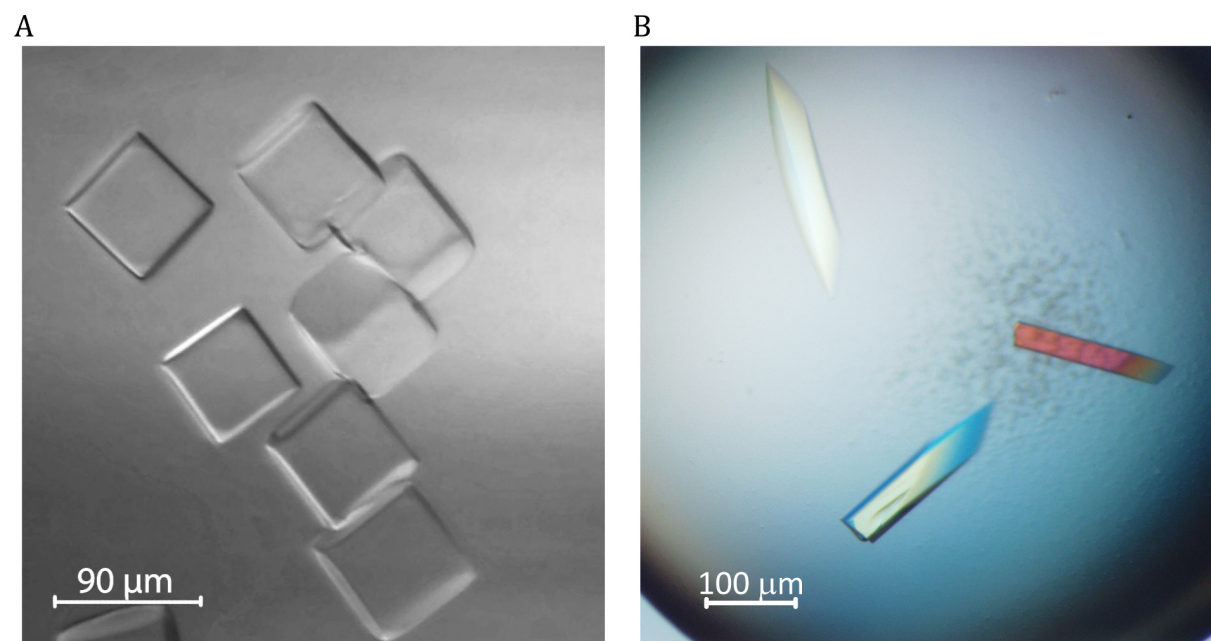


Fig. 7. Examples of crystals obtained for A) tRNA^{Ser} produced *in vivo* and B) tRNA^{Leu} produced *in vitro* and co-crystallized with LeuRS (Note 10) (18). The conditions of

crystallization are 100 mM HEPES pH 7.5 and 1.5 M sulfate lithium for tRNA^{Ser} and 0.2 M sodium Nitrate, 20% PEG 3350 for tRNA^{Leu} in complex with LeuRS.

4. Notes

1. *In vitro* run-off transcription with T7 RNA polymerase (22) is commonly used to prepare milligram quantities of RNA required for crystallization studies. For efficient transcription, the promoter-region of the DNA template should be double-stranded and the first nucleotide in the RNA product should be a guanine. T7 RNA polymerase tends to add one or more random nucleotides (usually adenosine) at the 3'-end of the run-off transcript, leading to problems with 3' homogeneity. For tRNA run-off transcription, the DNA template can be either a purified PCR product containing the tRNA gene and the T7 promoter or a linearized plasmid. In the case of tRNA^{Ser}, the higher yield of production was obtained for a DNA template that is a PCR product. We thus detail this protocol.

For the use of a linearized plasmid, the template plasmid must contain a restriction site incorporated at the 3'-end of the desired RNA sequence. For tRNA, the commonly used restriction enzyme is BstNI that allows to generate a CCA sequence at the 3'-end of the transcript tRNA (23). The vector is usually a pUC18 or pUC19. When we used a pUC18 vector carrying the tRNA^{Ser} gene linearized with BstNI restriction enzyme, other large species of transcript products were observed. This feature reduced the quantity of tRNA transcript.

