



HAL
open science

Etude de l'interaction entre la protéine humaine Importin beta et la protéine du VIH-1 Rev

Didier Spittler

► **To cite this version:**

Didier Spittler. Etude de l'interaction entre la protéine humaine Importin beta et la protéine du VIH-1 Rev. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV034 . tel-01498398

HAL Id: tel-01498398

<https://theses.hal.science/tel-01498398>

Submitted on 30 Mar 2017

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie structurale et nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 Aout 2006

Présentée par

Didier SPITTLER

Thèse dirigée par **Carlo PETOSA**

préparée au sein de l' **Institut de Biologie Structurale**
et de l' **École Doctorale de Chimie et des Sciences du Vivant**

Étude de l'interaction entre la protéine humaine Importin beta et la protéine du VIH-1 Rev

Thèse soutenue publiquement le **29 septembre 2015**,
devant le jury composé de :

Andrea Dessen, Ph.D.

Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France, Présidente

Etienne Decroly, Ph.D.

Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB), Marseille,
France, Rapporteur

Patrice Gouet, Ph.D.

Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), Lyon, France, Rapporteur

Ariberto Fassati, Ph.D., M.D.

University College London (UCL), Londres, Royaume-Uni, Examineur

Carlo Petosa, Ph.D.

Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France, Directeur de thèse



« Les laboratoires sont les temples de l'avenir, de la richesse, du bien-être. C'est là que l'humanité grandit, se fortifie et devient meilleure. »
Louis Pasteur

« L'esprit pasteurien, c'est la foi scientifique qui donne l'ardeur au travail, l'imagination qui inspire les idées, la persévérance qui les poursuit, la critique qui les contrôle, la rigueur expérimentale qui les prouve. »
Emile Roux

Remerciements

Dans cette première version, je me contenterai de renouveler mes remerciements à vous, messieurs et madame mes jurés, ainsi qu'à de nombreux collaborateurs. Quelques noms sont égrainés dans les pages de ce travail.

Résumé

La protéine Rev du VIH-1 est une petite protéine qui permet l'export nucléaire des transcrits viraux partiellement ou non épissés. L'import nucléaire de Rev est réalisé par Importin β (Imp β), un facteur de transport cellulaire qui reconnaît le signal de localisation nucléaire (NLS) riche en arginine présent sur Rev. Le but de cette thèse est de déterminer la structure tridimensionnelle du complexe formé par Imp β et Rev. Après des essais de cristallogénèse infructueux, nous avons sondé la structure du complexe Imp β /Rev en utilisant différentes approches biochimiques, biophysiques et computationnelles. Les résultats suggèrent un nombre limité de modèles tridimensionnels du complexe Imp β /Rev. Ces travaux augmentent notre compréhension de la façon dont Imp β reconnaît Rev et devraient dans l'avenir, faciliter la détermination de la structure de ce complexe à haute résolution.

Mots clés

HIV-1, Rev, Importin β , transport nucléocytoplasmique, biologie structurale

Abstract

HIV-1 Rev is a small protein which mediates the nuclear export of unspliced and partially spliced viral transcripts. The nuclear import of Rev is mediated by the host cell protein Importin β (Imp β), a transport factor that recognizes the arginine-rich nuclear localization signal (NLS) present on Rev. The goal of this project is to determine the three-dimensional structure of the complex formed by Imp β and Rev. Because attempts to crystallize this complex were unsuccessful, we sought structural information using a range of biochemical, biophysical and computational approaches. The results suggest a limited number of hypothetical configurations for the Imp β /Rev complex, which can be specifically verified with additional experiments. The work described in this thesis increases our understanding of how Imp β recognizes Rev and should facilitate future efforts at determining the high-resolution structure of this complex.

Key words

HIV-1, Rev, Importin β , nucleocytoplasmic transport, structural biology

Liste des abréviations et des acronymes

AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIRs = Ambiguous Interaction Restraints
AMP = Adénosine monophosphate
Ampi = Ampiciline
ANRS = Agence Nationale de Recherche sur le VIH/SIDA et les hépatites virales
ARM = Arginine Rich Motif
ARNm = ARN Messenger
ARV = Antirétroviraux
ATSAS = All Thats Small Angle Scattering
AZT = Azidothymidine
BMRB = Biological Magnetic Resonance Bank
CCR5 = C-C chemokine receptor type 5
CD4 = Cluster of Differentiation 4
CEA = Commissariat à l'Énergie Atomique
COREVIH = COmité de coordination RÉgional de la lutte conte le Virus de l'Im-munodéficience Humaine
CROI = Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections
CXCR4 = C-X-C chemokine receptor type 4
 DO_X = Densité optique lue à X nm
DSF = Differential Scanning Fluorimetry
EDTA = Éthylène Diamine Tétra Acétique
EMBL = European Molecular Biology Laboratory
EMSA = Electrophoretic Mobility Shift Assay
ESI = Electrospray Ionization
ESRF = European Synchrotron Radiation Facility
Exp. = Expérience
FACS = Fluorescence-activated cell sorting

Liste des abréviations et des acronymes

FP = Polarisation de Fluorescence
FX = *Fragment Exchange*
GAP1 = *GTPase-Activating Protein 1*
GB1 = Protéine G domaine B1
GF = Gel Filtration
GFP = *Green Fluorescent Protein*
GDP = Guanosine-5'-diphosphate
GEF = *Guanine Exchange Factor*
GRePS = Groupe de Recherche en Psychologie Social
GTP = Guanosine-5'-triphosphate
HA = Hémagglutinine
HDR = Habilitation à Diriger des Recherches
HEPES = acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC = *High-performance liquid chromatography*
HPVs = *Human PapillomaViruses*
IAS = *International AIDS Society*
IBB = *Importin Beta Binding domain*
IBS = Institut de Biologie Structural
IC50 = Concentration donnant une inhibition de 50%
II = *Integrase Inhibitor*
Imp α = Importin α
Imp β = Importin β
INNTI = *Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse*
INSTI = *Integrase strand transfer inhibitor*
INTI = *Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse*
INTTI = *Inhibiteurs Nucléotidiques de la Transcriptase Inverse*
ITC = *Isothermal Titration Calorimetry*
IST = Infections Sexuellement Transmissibles
Kana = Kanamycine
LTR = *Long Terminal Repeat*
MALDI = *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*
MES = *2-(N-Morpholino)ethanesulfuric acid*
MBP = *Maltose Binding Protein*
NES = *Nuclear Export Signal*
NIH = *National Institutes of Health*
Ni-NTA = Nickel associé à de l'acide nitriloacetic
NLS = *Nuclear Localization Signal*
NPCs = *Nuclear Pore Complexes*
NTF 2 = *Nuclear Transport Factor 2*
Nups = Nucléoporines
ORF = *Open Reading Frame*

Liste des abréviations et des acronymes

PAOL = Protein Analysis On-Line
PCR = Polymerase Chain Reaction
PDB = Protein Data Bank
PDB ID = Identifiant PDB
pI = point isoélectrique
PKI = Protein Kinase Inhibitor
ppm = parties par millions
PrEP = Pre-Exposure Prophylaxis
PTHrP = Parathyroid Hormone-related Protein
RCC1 = Regulator of Chromosome Condensation 1
RMN = Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD = Root-Mean-Square Deviation
RRE = Rev Response Element
RT-PCR = Real-Time Polymerase Chain Reaction
SARS = Severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV = SARS coronavirus
SAXS = Small Angle X-ray Scattering
SDS = Sodium Dodecyl Sulfate
SETs = Solubility-Enhanced Tags
SIDA = Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SIS = Sida Info Service
SSP = Secondary Structure Prediction
SREBP-2 = Sterol Regulatory Element Binding Protein 2
SRP = Surface Plasmon Resonance
TasP = Treatment as Prevention
TEV = Tobacco Etch Virus
TFA = Trifluoroacetic Acid
TFE = Tetrafluoroéthylène
TOF = Time Of Flight
TSA = Thermal Shift Assay
U.A. = Unité d'Absorbance
UJC = Université des Jeunes Chercheurs
UNAIDS = United Nations Programme on HIV/AIDS
VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine
WT = Wild Type

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Généralités sur le VIH/SIDA	1
1.1.1	Origines et histoire naturelle de l'infection au VIH	1
1.1.2	Structure, génome et cycle cellulaire du VIH-1	4
1.1.3	Médicaments dirigés contre le VIH	6
1.1.4	Progrès biomédicaux passés et présents - perspectives dans la recherche sur le VIH	8
1.2	La protéine virale Rev	12
1.3	L'import/export nucléaire de cargos	17
1.3.1	Le transport nucléocytoplasmique : notions générales	17
1.3.2	Le pore nucléaire (NPC)	19
1.3.3	Le gradient de RanGTP	22
1.3.4	Les karyophérines- β	24
1.3.5	Voie classique d'import nucléaire	27
1.3.6	Des cargos qui interagissent directement avec Imp β	30
1.3.7	Import nucléaire de Rev : Imp β et/ou Transportin ?	32
1.3.8	Structure et flexibilité conformationnelle d'Imp β	32
1.4	Objectif de la thèse	36
2	Résultats	38
2.1	Choix de stratégie pour la purification d'Imp β /Rev	38
2.2	Purification d'Imp β	39

TABLE DES MATIÈRES

2.2.1	Protocole initial de purification	39
2.2.2	Amélioration du protocole	42
2.3	Rev peut être purifié dans une forme monomérique	43
2.3.1	Premières tentatives de purification de Rev isolé	43
2.3.2	Deuxième protocole de purification de Rev	46
2.3.3	Analyse de Rev par SEC/MALLS	49
2.3.4	Confirmation de la structure secondaire de Rev par RMN	51
2.4	Rev et Imp β forment un complexe stable	53
2.4.1	Analyse du complexe Imp β /Rev par SEC	53
2.4.2	Analyse du complexe Imp β /Rev par SEC/MALLS	53
2.4.3	Visualisation du complexe Imp β /Rev par microscopie électro- nique	55
2.5	Tentatives de cristallologénèse	57
2.5.1	Par criblage à haut débit	57
2.5.2	Utilisation de mutants entropiques d'Imp β	59
2.5.3	Tentatives de cristallologénèse de manière pseudo-rationnelle	60
2.6	Imp β reconnaît Rev par son domaine N-terminal	63
2.6.1	Analyse par RMN de Rev en présence et en absence d'Imp β	63
2.6.2	Identification d'épitopes de liaison par balayage peptidique	65
2.7	Rev fixe Imp β avec moins d'affinité que le motif ARM	68
2.7.1	Analyse par TSA	68
2.7.2	Analyse par polarisation de fluorescence	68
2.8	Compétition d'Imp α et Ran sur Rev-NLS/Imp β	71
2.8.1	Compétition entre Rev-NLS et Imp α	71
2.8.2	Absence de compétition entre Rev-NLS et Ran	71
2.9	Imp β fixe deux monomères de Rev ^{V16D/I55N}	73
2.9.1	Première évidence par gel natif	73
2.9.2	Quantification sur gel du complexe purifié par SEC	74
2.9.3	Quantification des acides aminés du complexe purifié par SEC	75
2.9.4	Réticulation chimique suivie de spectrométrie de masse	78
2.9.5	Analyse par spectrométrie de masse en condition native	78
2.10	Imp β fixe un seul monomère de Rev ^{V16D}	82
2.10.1	Analyse par spectrométrie de masse en condition native	82
2.11	L'interaction Imp β /Rev est enthalpiquement favorisée	83

TABLE DES MATIÈRES

2.12	Un nombre limité de configurations d'Imp β /Rev	86
2.12.1	Étape 1 : identification des résidus d'Imp β susceptibles d'in- teragir avec Rev	86
2.12.2	Étape 2 : Amarrage moléculaire (<i>Docking</i>) par HADDOCK . . .	90
2.13	Analyse du complexe Imp β /Rev par SAXS	96
2.13.1	Paramètres déterminés indépendamment d'un modèle atomique	96
2.13.2	Modèles à billes calculées <i>ab initio</i>	100
2.13.3	Évaluation des modèles HADDOCK : 1 ^{er} essai	103
2.13.4	Évaluation des modèles HADDOCK : 2 ^{me} essai	105
3	Conclusions et perspectives	113
3.1	Perspective d'un modèle structural du complexe	116
3.2	À propos de la stœchiométrie Imp β : Rev	121
3.3	Conclusion	126
4	Matériels et méthodes	128
4.1	Stratégies globales utilisées pour le clonage	128
4.1.1	Importin β incorporant une étiquette histidine	128
4.1.2	Mutagenèse dirigée	131
4.2	Production et purification des protéines	132
4.2.1	Purification de la protéase TEV	132
4.2.2	Purification d'Importin α et préparation de la colonne d'affinité	134
4.2.3	Purification d'Importin β	136
4.2.4	Rev	139
4.2.5	RanQ69L	141
4.3	Gels natifs	142
4.4	Réticulation protéique au glutaraldéhyde	143
4.5	Quantification sur gel dénaturant	144
4.6	Détermination de la composition en acides aminés	144
4.7	Fluorimétrie différentielle à balayage	146
4.8	Polarisation de Fluorescence	148
4.8.1	Généralités sur la technique	148
4.8.2	Courbes d'associations entre Rev et Imp β	149
4.8.3	Compétition avec Rev-NLS ou Rev ^{V16D/I55N}	152