2. Although SDS-PAGE is commonly restricted to protein electrophoresis, this technique is well suited for RNA production analysis (19). Gel migration is much faster, bands are well-defined and the migration is not sensitive to salts present in the samples like in urea PAGE. Furthermore, these gels are not denaturing for RNA and thus hybridized RNA or RNA/DNA complexes can be detected if they are quite stable (*i.e.* if they involved a large number of base pairs, more than 10). We used this feature to easily detect the fractions containing the overexpressed tRNA during chromatographic steps of purification (Fig. 6).

3. Homogeneous samples are crucial for the success of crystallization. Crystals containing tRNA molecules are very often packed in such a way that two tRNA molecules form a pseudo-continuous helix with their 3'-ends (17). To facilitate such packing, it is important to ensure that 3'-end of tRNA are homogeneous. Unfortunately, run-off transcription with T7 RNA polymerase usually results in product RNA that are heterogeneous at its 3'-end. The gel purification of the product of *in vitro* transcription enables us to eliminate unincorporated NTP, products of aborted transcription, template DNA and most importantly serves to produce RNA with homogeneous ends. A nucleotide-level resolution on a preparative gel can be obtained. In case of heterogeneity at the 3'-end of the tRNA, we recommend to avoid overloading of the sample. Several bands can be observed and it could be interesting to cut all major bands to use them in crystallization trials, of course separately!

4. The refolding of the tRNA prior to crystallization assays is very important, especially for large molecules. The ability of magnesium to cut RNA at high temperatures has to be taken into account. Usually, the high temperature denaturation of RNA is performed without magnesium and it is added at a later step when the sample is cooled down at room temperature.

5. The counter selection by SmaI is essential to avoid false positive clones, *i.e.* clones transformed by the pBSTNAV vector that does not carry the insert sequence encompassing tRNA^{Ser} gene.

6. Since high yields of recombinant tRNA are required, it is quite important that fast growth rates are achieved during expression. Expression in rich medium at 37°C should thus be favoured, as it will support the fastest growth rates. For large scale expression, use 2xTY

medium supplemented with 0.4% (w/v) glucose in a fermentor equipped with pH and dissolved oxygen (pO₂) control. Glucose contributes to increasing the growth rate, but requires real-time neutralisation of acids produced by fermentation and hence must be done into a fermentor. Optimal aeration is also a key factor, most importantly at high cell densities. For medium scale expression, 2xTY cultures (without glucose) in flat culture flasks (Fernbach) are a simpler yet quite efficient alternative. With the strong lpp promoter on a multicopy plasmid, stable recombinant tRNA will accumulate during all their transcription phase. Yield will therefore be maximum in the first few hours of the stationary phase. This leads to a very straightforward protocol: litre-sized culture flasks are typically inoculated at low density with freshly transformed bacteria and allowed to grow overnight (15 h) at 37°C under vigorous shaking. Putting only 500 mL of 2xTY medium in litre-sized culture flasks allows a better oxygenation of cells and thus provides a simple way to improve yield.

7. Only the smallest nucleic acids like tRNAs and 5S RNA will be soluble in 1 M NaCl. This step is not obligatory but it enables to get rid of the largest nucleic acids like chromosomes for instance.

8. This step enables the nucleophilic deacylation of the 3'-end of tRNA.

9. 10 to 20 mg of pure tRNA per liter of culture can be routinely obtained. The yield and the purity will depend on the tRNA sequence and notably on the post-transcriptional modifications carried by the overexpressed tRNA. Complex modifications, notably in the anticodon, can be incorporated at a substoichiometric level (16). This can be a source of heterogeneity preventing crystallization.

10. For the crystallogenesis, a parameter to consider in order to prepare the protein-tRNA sample, is the ratio between the 2 partners. Most of the time, a little excess of nucleic acids is required. For example, in the case of *E. coli* LeuRS-tRNA^{Leu} complex, the best crystals were obtained with a 1:1.2 ratio.