TABLE DES MATIÈRES

4.8.4	Compétition avec Imp α	153
4.8.5	Expériences réalisés avec RanGTP	154
4.9	SEC/MALLS à l'aide de la plateforme PAOL	154
4.10	Spectrométrie de masse	155
4.10.1	Spéctrométrie de masse LC/ESI-MS	156
4.10.2	Spectrométrie de masse MALDI-TOF	157
4.10.3	Spectrométrie de masse en conditions natives	158
4.11	Titration calorimétrique isotherme	159
4.12	Résonance Magnétique Nucléaire	160
4.13	Microscopie électronique	163
4.14	Cristallogénèse	164
4.15	Amarrage moléculaire (Docking)	164
4.16	Diffraction des rayons X aux petits angles	166
 Bibliographie		 169
 A Traitements contre le VIH-1		 186
 B Quelques implications à AIDES		 189
 C Plasmide pETDuet incorporant Rev et Impβ		 191
 D Spectrométrie de masse ESI/MALDI avec Impβ		 192
 E Spectrométrie de masse ESI/MALDI avec Rev		 195
 F Microscopie électronique d'Impβ		 198
 G Impβ 493 QEE > AAA		 199
 H Tableau de mes plasmides		 200
 I Design des Amorces utilisées		 202
 J Autotests vis-à-vis du VIH		 204
 K Étude scientifique QualiPEP		 211

Chapitre 1

Introduction

1.1 Généralités sur le VIH/SIDA

1.1.1 Origines et histoire naturelle de l'infection au VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus qui a été découvert au début des années 80. Approximativement 34 millions de personnes à travers le monde sont actuellement infectées et environ 1,8 million de personnes décèdent chaque année du fait de cette infection¹. Il existe deux grands types de virus (VIH-1 et VIH-2), eux-mêmes subdivisés en groupes et sous-groupes. Le génome de ces rétrovirus est composé d'acide ribonucléique (ARN) qui est ensuite rétrotranscrit en ADN au cours du cycle viral. Nous savons désormais que l'infection par le VIH provient d'une zoonose touchant les primates non hominidés d'Afrique et dont la transmission à l'humain s'est effectuée dans les premières années du XX^e siècle. L'hypothèse la plus probable à l'aune des données phylogénétiques est que la pandémie au VIH est due à la transmission à l'homme du SIV, un virus infectant normalement les chimpanzés dans le sud-est du Cameroun (Sharp and Hahn, 2011).

La principale souche de VIH responsable du SIDA est le VIH-1 (groupe M). Par

1. Estimations de l'UNAIDS.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

souci de simplification, lorsque cela ne sera pas spécifié, le terme VIH désignera le VIH-1. La pandémie liée au VIH fut détectée lorsque les pays dits occidentaux ont pris conscience qu'une épidémie se propageait au sein de la communauté homosexuelle, principalement dans les grandes villes, plus spécifiquement dans la baie de San Francisco. L'infection par le VIH fut ainsi d'abord nommée "cancer gay" du fait de l'orientation sexuelle des premières personnes infectées, et d'une des manifestations les plus frappantes de l'infection au VIH chez l'homme : les localisations cutanées du sarcome de Kaposi (Pinzone et al., 2015). Les organismes de santé étaient impuissants devant l'évolution vers le stade le plus dramatique de l'infection virale : le Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA).

En 1983, l'équipe de l'Institut Pasteur de Paris dirigée par Luc Montagnier, et dont Françoise Barré-Sinoussi était membre, détecta la présence d'un rétrovirus suspecté d'être responsable du SIDA (Barré-Sinoussi et al., 1983). Depuis cette découverte il a été montré que le virus a un tropisme pour les cellules présentant à leur surface la glycoprotéine CD4 (*Cluster of Differentiation 4*) ainsi qu'un corécepteur pouvant être soit le CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*), soit le CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*). Les cellules ayant ces marqueurs sont les lymphocytes T CD4, les monocytes, les macrophages, certaines cellules dendritiques et les cellules microgliales présentes dans le cerveau (Stevenson, 2003 ; Barré-Sinoussi et al., 2013).

En absence de traitement, l'infection par le VIH est caractérisée par trois grandes phases (**Figure 1.1**). Pendant la primo-infection, la réplication virale se produit au site de contamination, puis l'infection se dissémine à l'ensemble des organes lymphoïdes secondaires, en particulier le tube digestif. Durant cette phase, la réplication virale est intense. C'est durant cette étape que les personnes infectées sont extrêmement contaminantes, en particulier du fait qu'il existe un lien entre le niveau de charge virale plasmatique et la quantité de virus contenue dans le sperme (Quinn et al., 2000 ; Ferraretto et al., 2014). Après la primo-infection, une réponse immune se met en place. Bien qu'échouant généralement à contrôler l'infection, elle conduit à ce que la charge virale diminue jusqu'à un niveau relativement stable. Cette phase est également caractérisée par une diminution multifactorielle de la quantité de cellules CD4. Cela est dû à la fois à l'effet cytopathogène direct du virus, et du fait

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

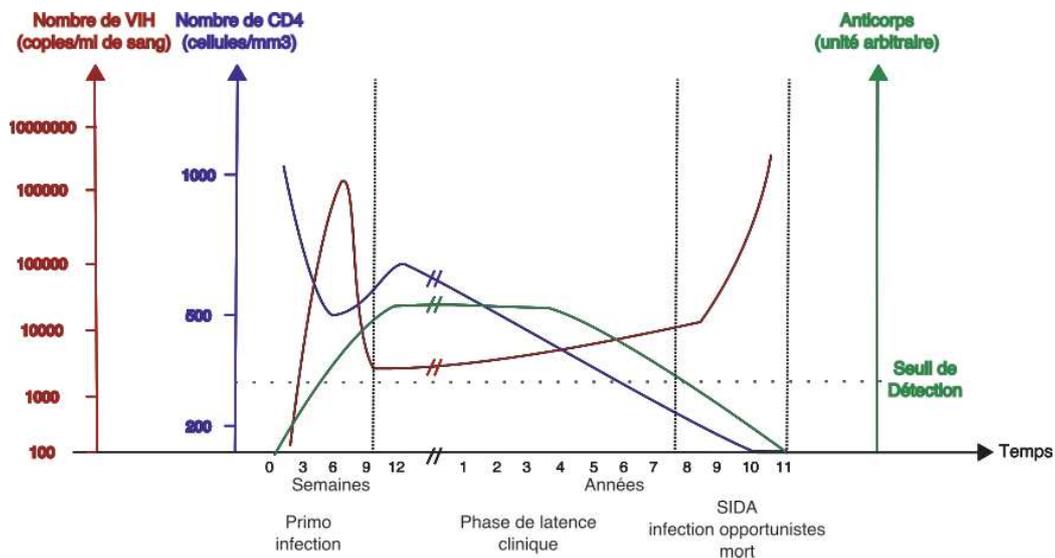


FIGURE 1.1 – Évolution du nombre de particules virales, de lymphocytes CD4 et d'Immunoglobuline G lors de l'infection au VIH en absence de traitements. Le graphique représente sur une échelle de temps, allant des semaines aux années, les trois plus importants marqueurs diagnostiques et le suivi de l'infection par le VIH. Sont représentés le nombre de copies du génome viral dans le sang obtenu par des techniques de PCR quantitative (en rouge), la concentration sanguine de lymphocytes T CD4+ obtenue en FACS (en bleu) et le taux d'anticorps dirigés contre le VIH (en vert). Le seuil de détection de la séropositivité vis-à-vis du VIH, basé sur la recherche des anticorps en France, est symbolisé par les pointillés.

de l'activation immune. Cette période appelée "phase de latence" est directement corrélée à la charge virale et peut durer plus ou moins longtemps en fonction des individus.

Après une valeur médiane d'approximativement 10 ans, la destruction des lymphocytes T CD4 rend le système immunitaire non fonctionnel : le stade SIDA est atteint, puis la mort des personnes infectées survient du fait d'infections opportunistes et/ou de cancers. Le VIH-2 donne une plus lente progression vers le stade SIDA même si les mécanismes responsables de ce fait ne sont toujours pas clairement identifiés (Nyamweya et al., 2013).

1.1.2 Structure, génome et cycle cellulaire du VIH-1

Les virions du VIH-1 contiennent un génome de type ARN et sont enveloppés (**Figure 1.2**). La taille d'une particule virale est d'approximativement 100 nm. Elle comporte à la surface les protéines interagissant avec les récepteurs cellulaires : les glycoprotéines gp41 et gp120. En dessous de l'enveloppe sont présentes la capsid du virus et diverses autres protéines structurales (p24, p6/p7 et p17). Deux copies du génome sont présentes par virion, ainsi que trois enzymes essentielles à son cycle réplcatif : la transcriptase inverse (p66 et p51), l'intégrase (p32) et la protéase (p12).

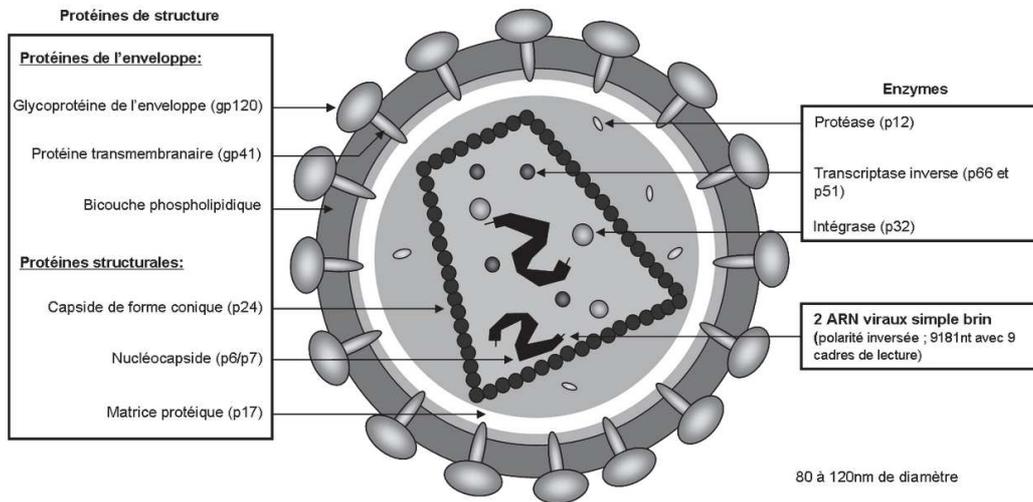


FIGURE 1.2 – Schéma représentant la structure du VIH-1. Les virions sont constitués de protéines structurales (p6/7, p17, p24) composant la capsid du virus ; d'une enveloppe composée d'une bicouche lipidique issue des cellules hôtes, associée aux glycoprotéines gp41 et gp120 ; des deux ARN génomiques du VIH ; et les trois enzymes indispensables au cycle viral : la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase. *Adapté de Gemrot E. and Lefranc M.-P., IMGT (<http://www.imgt.org>)*

Le génome du virus contient environ 10 000 nucléotides (**Figure 1.3**). Il compte les gènes des protéines accessoires (Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev et Nef), ainsi que des précurseurs env (gp160), gag-pol (pr160gag-pol) et gag (pr55gag ; Nielsen et al., 2005). Env est clivée en gp120 (protéine de surface du virus) et gp41 (partie transmembranaire des spicules viraux) par une protéine humaine : la Furine (Shiryaev et al., 2007). Le polypeptide correspondant au transcrit de gag-pol est clivé par la protéase du VIH

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

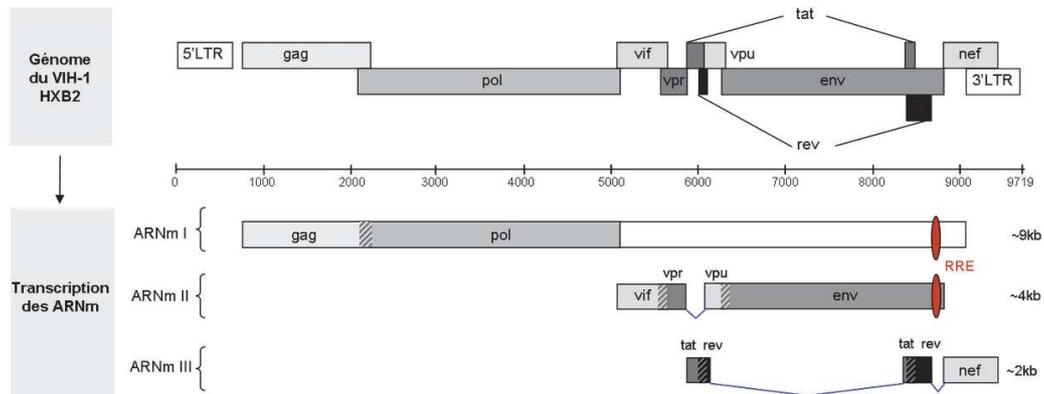


FIGURE 1.3 – **Organisation du génome du VIH-1 et de ses trois principaux transcrits.** En haut est représenté le génome du VIH-1 HXB2. Ce génome d'environ 10 000 nucléotides est délimité par de longues séquences répétées (*Long Terminal Repeat* (LTR)). Les trois cadres de lecture permettent de générer les trois principaux transcrits du VIH-1 (ARNm I, ARNm II et ARNm III). L'ARNm I est l'ARN génomique du virus et code pour les protéines Gag et Pol. L'ARNm II est issu d'un simple épissage et contient les séquences des gènes Vif, Vpr, Vpu et Env. L'ARNm III est issu d'un double épissage et code pour les protéines Tat, Rev et Nef. En bleu sont mises en évidence les zones d'épissages. En rouge est mis en évidence le *Rev Response Element* (RRE) sur lequel se fixe la protéine Rev. *Adapté de Gemrot E. and Lefranc M.-P., IMGT (<http://www.imgt.org>)*

pour obtenir les enzymes du virus. Il s'agit de la protéase (p12), la transcriptase inverse (p66/p51), et de l'intégrase (p32). Pr55gag est aussi un polypeptide clivé par la protéase du VIH. Ce clivage permet de produire les protéines de la matrice (p17), de la capside (p24) et de la nucléocapside (p6/p7; Nielsen et al., 2005).

Ce panorama des différents ARN et protéines produits est cependant très simplifié. En effet, des techniques actuelles de séquençage haut débit des ARN ont permis de déterminer qu'en réalité, de nombreux ARN non codant ou comportant des variations de séquence sont également produits (Harwig et al., 2015).

Le cycle cellulaire du VIH comporte diverses étapes nécessaires à la réplication virale (**Figure 1.4**). Les spicules à la surface du virus interagissent avec le récepteur CD4 et le co-récepteur CXCR4 ou CCR5 à la surface de la cellule. Ceci induit un changement de conformation des protéines virales permettant la fusion des membranes virale et cellulaire, suivi par la libération de la capside et des protéines virales dans

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

le cytoplasme. La capsid est dépolymérisée et l'ARN du virus est rétrotranscrit en ADN double brin par la transcriptase inverse. Ensuite, associé au complexe de pré-intégration, l'ADN viral est transporté dans le noyau où il est généralement intégré dans le génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase. L'ADN du VIH est ensuite transcrit puis traduit par la machinerie cellulaire associée à des protéines accessoires du VIH. Parmi les ARNm transcrits (**Figure 1.3**), seul l'ARNm ayant été doublement et totalement épissé est capable de quitter le noyau par la voie d'export des ARNm cellulaire. La traduction de cet ARNm viral mène à la synthèse des protéines Rev, Tat et Nef.

1.1.3 Médicaments dirigés contre le VIH

Plusieurs étapes du cycle d'infection virale sont la cible des médicaments antirétroviraux (**Figure 1.4**; Pau and George, 2014). Les médicaments actuellement utilisés contre le VIH en France sont résumés dans l'Annexe A (page 186).² Deux classes de médicaments inhibent l'étape de transcription inverse : les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI/INtTI) et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI). Les INTI/INtTI se lient au site actif de la transcriptase inverse et s'incorporent dans la chaîne croissante de l'ADN viral, provoquant ainsi sa terminaison prématurée. Les INNTI n'agissent que sur le VIH-1 et inhibent l'activité de la transcriptase inverse en déformant le site actif. Les INTI comprennent un analogue de la thymidine, la zidovudine (azidothymidine ou AZT), qui a été le premier médicament antirétroviral approuvé pour utilisation contre le VIH (Wright, 1986). D'autres exemples comprennent des dérivés de purines (comme l'abacavir ou la didanosine) et de la cytosine (la lamivudine et l'emtricitabine). Le ténofovir, un analogue de l'AMP, est un INtTI, tandis que l'efavirenz, la névirapine, l'étravirine et la rilpivirine sont des exemples de INNTI.

Une autre étape ciblée par les antirétroviraux est le clivage protéolytique des polyprotéines virales, qui a lieu avant l'étape de bourgeonnement et qui est nécessaire pour la production de particules virales infectieuses. Quelques exemples des inhi-

2. Cette section est écrite également sous l'inspiration du rapport français d'experts sur la prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH ("Rapport Morlat", 2013).
www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

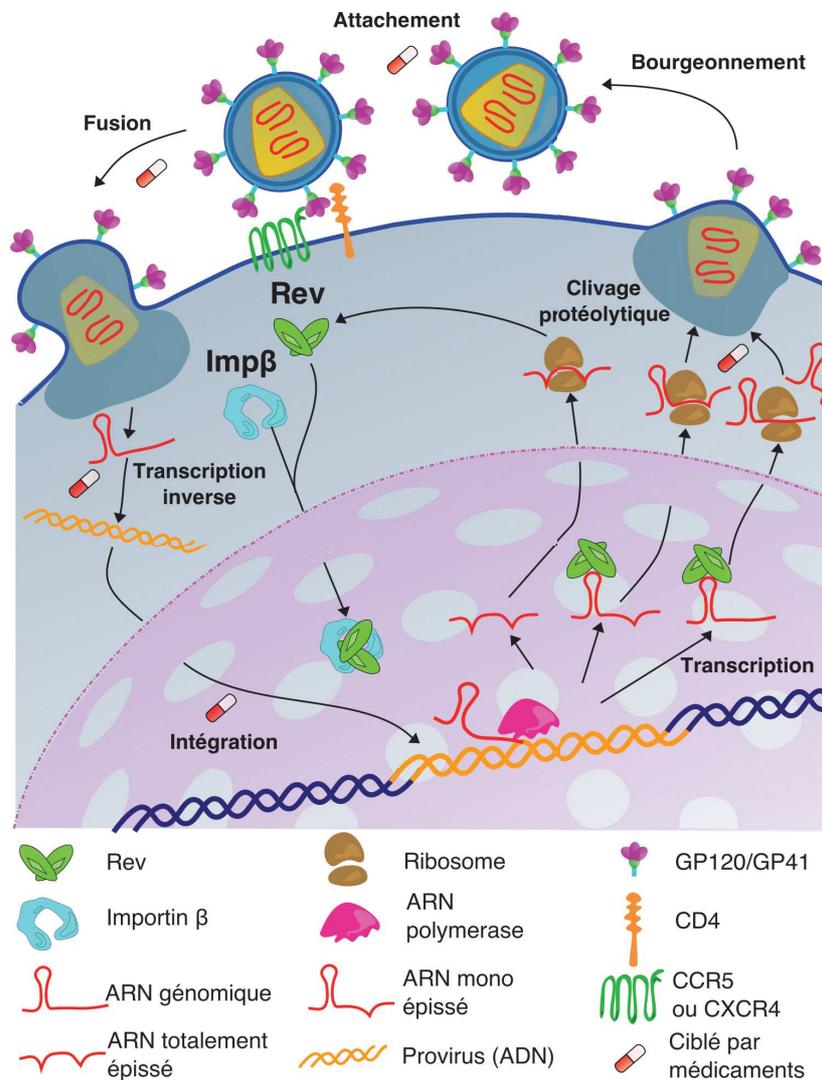


FIGURE 1.4 – Cycle d'infection simplifié du VIH. Schématisation des étapes clés de la répllication du virus ainsi que les étapes ciblées par des médicaments (fusion, transcription inverse, intégration, clivage des protéines par la protéase). La protéine humaine Imp β et la protéine virale Rev sont représentées respectivement en cyan et en vert.

biteurs de la protéase (IP) du VIH sont le saquinavir, le lopinavir, l'indinavir, le nelfinavir, le darunavir, l'atazanavir et le ritonavir. Le ritonavir, s'est avéré avoir aussi une action sur le cytochrome P450-3A4, responsable de l'élimination de nombreux xénobiotiques. Par ce mécanisme, le ritonavir est souvent utilisé en qualité de "booster", puisqu'il augmente la concentration plasmatique des autres IP en inhi-

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

bant les enzymes humaines qui les catabolisent.

Il existe également plusieurs inhibiteurs de l'enzyme virale responsable de l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte. Ces anti-intégrases (*Integrase strand transfer inhibitor* (INSTI) ou *Integrase Inhibitor* (II)) comprennent le raltégravir, l'élvitégravir et le dolutégravir. Enfin, les inhibiteurs d'entrée et de fusion interfèrent avec la liaison, la fusion et l'entrée du VIH dans la cellule hôte. Par exemple, le maraviroc, un antagoniste de CCR5, inhibe la fixation de ce co-récepteur à la protéine gp120 du VIH, et par ce fait, empêche l'entrée du virus dans la cellule hôte. L'inhibiteur de fusion enfuvirtide est un peptide biomimétique constitué de 36 acides aminés qui se lie à la protéine transmembranaire virale gp41, inhibant ainsi la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule hôte.

La gestion du VIH/SIDA comprend l'utilisation de plusieurs antirétroviraux en même temps. Le but initial de ces stratégies est de supprimer la réplication du virus autant que possible, et de réduire ainsi le risque d'apparition spontanée de mutations conférant de la résistance aux médicaments. La combinaison de médicaments utilisés se compose généralement de trois antirétroviraux d'au moins deux classes différentes ("trithérapie"), le plus souvent deux inhibiteurs de la transcriptase inverse associé à un inhibiteur de la protéase. Des combinaisons d'antirétroviraux à dose fixe sous forme de comprimé unique sont souvent prescrits afin de faciliter la prise de médicaments et d'assurer l'observance thérapeutique. Citons par exemple les médicaments Eviplera (emtricitabine + rilpivirine + tenofovir) et le Triumeq (abacavir + lamivudine + dolutégravir).

1.1.4 Progrès biomédicaux passés et présents - perspectives dans la recherche sur le VIH

Mes activités de bénévolat au sein de AIDES forment un tout avec mes aspirations scientifiques, pour expliquer mes motivations à poursuivre ce projet de thèse. En Annexe B (page 189) se trouve un résumé de quelques actions qui ont été capitales pour moi sur le plan humain. J'en profite pour remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer. Vous y trouverez également une justification pour maintenir cette partie dans le présent manuscrit. Cependant, pour signaler le caractère parenthétique de cette partie, dispensable pour la compréhension de mes travaux de thèse, je l'ai

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

mis dans une autre couleur.

La recherche a fait de grandes avancées depuis la découverte du virus responsable de l'immunodéficience humaine. L'élaboration de l'arsenal thérapeutique fut une des étapes les plus importantes. Parmi les faits remarquables, il y a bien sûr la découverte que l'AZT, dérivé nucléotidique, était la première molécule active sur le virus (Wright, 1986). Initialement développé en tant qu'agent anti cancer, il ne fut pas utilisé dans cet usage car inactif sur des modèles murins (Horwitz et al., 1964; Broder, 2010). Cette molécule ciblant la transcriptase inverse du virus et agent terminateur de chaîne fait encore partie des molécules utilisées pour combattre l'infection virale. En France, l'AZT est toujours utilisé, à un dosage plus faible et est associé à d'autres molécules. L'arrivée de la trithérapie pour améliorer et maintenir la suppression de la réplication virale sur le long terme fut la grande révolution, tant pour les personnes infectées que pour le personnel soignant et aidant qui a découvert pour la première fois la possibilité de contrôler l'infection virale (Hammer et al., 1997). Depuis, même s'il existe de grandes disparités dans la population infectée, la qualité de vie des personnes qui peuvent bénéficier d'un suivi médical, c'est-à-dire la majorité des sujets suivis en France, à grandement augmenté. De plus, le nombre de personnes sous traitement et contrôlant l'infection virale ne fait qu'augmenter (Préau et al., 2007; Carrieri et al., 2003; Pedersen et al., 2015). Ces données sont à nuancer pour les personnes vivant dans des pays à ressources limitées ou étant dans une précarité ne leur permettant pas un accès au système de soin équitable.

Au niveau des médicaments, je souhaite également citer les "combos". Ces comprimés comportant 2 à 4 molécules actives sur le virus (ou améliorant les paramètres de pharmacocinétiques) et qui ont participé à la facilité des prises de traitements (Voir Annexe A, page 186). La conjugaison à des nanoparticules du cabotegravir (anti-intégrase), stéréo-isomère du raltegravir, permet également d'entrevoir la possibilité d'un traitement en une prise mensuelle voir trimestrielle (Spreen et al., 2014; Wang et al., 2015).