Acknowledgements

C. D. and C. T. thank Marjorie Catala for her help in optimizing *in vitro* T7 transcription on tRNA.

REFERENCES

1. Grosjean H, *et al.* (1987) The in vivo stability, maturation and aminoacylation of anticodon-substituted *Escherichia coli* initiator methionine tRNAs. (Translated from eng) *Eur J Biochem* 166(2):325-332 (in eng).
2. Motorin Y & Helm M (2010) tRNA stabilization by modified nucleotides. (Translated from eng) *Biochemistry* 49(24):4934-4944 (in eng).
3. Phizicky EM & Hopper AK (2010) tRNA biology charges to the front. (Translated from eng) *Genes & development* 24(17):1832-1860 (in eng).
4. Robertus JD, *et al.* (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* 250:546-551.
5. Suddath FL, *et al.* (1974) Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 3.0 angstroms resolution. *Nature* 248(443):20-24.
6. Rould MA, Perona JJ, Soll D, & Steitz TA (1989) Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP at 2.8 Å resolution. (Translated from eng) *Science* 246(4934):1135-1142 (in eng).
7. Selmer M, *et al.* (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. (Translated from eng) *Science* 313(5795):1935-1942 (in eng).
8. Schmeing TM, *et al.* (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. (Translated from eng) *Science* 326(5953):688-694 (in eng).
9. Jenner L, Demeshkina N, Yusupova G, & Yusupov M (2010) Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. (Translated from eng) *Nature structural & molecular biology* 17(9):1072-1078 (in eng).
10. Demeshkina N, Jenner L, Yusupova G, & Yusupov M (2010) Interactions of the ribosome with mRNA and tRNA. (Translated from eng) *Curr Opin Struct Biol* 20(3):325-332 (in eng).
11. Wegrzyn G & Wegrzyn A (2008) Is tRNA only a translation factor or also a regulator of other processes? (Translated from eng) *J Appl Genet* 49(1):115-122 (in eng).
12. Li Y & Zhou H (2009) tRNAs as regulators in gene expression. (Translated from eng) *Sci China C Life Sci* 52(3):245-252 (in eng).
13. Green NJ, Grundy FJ, & Henkin TM (2010) The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. (Translated from eng) *FEBS Lett* 584(2):318-324 (in eng).
14. Zhang J & Ferre-D'Amare AR (2013) Co-crystal structure of a T-box riboswitch stem I domain in complex with its cognate tRNA. (Translated from eng) *Nature* 500(7462):363-366 (in eng).
15. Giege R (2008) Toward a more complete view of tRNA biology. (Translated from eng) *Nature structural & molecular biology* 15(10):1007-1014 (in eng).
16. Tisne C, Rigourd M, Marquet R, Ehresmann C, & Dardel F (2000) NMR and biochemical characterization of recombinant human tRNA(Lys)₃ expressed in *Escherichia coli*: identification of posttranscriptional nucleotide modifications required for efficient initiation of HIV-1 reverse transcription. (Translated from eng) *RNA (New York, N.Y)* 6(10):1403-1412 (in eng).
17. Barraud P, Schmitt E, Mechulam Y, Dardel F, & Tisne C (2008) A unique conformation of the anticodon stem-loop is associated with the capacity of tRNA^{fMet} to initiate protein synthesis. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 36(15):4894-4901 (in eng).
18. Palencia A, *et al.* (2012) Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. (Translated from eng) *Nature structural & molecular biology* 19(7):677-684 (in eng).

19. Ponchon L, *et al.* (2013) Co-expression of RNA-protein complexes in *Escherichia coli* and applications to RNA biology. (Translated from eng) *Nucleic Acids Res* 41(15):e150 (in eng).
20. Piotto M, Saudek V, & Sklenar V (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. (Translated from eng) *Journal of biomolecular NMR* 2(6):661-665 (in eng).
21. Meinnel T, Mechulam Y, & Fayat G (1988) Fast purification of a functional elongator tRNA^{Met} expressed from a synthetic gene in vivo. *Nucl. Acids Res.* 16:8095-8096.
22. Studier FW & Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. (Translated from eng) *J Mol Biol* 189(1):113-130 (in eng).
23. Sampson JR & Uhlenbeck OC (1988) Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed in vitro. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(4):1033-1037 (in eng).