Un important progrès de la recherche biomédicale fut également la découverte que les personnes dont le gène du co-récepteur CCR5 présente de façon homozygote la délétion $\Delta 32$ (qui correspond à une délétion de la deuxième boucle extracellulaire du co-récepteur), sont résistantes aux souches de VIH-1 ayant un tropisme pour ce co récepteur. La greffe en 2009 de la moelle osseuse d'un donneur présentant cette délétion permit même de faire du receveur de la greffe, Timothy Brown, la seule personne connue au monde à connaître une éradication de l'infection par le VIH sur le long terme (Dean et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996; Hütter et al., 2009; Rennie et al., 2015).

La recherche a également obtenu des résultats scientifiques très intéressants dans le

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

domaine de la prévention. Parmi les plus importantes découvertes, citons la diminution par traitement maternel de la transmission verticale, c'est-à-dire de la mère à l'enfant (Connor et al., 1994), ou la diminution du risque de contamination masculine par voie sexuelle après circoncision (Auvert et al., 2005). D'autre part, la prévention est basée sur l'administration d'antirétroviraux (ARV) aux sujets infectés. C'est le concept de *TasP* (*Treatment as Prevention*) au sens large. Nous savons depuis l'étude HPTN052 réalisée sur plus de 1750 couples sérodifférents qu'un traitement efficace (charge virale indétectable) permet de diminuer de plus de 96% le risque de transmission d'une personne séropositive à une personne séronégative (Cohen et al., 2011). Cependant, malgré ces données, 18 millions de personnes à travers le monde ne sont pas sous traitement antirétroviral.

Il persistait un manque de données sur l'efficacité du *TasP* dans le cas de partenaires homosexuels, et sur les risques d'infection en présence d'une ou plusieurs autres infections sexuellement transmissibles (IST). Tel était le sujet de l'étude "*Partner*"; dont le design de l'expérience est publié (Rodger et al., 2012) et dont certains résultats préliminaires ont été présentés lors de la CROI 2014 (*Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*). Cette étude montre que les IST ne semblent pas augmenter le risque de contamination, et que le traitement permet d'éviter aux personnes homosexuelles de sexe masculin séropositifs d'infecter leur(s) partenaire(s) séronégatif(s). En effet, il n'y a eu aucune transmission des partenaires séropositifs ayant un traitement efficace sur le plan de la charge virale à leur compagnon séronégatif. Des personnes séronégatives incluses dans cet essai furent contaminées, mais le séquençage des virus permet de déterminer que la contamination était effectuée en dehors du couple.

L'utilisation des antirétroviraux comme prophylaxie pré-exposition (*PrEP* pour *Pre-Exposure Prophylaxis*) a aussi un futur rôle important en matière de prévention. Les résultats d'efficacité sont très variables selon les études mais l'observance thérapeutique semble l'élément le plus important pour que cette stratégie fonctionne (Grant et al., 2014). Aussi, aucune personne séronégative vis-à-vis du VIH dans l'étude IPREX-OLE n'a été contaminée en prenant 4 jours ou plus par semaine le traitement composé d'emtricitabine et de ténofovir (Truvada; Gandhi et al., 2015). Par sa longue demi-vie le cabotegravir sous forme conjugué permettrait potentiellement de limiter ces problèmes d'observance (Dolgin, 2014). De plus, ce produit a déjà démontré qu'il peut prévenir des contaminations virales par voie vaginale et anale dans des modèles de primates non humains (Spren et al., 2014; Andrews et al., 2014; Radzio et al., 2015; Andrews et al., 2015).

Malgré toutes ces avancées, les effets secondaires des traitements antirétroviraux et le vieillissement accéléré des personnes vivant avec le VIH restent un problème d'actualité. Le sujet est très vaste; par exemple, certains inhibiteurs nucléotidiques

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIH/SIDA

de la transcriptase inverse engendrent des problèmes métaboliques, en ayant une action sur les mitochondries, et sont capables d'inhiber les télomérases (Torres and Lewis, 2014).

Enfin, depuis 2012, l'*International AIDS Society* (IAS) a pris position pour tenter d'orienter le plus possible les recherches internationales sur la guérison fonctionnelle ou totale de l'infection au VIH (*HIV cure*). Parmi les pistes les plus intéressantes, je souhaite citer :

- l'élimination du virus dans certains sanctuaires (système nerveux central et tissus lymphoïdes, en particulier associés au système intestinal) où le VIH-1 peut persister, en particulier du fait que les molécules antirétrovirales n'y diffusent pas de manière optimale (Cory et al., 2013).
- la maîtrise de l'activation immune : nous savons que le virus investit très rapidement le tissu intestinal et que les individus infectés par le VIH ont une forte translocation microbienne, c'est à dire des bactéries du tube digestif qui atteignent le système sanguin. Cet événement provoque une inflammation chronique (Brown and Mattapallil, 2014 ; Vyboh et al., 2015).
- la lutte contre la persistance du virus dans les cellules sous forme d'ADN proviral intégré dans le génome des cellules hôtes. Ces dernières ont souvent une longue durée de vie (Stevenson, 2003). Ces cellules sont responsables du rebond viral observé après arrêt de traitements chez les personnes vivant avec le VIH, même si leur charge virale était maintenue indétectable pendant de nombreuses années. Une stratégie faisant l'objet de nombreuses recherches consisterait à réactiver ces cellules infectées, de les éliminer et ainsi de s'opposer à la latence du VIH (Battistini and Sgarbanti, 2014 ; Dahabieh et al., 2015).
- l'étude des "contrôleurs d'élites" : ces rares personnes vivantes avec le VIH contrôlent naturellement l'infection et conservent, en absence de traitement, une charge virale inférieure à 5000 copies par millilitre de sang (Lambotte et al., 2005 ; Lambotte and Delfraissy, 2006). Il semblerait que leurs virus ne soient pas moins virulents ; les mécanismes mis en jeu chez ces patients sont incomplètement caractérisés mais la qualité du répertoire lymphocytaire et le niveau de production d'interféron γ semblent impliqués. L'étude de ces patients permettra de comprendre quels sont les corrélat biologiques de contrôle de l'infection virale (Autran et al., 2011 ; Karris and Haubrich, 2014 ; Li et al., 2015b ; Côtés et al., 2015).
- L'approche vaccinale est un important champ d'investigation depuis les an-

nées 1980 ; pendant longtemps les recherches ont débouché sur une suite d'échecs. Il existe de nombreuses nouvelles pistes. L'une d'entre elles est l'utilisation des anticorps neutralisants. Un certain nombre de patients produisent des anticorps capables d'inhiber l'infection d'un grand nombre de souches virales. Le but est de solliciter ces différents anticorps dans une approche de vaccination thérapeutique ou prophylactique. (Doria-Rose and Joyce, 2015 ; Alter and Barouch, 2015 ; de Goede et al., 2015).

- Enfin des approches de modification génétique (comme d'incorporer la délétion 32 dans le gène codant pour CCR5 pour rendre les cellules résistantes aux virus) sont en cours. Ces modifications peuvent par exemple être réalisées en utilisant des nucléases à doigts de zinc ou le système CRISPR/Cas9. L'avantage principal de ces techniques provient du fait qu'elles pourraient être utilisées *ex vivo* sur les cellules souches de la moelle hématopoïétique des patients, produisant ainsi des cellules résistantes à l'infection par le VIH ayant un tropisme pour ce co-récepteur (Drake and Bates, 2015 ; Gu, 2015 ; Nunes-Alves, 2015 ; Zhu et al., 2015 ; Li et al., 2015a ; Cornu et al., 2015).

1.2 La protéine virale Rev

Malgré le grand nombre de médicaments disponibles contre le VIH, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques reste d'intérêt de part les problèmes de pharmacorésistance et des effets secondaires des antirétroviraux à plus ou moins long terme. Une des étapes du cycle viral qui n'est pas encore ciblée par un médicament est l'export nucléaire des transcrits viraux non épissés et partiellement épissés (**Figure 1.4**). Dans une cellule non infectée, les ARN complètement épissés sont exportés vers le cytoplasme, tandis que les transcrits incomplètement épissés sont retenus dans le noyau et dégradés. Le VIH évite cette dégradation grâce à la protéine régulatrice Rev (*Regulator of expression of the virion*), qui se lie aux transcrits incomplètement épissés et permet leur export dans le cytosol. Rev joue aussi un rôle dans la traduction des ARNm viraux, est impliqué dans l'encapsidation du génome viral et inhibe l'import nucléaire de l'intégrase virale, tout en facilitant son export (Levin et al., 2010a ; Levin et al., 2010b ; Jeang, 2012). La réplication virale est bloquée si la fonctionnalité de Rev est compromise (Cochrane, 2004 ; Sood et al.,

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.2. LA PROTÉINE VIRALE REV

2007).

Rev est une protéine de 116 résidus (13 kDa), qui n'est pas présente dans la particule virale, mais qui est l'une des trois premières protéines produites lors de l'infection cellulaire (Jeang, 2012). Rev fixe l'ARN viral en reconnaissant un élément intronique appelé le RRE (*Rev-Response Element*), une région de 340 nucléotides très structurée, formée de plusieurs éléments tiges-boucles. Un premier monomère de Rev se lie avec haute affinité à un petit domaine du RRE, la tige-boucle IIB, entraînant la multimérisation de Rev sur le RRE entier (Iwai et al., 1992 ; Mann et al., 1994). Le complexe Rev/ARN est ensuite exporté par CRM1 vers le cytosol, permettant la synthèse des protéines virales et l'encapsidation du génome viral.

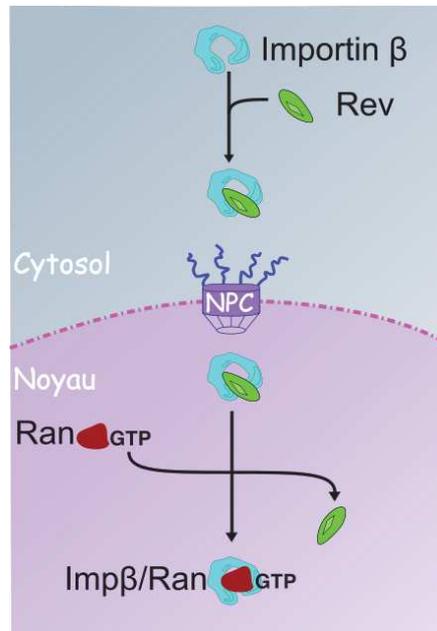


FIGURE 1.5 – Importation nucléaire du complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$ et rôle de RanGTP .

Rev fait la navette entre le cytoplasme et le noyau grâce à deux signaux de localisation : les motifs ARM et NES (**Figure 1.6 (a)**). Le motif riche en arginine (ARM, Arginine-Rich Motif), formé par les résidus 34-50, constitue un NLS basique qui interagit directement avec Importine β et permet l'importation de Rev dans le noyau. Une fois que le complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$ est entré dans le noyau l'interaction de Ran avec $\text{Imp}\beta$ va libérer Rev dans le noyau. Le motif NLS est aussi responsable de la fixation

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.2. LA PROTÉINE VIRALE REV

de Rev à l'ARN. Les résidus adjacents à ce motif sont impliqués dans la multimérisation de Rev sur le RRE (Jain and Belasco, 2001). Rev contient aussi un motif NES riche en leucine (résidus 73-83), qui permet l'export de Rev en interagissant avec le facteur d'export cellulaire CRM1.