Résumé

Le virus influenza de type A est un virus à ARN simple brin de polarité négative qui se réplique dans le noyau des cellules infectées. Son génome se compose de huit segments d'ARN viral (ARNv). Chaque segment est recouvert de multiples copies de nucléoprotéines virales (NP). Chacune des extrémités strictement conservées 3' et 5' des huit segments d'ARNv interagit avec une ARN-polymérase ARN-dépendante. Le complexe entre l'ARNv, NP et l'ARN-polymérase ARN-dépendante forme une particule appelée ribonucléoprotéine (RNP) constituant l'entité fonctionnelle pour la réplication du génome viral et sa transcription en ARN messagers. Dans le contexte de la RNP, ces deux processus sont assurés par l'ARN-polymérase ARN-dépendante formée de trois protéines (PA, PB1 et PB2). L'ARN-polymérase du virus influenza A fait l'objet de nombreuses études. Son étude structurale se heurte à la difficulté d'obtenir ce complexe hétérotrimérique sous forme soluble et en grande quantité, deux conditions qu'impose la biologie structurale. Ainsi, durant les huit dernières années, les données structurales à l'échelle atomique n'ont été obtenues que sur des domaines isolés de l'ARN-polymérase laissant l'essentiel de la structure de PB1 inconnue. Pour contourner ce problème, une nouvelle stratégie s'appuyant sur le système d'expression en cellules d'insecte infectées par baculovirus a été développée. Cette stratégie a permis la production d'une forme tronquée de l'ARN-polymérase du virus influenza de type A qui a été étudiée d'un point de vue structural et fonctionnel. Plusieurs reconstructions en trois dimensions ont été obtenues par microscopie électronique et une structure cristalline à faible résolution (7,7 Å) a pu être résolue. Les études fonctionnelles se sont axées sur les activités portées par l'hétérotrimère tronqué et un accent particulier a été mis sur l'étude des interactions avec l'ARN. Les informations sur les activités catalytiques obtenues *in vitro* ont mis en évidence un rôle clef de certains ions métalliques. Afin de connaître l'environnement en ions métalliques et cibler leur rôle à l'échelle cellulaire, leur distribution dans la cellule infectée par le virus influenza A a été étudiée par microscopie rayons-X. Cet aspect de l'infection étant très peu documenté, cette étude s'inscrit dans une démarche originale et a offert l'opportunité d'intégrer les données biochimiques et biophysiques à l'échelle de la cellule entière.

Abstract

Influenza A virus is a negative single stranded RNA virus that replicates in the nucleus of infected cells. Its genome contains eight single stranded negative-sense RNA segments (vRNA) covered by the viral nucleoprotein (NP). The highly conserved 3' and 5' ends of the vRNA are bound to the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) which consists of three subunits, PA, PB1 and PB2. The complex between vRNA, NP and the RdRp forms a particle called ribonucleoprotein (RNP). The RNP acts as an independent molecular machine for transcription and replication in the nucleus. Within the context of the RNP, these two processes are mediated by the RdRp. The influenza A RdRp complex has been remarkably intractable to structural analysis and in the last eight years, crystal structures of independent domains covering roughly half of the heterotrimeric RdRp have been determined. In addition, electron microscopy reconstructions have described the RdRp. Nonetheless, a complete model characterizing the RdRp as a whole is still lacking. To overcome this issue, a new strategy has been developed to obtain the RdRp heterotrimeric complex using the baculovirus infected cells expression system. This method has produced a truncated form of the flu A RdRp which has been studied from a structural and functional point of view. Several three-dimensional reconstructions by electron microscopy have been obtained and a crystal structure at low resolution (7,7 Å) has been solved. Functional studies focused on the activities carried by the truncated RdRp and a particular emphasis was placed on the study of the interactions with RNA. *In vitro* functional data showed highly metal ion-dependent activities. To know more about the subcellular metal context, metallic ions distribution in influenza A infected cells has been studied by X-ray microscopy giving the opportunity to integrate biochemical and biophysical data in the context of the whole cell.