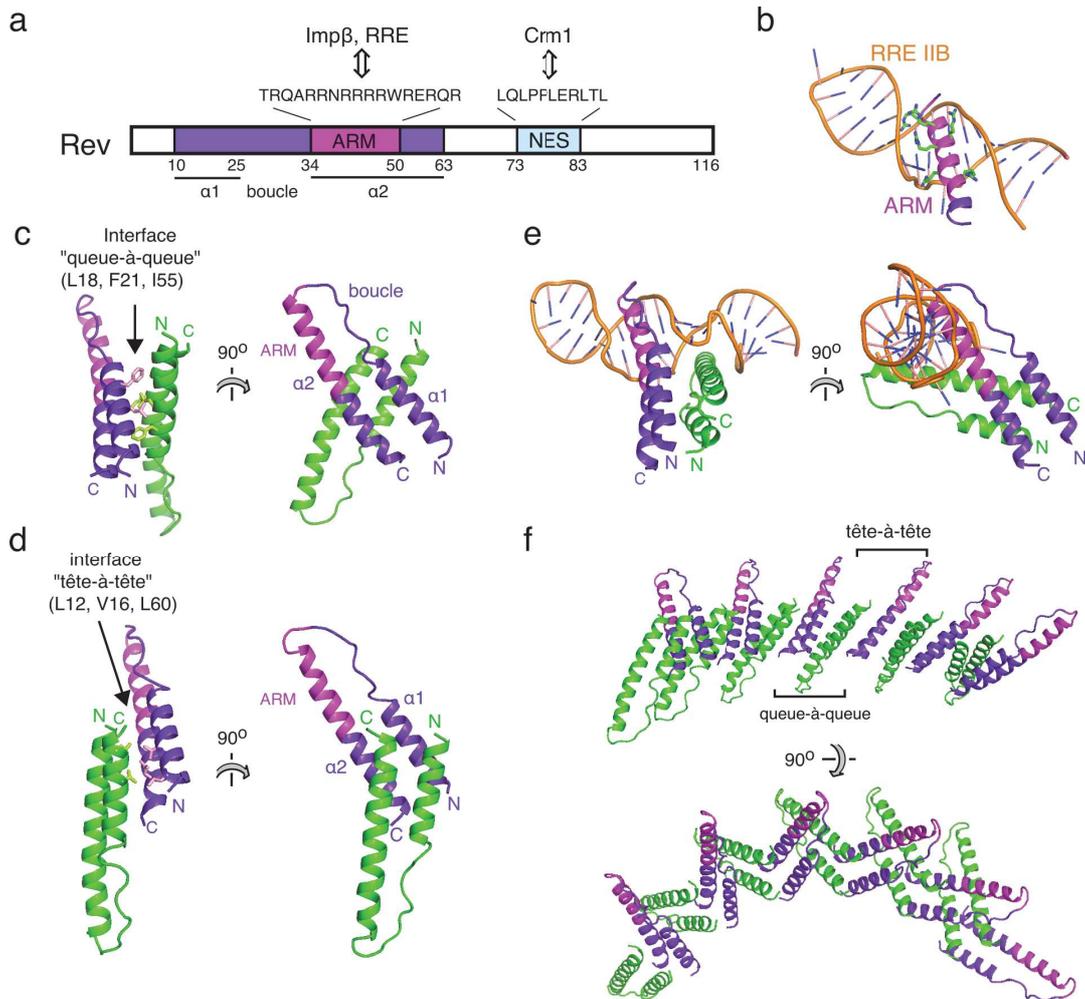


FIGURE 1.6 – **Structure de Rev.** (a) Schéma des différents domaines de Rev. (b) Structure du motif ARM en complexe avec le domaine IIB du RRE (Battiste et al., 1996). (c) Structure d'un dimère de Rev "queue-à-queue" (Daugherty et al., 2010b). (d) Structure d'un dimère "tête-à-tête" (DiMattia et al., 2010). (e) Structure d'un dimère de Rev en complexe avec le domaine IIB du RRE (Jayaraman et al., 2014). (f) Modèle hypothétique d'un oligomère de Rev, basé sur les deux types de dimère montrés en (c) et (d).

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.2. LA PROTÉINE VIRALE REV

Plusieurs structures atomiques sont connues pour Rev (**Tableau 1.1**). Des études par RMN sur des peptides de Rev ont révélé que le motif ARM forme une hélice α lorsqu'il est seul, dans des conditions forcées³, ou en complexe avec le domaine IIB du RRE (Scanlon et al., 1995; Battiste et al., 1996; Casu et al., 2013; **Figure 1.6 (b)**). Plus récemment, une étude cristallographique a montré que le motif NES adopte une structure partiellement hélicale qui est reconnue par un sillon hydrophobe de CRM1 (Güttler et al., 2010). Deux structures résolues en 2010 (Daugherty et al., 2010b; DiMattia et al., 2010) ont révélé que le domaine N-terminal de Rev (résidus 9-65) forme une épingle hélicale composée d'une courte ($\alpha 1$, résidus 10-25) et d'une longue ($\alpha 2$, résidus 34-65) hélices, reliées par une courte boucle (**Figure 1.6 (a), (c) et (d)**). Par contre, les queues N- et C-terminales (résidus 1-8 et 66-116) de Rev sont intrinsèquement désordonnées. Cette conformation du domaine N-terminal a été confirmée par la structure de Rev en complexe avec un fragment du RRE comprenant la tige-boucle IIB (Jayaraman et al., 2014; **Figure 1.6 (e)**).

TABLEAU 1.1 – Structures atomiques de Rev.

PDB	Méthode	Résolution (Å)	Rev	Résidus Structurés	Partenaire	Référence
1RPV	RMN	-	Peptide ARM	34-50	-	Scanlon et al, 1995
2M1A	RMN	-	" "	34-50	-	Casu et al, 2013
1ETF	RMN	-	" "	33-55	RRE IIB (39 ntds)	Battiste et al, 1996
1ETG	RMN	-	" "	33-55	" "	" "
1ULL	RMN	-	" "	34-50	aptamère d'ARN	Ye et al., 1996
484D	RMN	-	" "	34-50	" "	Ye et al., 1999
3NBZ	rayons X	2.80	Peptide NES (en fusion avec Snurportin1)	72-83	CRM1, Ran	Güttler et al., 2010 (forme cristalline 1)
3NCO	rayons X	2.90	" "	72-83	" "	Güttler et al., 2010 (forme cristalline 2)
2X7L	rayons X	3.17	Dimère (tête-à-tête)	9-65	Fragment Fab	DiMattia et al., 2010
3LPH	rayons X	2.50	Dimère (queue-à-queue) Mutant L12S/L60R	9-65	-	Daugherty et al., 2010b
4PMI	rayons X	3.20	Dimère (queue-à-queue) Mutant L12S/E47A/L60R	11-63	RRE IIB40 (55 ntds)	Jayaraman et al., 2014

Le domaine N-terminal de Rev possède deux surfaces planes, appelées "tête" et "queue" (**Figure 1.6 (c) et (d)**). Ces surfaces exposent plusieurs résidus hydrophobes au solvant : Leu18, Phe21 et Ile55 côté queue, et Leu12, Val16 et Leu60 côté tête. Ces résidus permettent à Rev de se multimériser par le biais d'interactions de type "tête-à-tête" et "queue-à-queue". Les structures de 2010 présentent Rev sous forme dimérique en deux configurations différentes : queue-à-queue (**Figure 1.6 (c)**) et tête-à-tête (**Figure 1.6 (d)**). La première a pu être cristallisée grâce à l'introduc-

3. utilisation du TFE

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.2. LA PROTÉINE VIRALE REV

tion de deux mutations (L12S/L60R) qui déstabilisent l'interface de type tête-à-tête, alors que la deuxième a été co-cristallisée avec un fragment F_{ab} qui empêche les interactions de type queue-à-queue. En effet, pendant plusieurs années toute tentative de résoudre la structure de Rev a été contrecarrée par sa tendance à s'agréger *in vitro*, obstacle qui a pu être surmonté en 2010 par l'utilisation des mutants ou d'un partenaire de liaison. La **Figure 1.7** montre que Rev forme des longues fibres lorsqu'il est seul et à forte concentration, et des particules plus homogènes en complexe avec de l'ARN. Un modèle hypothétique illustrant comment des interactions impliquant les deux surfaces de Rev peuvent donner lieu à un phénomène de polymérisation est montré dans la **Figure 1.6 (f)**. De façon intéressante, la structure de Rev en complexe avec l'ARN (obtenue en introduisant trois mutations, L12S/E47A/L60R) est aussi celle d'un dimère de type queue-à-queue (**Figure 1.6 (e)**). Cependant, l'orientation des deux monomères est complètement différente de celle du dimère isolé (**Figure 1.6 (c)**), ce qui suggère une certaine plasticité structurale au niveau des interfaces de Rev.

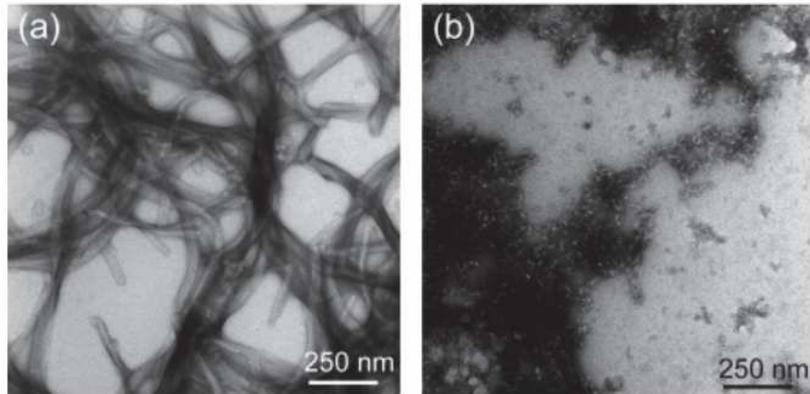


FIGURE 1.7 – **Micrographe obtenu par microscope électronique à transmission de Rev.** (a) Rev seule. (b) Rev en complexe avec des ARN. (*Adapté de Havlin et al., 2007*).

1.3 L'import/export nucléaire de cargos

1.3.1 Le transport nucléocytoplasmique : notions générales

Le trafic macromoléculaire entre le cytoplasme et le noyau est une activité fondamentale de la cellule eucaryote. Ces deux compartiments cellulaires sont séparés par l'enveloppe nucléaire, une structure composée de deux membranes. La membrane externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique, tandis que la membrane interne entoure la lamina nucléaire et la chromatine. Les deux membranes fusionnent à de nombreuses zones où elles sont perforées par des pores nucléaires (*Nuclear Pore Complexes* (NPC)). La **Figure 1.8** présente un exemple de coupe transversale de cellule animale avec une mise en évidence du noyau et des pores nucléaires. Ces structures, similaires à des canaux, sont composées d'environ 500 polypeptides nommés nucléoporines (Nups ; Alber et al., 2007). Tandis que les ions, les métabolites et les macromolécules de poids moléculaire inférieur à 30-40 kDa peuvent transiter par le NPC par diffusion passive, la plupart des protéines et des molécules d'ARN ont besoin de récepteurs spécifiques pour traverser l'enveloppe nucléaire. C'est le cas par exemple des ARN messagers et de transfert qui doivent quitter le noyau pour assurer la synthèse des protéines dans le cytoplasme. C'est le cas aussi de nombreuses protéines produites dans le cytoplasme qui exercent une fonction dans le noyau, y compris des protéines ayant un rôle dans la réplication et la transcription de l'ADN, le remodelage de la chromatine, et le maintien de la structure du noyau.

La plupart des récepteurs de transport nucléocytoplasmique appartient à la famille de protéines β -karyophérine, appelées aussi importines et exportines. Toutes les karyophérines interagissent avec des Nups et avec Ran, une petite GTPase dont l'état nucléotidique affiche une forte asymétrie de part et d'autre de l'enveloppe nucléaire : elle est principalement liée au GTP dans le noyau et au GDP dans le cytosol. Cette asymétrie est souvent appelé le "gradient de RanGTP". Les karyophérines ont une forte affinité pour la forme de Ran liée au GTP, RanGTP, et une faible affinité pour RanGDP. Les importines lient leur substrat macromoléculaire (aussi appelés "cargos") dans le cytosol, transitent par le NPC, et libèrent le cargo dans le noyau lorsqu'elles fixent RanGTP. Les exportines s'associent de manière coopérative avec

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

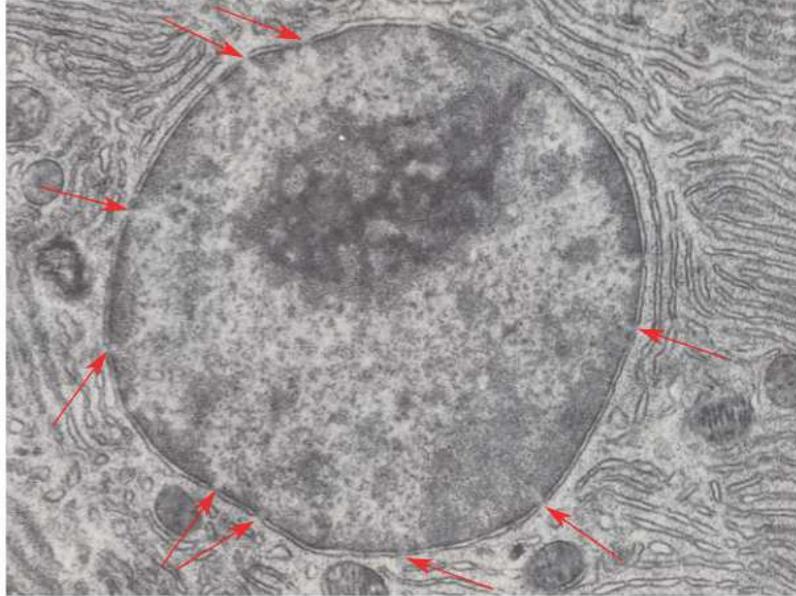


FIGURE 1.8 – **Coupe transversale d'une cellule eucaryote pancréatique.** Micrographie de microscopie électronique à transmission. Quelques pores nucléaires sont mis en évidence (flèches rouges). *Adapté de www.gettyimages.fr/detail/photo/micrograph-of-nucleus-and-surrounding-cytoplasm-of-a-pancratic-photo/128587962*

le cargo et avec RanGTP dans le noyau, formant ainsi un complexe ternaire qui traverse le NPC et se dissocie lorsque le GTP est hydrolysé par Ran, libérant ainsi le cargo dans le cytosol. Ainsi les principaux éléments de la machinerie de transport nucléocytoplasmique sont le NPC, les récepteurs de transport et le gradient de RanGTP. Chacun de ces éléments est décrit plus en détail ci-dessous. Ces éléments sont associés à de nombreuses pathologies (Jamali et al., 2011 ; Mor et al., 2014). En particulier, la machinerie cellulaire est exploitée par de nombreux virus pour leurs propres intérêts de réplication, y compris le virus de la grippe, le SARS coronavirus (SARS-CoV), le virus Ebola, le virus Nipah, et le VIH-1 (Chahine and Pierce, 2009 ; Monette et al., 2011 ; Levin et al., 2011 ; Fulcher and Jans, 2011).

1.3.2 Le pore nucléaire (NPC)

D'un poids d'environ 120 MDa chez les vertébrés et d'environ 40 MDa chez la levure, le NPC est l'un des plus grands assemblages supramoléculaires dans la cellule eucaryote (Kabachinski and Schwartz, 2015). Il existe environ 3000 NPC par noyau dans une cellule "type" comme celles de la lignée cellulaire immortalisée HeLa (Maul et al., 1972; Dultz and Ellenberg, 2010), chacun pouvant permettre le passage d'environ 1000 cargos macromoléculaires par minute (Ribbeck and Görlich, 2001). La **Figure 1.9** donne une vue plus précise de la structure de ces pores. Grâce à ces clichés de microscopies, nous pouvons observer l'implantation des NPCs à travers l'enveloppe nucléaire (**Figure 1.9 (a)**) et remarquer des détails structuraux concernant leurs parties cytoplasmique et nucléaire (**Figure 1.9 (b) et (c)**). Le NPC est décrit plus en détail plus loin. Il est composé d'un pore central, d'un anneau cytoplasmique et d'un anneau nucléoplasmique. L'anneau cytoplasmique est attaché à des filaments de longueur $\simeq 35$ nm, tandis que l'anneau nucléoplasmique est attaché à des filaments qui forment une structure en forme de panier.

Chaque NPC est constitué de nombreuses copies d'environ 30 nucléoporines (Nups), organisées en une symétrie octogonale autour du centre du canal du NPC. Les Nups sont organisées en plusieurs sous-complexes, dont les plus étudiés sont les complexes Nup62, Nup214, Nup93 et Y (ou Nup107; Kabachinski and Schwartz, 2015). Les structures atomiques de plusieurs Nups ou de leurs fragments ont été déterminées. Plusieurs possèdent des domaines de " β -propeller" ou de solénoïde α -hélicoïdale, ce qui d'un point de vue évolutif suggère une origine commune avec les protéines karyophérines et les complexes de revêtement des vésicules tels que COPI, COPII et clathrine (Devos et al., 2004; Brohawn et al., 2008). Certaines nucléoporines, les FG-Nups, possèdent des "domaines FG", nommés ainsi du fait de leur composition riche en phénylalanine et glycine. Ces domaines comportent plusieurs (de 5 à 50) répétitions du motif Phe-Gly, séparées par des séquences de résidus hydrophiles (Terry and Wentz, 2009). Ces régions sont intrinsèquement désordonnées et peuvent s'étendre jusqu'à 200 nm de longueur (Denning et al., 2003; Strawn et al., 2004).

La structure tridimensionnelle du NPC humain a été déterminée à une résolution

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

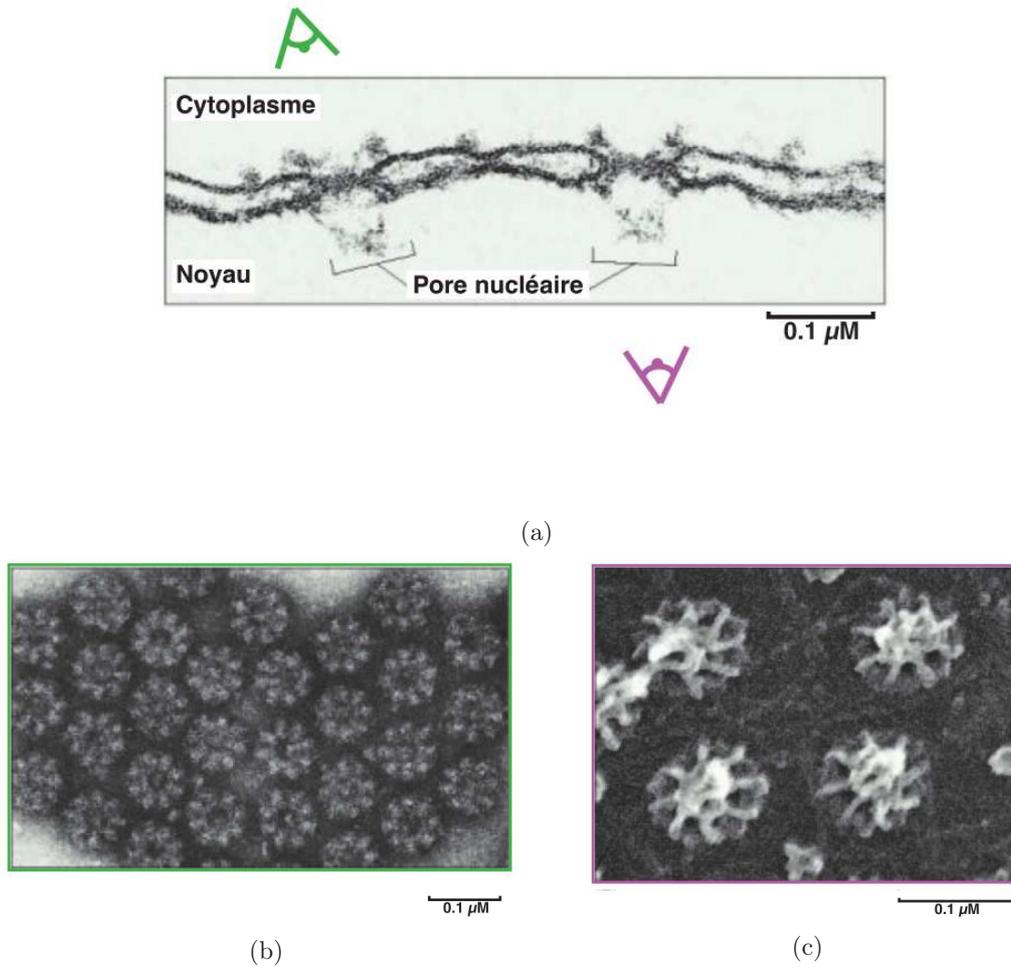


FIGURE 1.9 – Micrographes d'un noyau cellulaire et de pores nucléaires. (a) Coupe longitudinale et zoom sur deux pores nucléaires. (b) Observation du pore nucléaire du côté cytoplasmique. (c) Vue du pore nucléaire de son côté nucléaire. *Micrographes adapté de www.apsubiology.org*

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

de 32 Å par cryomicroscopie électronique. En combinaison avec d'autres données biochimiques et biophysiques, il a été possible de localiser précisément plusieurs Nups (Bui et al., 2013). Nos connaissances actuelles de la localisation des Nups à l'intérieur du NPC sont résumées dans la **Figure 1.10**. Les complexes Y et Nup93, constitués de 10 et 5 Nups, respectivement, servent de squelette structural pour l'ensemble du NPC : ils définissent le pore central et les anneaux cytoplasmique et nucléaire (D'Angelo and Hetzer, 2008 ; Hoelz et al., 2011 ; Bui et al., 2013). De façon surprenante pour un complexe de cette taille localisé au niveau d'une membrane, le NPC ne possède que trois protéines transmembranaires (Pom121, Ndc1 et Gp210), qui relie le pore nucléaire à l'enveloppe nucléaire. Les filaments cytoplasmiques sont composés essentiellement de Nup358/RanBP2, Nup214 et Nup88 tandis que le panier nucléaire est composé de Nup153 et Tpr (Ibarra and Hetzer, 2015).

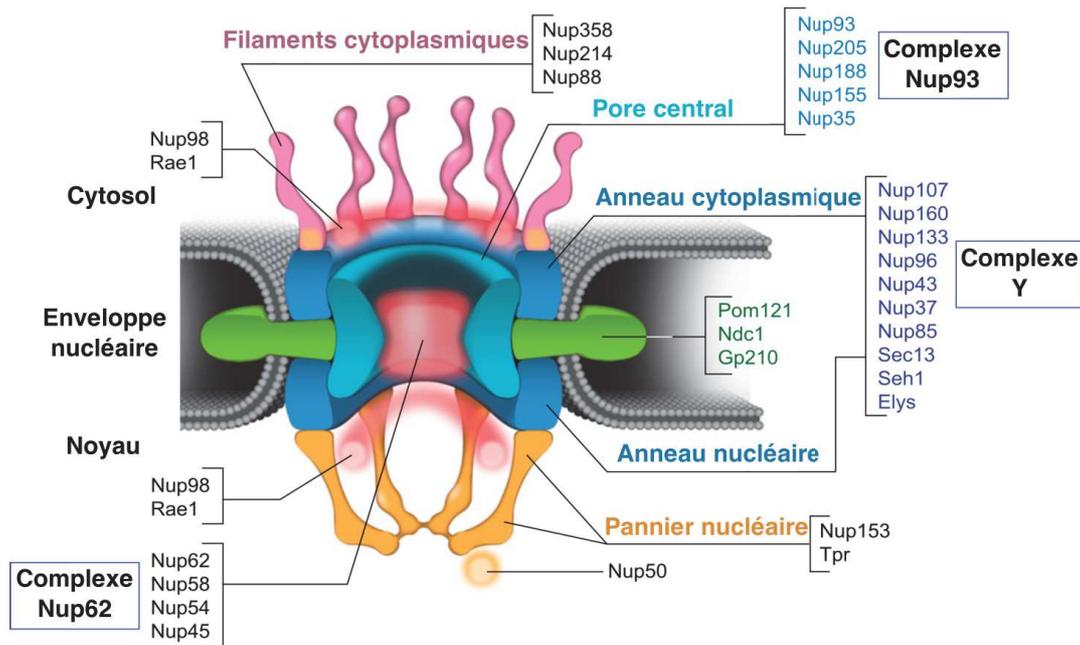


FIGURE 1.10 – Structure du complexe formant le pore nucléaire et composition moléculaire. (Adapté de Ibarra and Hetzer, 2015).

Le complexe Nup62, formé par quatre FG-Nups, est localisé dans la partie interne du NPC, et est responsable de la perméabilité de certaines molécules à travers le pore (Wente and Rout, 2010 ; Grossman et al., 2012). Bien que le mécanisme moléculaire par lequel le NPC assure une fonction de barrière ne soit pas totalement compris,

il est reconnu que les FG-Nups ont un rôle important dans cette tâche. Typiquement, les FG-Nups contiennent un domaine structuré qui sert de point d'ancrage au pore nucléaire, ainsi qu'une queue filamenteuse formée par le domaine FG (Terry and Wente, 2009). Les FG-Nups forment un hydrogel et sont considérées comme les barrières du pore nucléaire en ne laissant passer que spécifiquement certaines macromolécules de plus de 40 kDa (Kabachinski and Schwartz, 2015). Une étude récente par force atomique microscopique a considérablement éclairé les propriétés nanomécaniques du NPC lui permettant d'agir comme filtre de sélectivité pour les récepteurs de transport (Bestembayeva et al., 2015).

1.3.3 Le gradient de RanGTP

Ran est une protéine abondante de 25 kDa, qui appartient à la famille Ras des petites GTPases. Le rôle de Ran dans l'import nucléaire des protéines a été découvert en 1993 (Moore and Blobel, 1993) et son rôle dans l'import et l'export des autres cargos a été établi dans les 5 années suivantes (pour revue : Azuma and Dasso, 2000). Par la suite, il a été découvert que Ran joue un rôle important dans plusieurs processus cellulaires, dont l'assemblage du fuseau mitotique (Carazo-Salas et al., 1999 ; Ohba et al., 1999), l'assemblage post-mitotique de l'enveloppe nucléaire (Hetzer et al., 2000 ; Zhang and Clarke, 2000) et des NPC (Walther et al., 2003), la duplication du centrosome (Budhu and Wang, 2005), l'apoptose (Wong et al., 2009), et le trafic ciliaire (Dishinger et al., 2010). Ran, comme les autres GTPases, subit des cycles d'échange de GTP suivi par son hydrolyse en GDP (**Figure 1.11**). La cinétique de ces deux étapes est fortement accélérée par l'association de Ran avec d'autres facteurs cellulaires. L'hydrolyse du GTP est stimulée par RanGAP (*Ran GTPase-activating protein* ; Bischoff et al., 1994) et par les protéines RanBP1 (*Ran Binding-Protein 1*) et RanBP2 (Bischoff et al., 1995 ; Wu et al., 1995), tandis que le remplacement de GDP par GTP est stimulé par le facteur d'échange de guanine, RanGEF (*Ran Guanine Nucleotide Exchange Factor*), nommé RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation 1*) chez les vertébrés (Bischoff and Ponstingl, 1991). Fait important, ces facteurs sont distribués de façon asymétrique dans la cellule. RanGEF a une haute affinité pour la chromatine et par conséquent sa localisation est limitée au noyau, alors que RanGAP, RanBP1 et RanBP2 sont localisées dans le

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

cytosol ou sur les filaments cytosoliques du NPC. Cela donne lieu à une répartition asymétrique de Ran : la forme nucléaire est principalement liée au GTP, la forme cytosolique au GDP. Cette asymétrie est critique pour la directionnalité du transport nucléocytoplasmique.

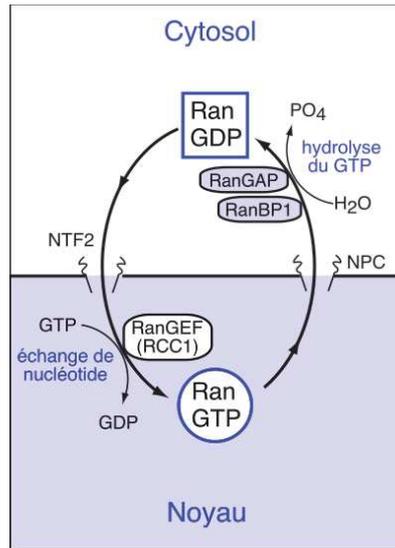


FIGURE 1.11 – Mécanisme maintenant une asymétrie de localisation de RanGTP/GDP. (Adapté de Carlo Petosa).

La fonction de Ran dépend de sa conformation, qui est déterminée par l'état du nucléotide lié (GDP ou GTP). Comme pour les autres petites GTPases, le changement de conformation de Ran concerne principalement deux régions, appelées "switch I" et "switch II", qui sont sensibles à la présence du phosphate γ du GTP (Wittinghofer and Vetter, 2011 ; **Figure 1.12**). Par exemple, dans RanGDP la région switch I forme un brin β , mais dans RanGTP elle forme une boucle qui interagit avec le phosphate γ du nucléotide. Ran possède aussi une hélice C-terminale dont la conformation dépend de l'état nucléotidique. Dans la forme liée au GDP, cette hélice se replie contre le domaine globulaire de Ran, alors que dans l'état lié au GTP l'hélice se détache du domaine et devient accessible au solvant. Ainsi, les conformations de RanGDP et RanGTP sont très différentes, ce qui permet aux partenaires de Ran de discriminer entre ces deux formes avec une forte sélectivité. Par exemple, la protéine NTF2 (*Nuclear Transport Factor 2*), le facteur de transport responsable de l'import nucléaire de Ran, reconnaît RanGDP de manière spécifique (Corbett and Silver,

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

1996 ; Stewart et al., 1998), alors que les karyophérines- β interagissent spécifiquement avec RanGTP (Görlich et al., 1997). Par exemple, Imp β fixe RanGTP avec un K_D de 0.5 nM (Bischoff and Görlich, 1997), alors que son Kd pour RanGDP est de l'ordre de 2 μ M (Görlich et al., 1996 ; Forwood et al., 2008).

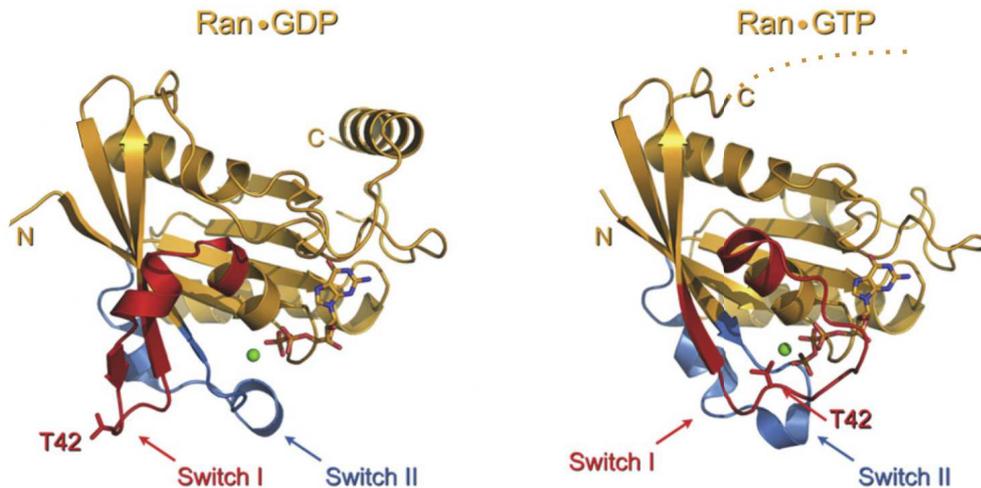


FIGURE 1.12 – Structure de Ran. (Adapté de Schrader et al., 2008).

1.3.4 Les karyophérines- β

Le passage des macromolécules de taille supérieure à 40 kDa à travers le NPC nécessite des facteurs de transport nucléaire, dont la plupart appartient à la famille des karyophérines- β , dont le prototype est Imp β . Quatorze membres de cette famille sont connus chez la levure et 20 chez l'homme, dont environ la moitié sont des importines et la moitié des exportines (pour revue : Kimura and Imamoto, 2014). Ces protéines partagent des poids moléculaires similaires (85-150 kDa), des points isoélectriques acides ($pI = 4.0-5.5$) et une faible identité de séquence entre elles (10-20%). Les différentes karyophérines interagissent toutes avec RanGTP et avec des FG-Nups du NPC, mais reconnaissent différents cargos macromoléculaires. Quelques membres représentatifs comprennent : Importin β (Imp β), qui coopère avec la protéine adaptatrice Importin α (Imp α) pour importer les protéines possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) basique du cytosol au noyau ; Transportin-1, qui est

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

responsable de l'import nucléaire de certaines protéines ribosomales et ribonucléo-protéines nucléaires hétérogènes (hnRNPs) ; le facteur d'export CRM1, qui reconnaît les protéines possédant un signal d'export nucléaire (NES) riche en leucines ; et l'exportine Xpot, qui exporte les ARN de transfert vers cytosol. D'autres membres de la famille sont indiqués dans la **Figure 1.13**.

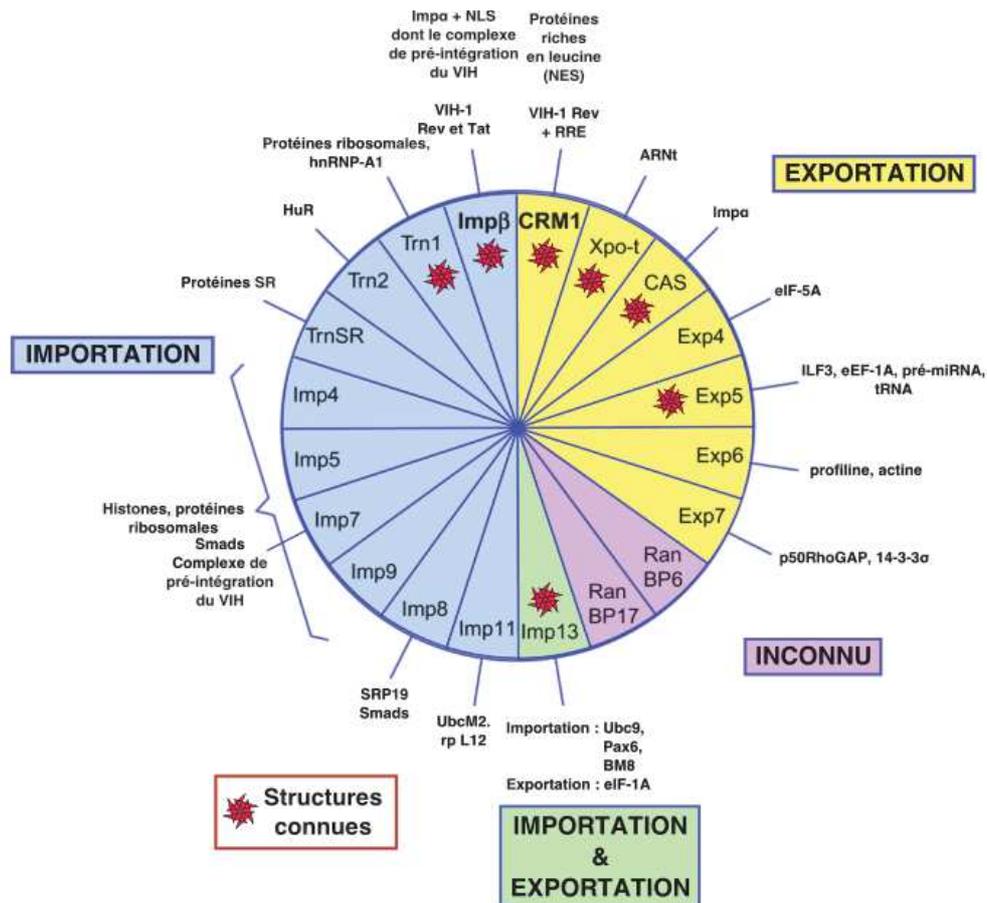


FIGURE 1.13 – **Protéines de l'import/export nucléaire.** Schéma présentant les différentes karyophérines humaines engagées dans l'importation nucléaire (en bleu), l'exportation nucléaire (en jaune) ou l'import/export nucléaires (en vert) ou dont le rôle est inconnu (en violet). Les principaux partenaires des karyophérines connues sont mis en évidence. Les protéines dont la structure a été résolue sont indiquées par une étoile rouge (*Adapté de Mosammaparast and Pemberton, 2004*).

Des structures cristallines ont été déterminées pour plusieurs karyophérines, isolées ou en complexe avec différents partenaires (pour revue : Stewart, 2007 ; Cook

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

and Conti, 2010). Ces protéines sont composée de 19 à 21 motifs répétés appelés répétitions HEAT (**Figure 1.14 (a)**). Cet acronyme fait référence aux premières protéines identifiées contenant ce type de motif : Huntingtin, Elongation Factor 3, la sous-unité PR65/A de la Protéine Phosphatase 2A et la kinase TOR1 (Andrade and Bork, 1995). Chaque motif HEAT comporte deux hélices, A et B, orientées de façon antiparallèle et reliées par une courte boucle (**Figure 1.14 (b)**). L'ensemble des répétitions HEAT adopte une structure super-hélicoïdale ressemblant à un anneau partiel ou total (**Figure 1.14 (c)**). Ces structures particulières sont également appelées de type solénoïdal (Kobe and Kajava, 2000). Les hélices A définissent la surface extérieure convexe du solénoïde, tandis que les hélices B forment la surface intérieure concave. De façon générale, la surface extérieure interagit avec des FG-Nups du NPC, tandis que les moitiés N- et C-terminales de la surface intérieure reconnaissent RanGTP et le cargo, respectivement.

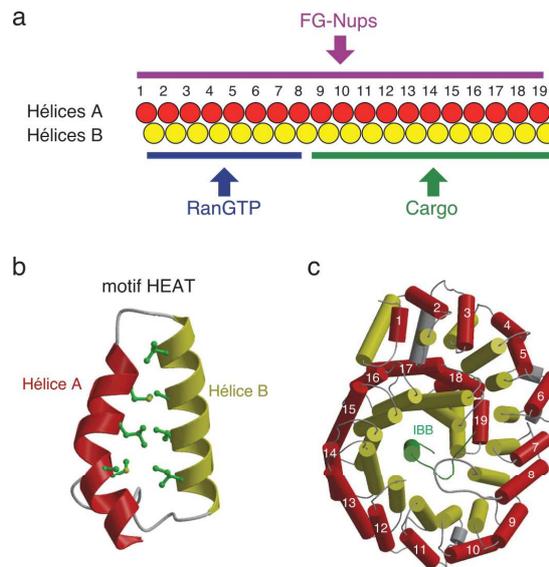


FIGURE 1.14 – **Structure des karyophérines- β .** (a) Schéma montrant l'organisation des karyophérines en répétitions HEAT et les régions d'interaction avec RanGTP, les FG-Nups et le cargo. (b) Structure d'un motif HEAT. (c) Structure d'Imp β en complexe avec le domaine IBB d'Imp α . Les hélices A sont en rouge et les hélices B en jaune.

RanGTP et le cargo interagissent avec les importines de manière mutuellement exclusive et avec les exportines de manière coopérative. Ces différents modes d'interaction, combinés avec le gradient de RanGTP, assurent la nature vectorielle du

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

transport nucléocytoplasmique. Ainsi, les importines reconnaissent leur cargo dans le cytosol, traversent le NPC et libèrent le cargo dans le noyau lorsqu'elles fixent RanGTP (**Figure 1.15**). En revanche, les exportines s'associent dans le noyau avec le cargo et avec RanGTP, formant ainsi un complexe ternaire qui traverse le NPC. Dans le cytosol RanGTP est dissocié des karyophérines par l'action de RanBP1 et leur réassociation est empêchée par l'action de RanGAP, qui provoque l'hydrolyse du GTP en GDP. RanGDP est recyclé par NTF2 dans le noyau, où RanGEF catalyse la conversion de Ran à sa forme liée au GTP.

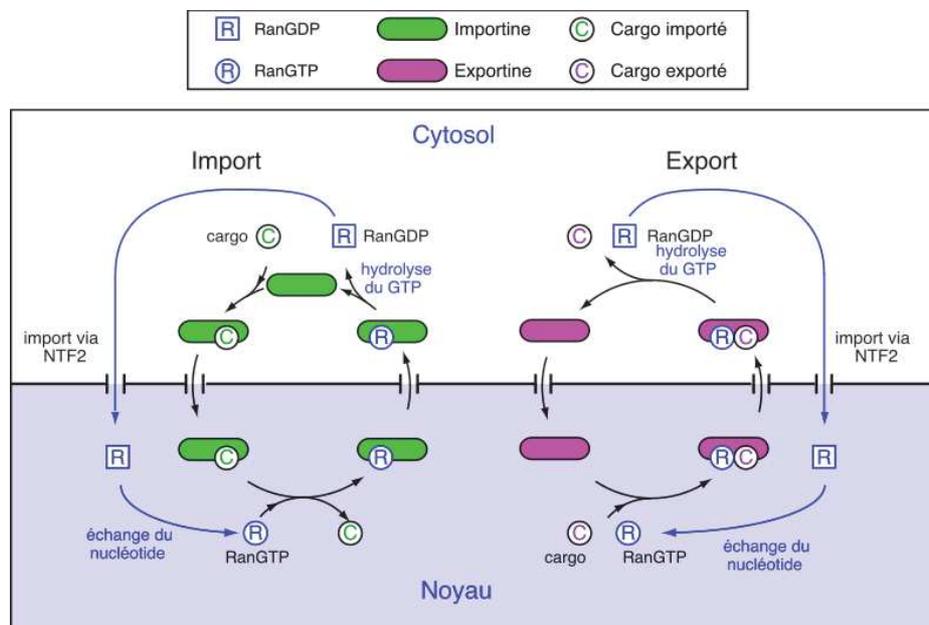


FIGURE 1.15 – Mécanismes d'import/export des cargos et rôle de Ran dans ce dynamisme.

1.3.5 Voie classique d'import nucléaire

La plupart des protéines possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) basique sont importées dans le noyau par la voie classique d'import nucléaire, impliquant le complexe formé par les protéines $Imp\alpha$ et $Imp\beta$ (Moroianu et al., 1995). $Imp\alpha$ est une protéine adaptatrice de 60 kDa. Elle interagit avec $Imp\beta$ par son domaine N-terminal IBB (*Imp β -Binding domain*) et avec le NLS du cargo par son domaine

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

C-terminal (**Figure 1.16** ; pour revue : Pumroy and Cingolani, 2015). Un NLS classique est composé d'une séquence riche en lysine et/ou en arginine. En fonction de la présence d'un ou deux clusters de résidus basiques, il est classifié respectivement de type "monopartite", tel que retrouvé dans l'antigène T du virus simien SV40 (PKKKRKV ; Kalderon et al., 1984) ou "bipartite", comme dans la nucléoplasmine (VKRPAATKKAGQAKKKKL ; Dingwall et al., 1988 ; Lange et al., 2007). La séquence consensus du NLS monopartite est $K - K/R - X - K/R$ et celle du NLS bipartite est $(K/R)_2 - X_{10-12} - (K/R)_{3-5}$ (Lange et al., 2007 ; Yang et al., 2010). Ces séquences peuvent être classifiées de manière légèrement différente, en particulier selon l'organisme (Kosugi et al., 2009 ; Marfori et al., 2011 ; Alvisi and Jans, 2015).

La structure d'Imp α sous forme d'apoprotéine ou en complexe avec des peptides NLS (Conti et al., 1998 ; Kobe, 1999), la structure d'Imp β liée à l'IBB d'Imp α (Cingolani et al., 1999) ainsi que des données biochimiques (Fontes et al., 2000 ; Fontes et al., 2003), ont révélé les détails moléculaires des interactions entre ces trois partenaires. Le domaine C-terminal d'Imp α , reconnaissant le NLS, est composé de 10 répétitions de type armadillo. Chaque répétition comprend une quarantaine de résidus et forme une structure ressemblant à un motif HEAT, sauf qu'il y a trois hélices (H1, H2 et H3) au lieu de deux : l'hélice A du motif HEAT correspond aux deux petites hélices H1 et H2 et l'hélice B correspond à H3. Les 10 répétitions armadillo forment une structure cylindrique super-hélicoidale, dont la surface concave présente un sillon caractérisé par une poche majeure et une poche mineure (**Figure 1.16**). En général Imp α utilise sa poche majeure pour reconnaître les NLS de type monopartite et les deux poches pour reconnaître ceux de type bipartite.

L'IBB d'Imp α est un domaine basique d'environ 50 résidus. Il interagit avec la surface concave d'Imp β par le biais de deux régions : une région étendue (résidus 11-23) qui interagit avec les répétitions HEAT 7-11, et une longue hélice (résidus 24-51) qui interagit avec les répétitions HEAT 12-19. Une partie de l'IBB qui ressemble aux NLS canoniques joue un rôle auto-inhibiteur en se liant au domaine C-terminal d'Imp α , empêchant ainsi la fixation des NLS exogènes (Kobe, 1999 ; Xu et al., 2010). Lorsqu'Imp β lie l'IBB, cette auto-inhibition n'est plus effective et le domaine C-terminal redevient disponible pour fixer un cargo (**Figure 1.16**).

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

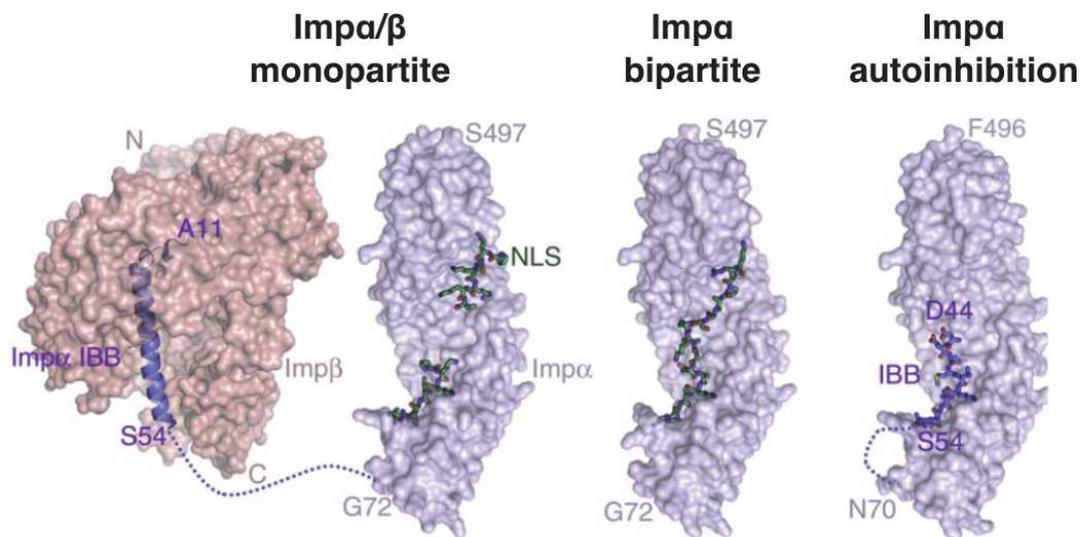


FIGURE 1.16 – Mécanisme canonal de reconnaissance du NLS médié par Imp α /Imp β . Les extrémités des protéines sont indiquées par les résidus terminaux et des numéros. Imp β entière (rose) se lie à l'IBB d'Imp α (hélice α bleue); PDB ID 1QGK. Les NLS canoniques mono ou bi partie (respectivement 1EJL et 1EJY) qui se lient à l'ARM d'Imp α sont représentés en vert et se lient à l'ARM d'Imp α (représentation de la surface en bleu). Imp α entière s'autoinhibe à l'aide d'un segment N-terminal, ressemblant au NLS (stick bleu), qui se lie au niveau de l'ARM d'Imp α et prohibe la fixation d'un NLS exogène sur Imp α ; PDB ID 1IAL. (Adapté de Xu et al., 2010).

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

De nombreux virus exploitent la voie classique d'importation nucléaire (Kobiler et al., 2012; Fulcher and Jans, 2011), comme par exemple le domaine PB2 de la réplicase du virus de la grippe (Boivin et al., 2010). Ce virus est responsable chaque année de lourdes pertes humaines et a fait plus de morts que la Première Guerre mondiale lors de l'émergence d'une des souches les plus virulentes de l'histoire, nommée "grippe espagnole".^{4 5}

La voie classique d'import nucléaire est également exploitée par le virus de la dengue, virus endémique dans certains pays du sud, mais dont le vecteur (moustique *Aedes*) commence à envahir le pourtour méditerranéen.⁶ En particulier, la protéine virale NS5 interagit avec le complexe $\text{Imp}\alpha/\text{Imp}\beta$ afin de pénétrer dans le noyau et d'accomplir son rôle dans l'établissement de la coiffe des ARN viraux, permettant ainsi au virus d'effectuer son cycle de réplication (Wagstaff et al., 2012; Fraser et al., 2014).

Le VIH est également un virus qui pirate la voie classique d'importation nucléaire. Par exemple le complexe d'intégration contenant l'ADN néo-rétrotranscrit peut interagir avec $\text{Imp}\alpha$ ou avec transportin 3 et ainsi pénétrer dans le noyau (Ao et al., 2010; Levin et al., 2010b).

1.3.6 Des cargos qui interagissent directement avec $\text{Imp}\beta$

De façon intéressante, certaines protéines n'utilisent pas la voie canonique d'import mais sont importées dans le noyau en interagissant directement avec $\text{Imp}\beta$. Ces protéines ont ainsi la capacité d'atteindre l'espace nucléaire sans l'intermédiaire d' $\text{Imp}\alpha$ (**Tableau 1.2**; Kobiler et al., 2012). C'est le cas par exemple de certaines histones, de la protéine adaptatrice Snurportin1, de la cycline B1, et de plusieurs facteurs de transcriptions comme AP-1, c-jun et CREB (Mühlhäusser et al., 2001; Baake et al., 2001; Le Roux and Moroiianu, 2003; Tableau 1.2). Plusieurs protéines virales interagissent directement avec $\text{Imp}\beta$, y compris, par exemple, la protéine

4. La perspective d'une autre catastrophe de même ampleur, ajoutée au lourd tribut de la grippe saisonnière, explique le fait que la grippe est, après le VIH, le deuxième virus le plus étudié dans le monde.

5. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>

6. <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/en/>

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

TABLEAU 1.2 – **Quelques cargos qui ont une interaction directe avec Imp β .** Les structures connues des complexes avec Imp β ou des protéines virales seules sont respectivement mis en évidence en bleu et violet.

Cargos	Référence(s)	Localisation du NLS	Autres karyophérines ayant un rôle dans l'import nucléaire
Cycline B1	Moore et al., 1999 Takizawa et al., 1999	inconnue	-
Snuportin1	Mitrousis et al., 2008 Huber et al., 2002	Résidus 1-65	
SRY	Forwood et al., 2001 Gontan et al., 2009	Résidus 120-138	Importin-13
PTHrP	Lam et al., 2001 Cingolani et al., 2002	Résidus 66-94	
CREB	Waeber and Habener, 1991 Forwood et al., 2001	Résidus 301-309	
TRF1	Forwood and Jans, 2002	Résidus 337-441	
HIV-1 Tat	Truant and Cullen, 1999	Résidus 49-60	
SREBP-2	Lee et al., 2003	Résidus 343-403	
Smad3	Xiao et al., 2000 Chuderland et al., 2008	Résidus 39-44 au minimum	Importin-7
HTLV-1 Rex	Palmeri and Malim, 1999	Résidus 1-81	
AP-1	Forwood et al., 2001	inconnue	
c-jun	Waldmann et al., 2007	Résidus 250-334	Transportin-1 Importin-5 Importin-7 Importin-9
HIV-1 Rev	Henderson and Percipalle, 1997 Truant and Cullen, 1999 Arnold et al., 2006	Résidus 35-46	Transportin-1 Importin-5 Importin-7
NF-YA	Kahle et al., 2005	Résidus 262-317	Transportin-1 Importin-5
Protéine pVII de l'adénovirus	Wodrich et al., 2006	Résidus 82-198	Transportin-1 Importin α/β Importin-7
H1	Jäkel et al., 1999 Bäuerle et al., 2002	Partie C-terminale	Importin-7
H2A, H2B, H3, H4	Mühlhäusser et al., 2001 Baake et al., 2001	inconnue	Importin α/β Transportin-1 Importin-5 Importin-7 Importin-9
HPV16 E6	Le Roux and Moroianu, 2003	Résidus 121-151	Importin α/β Transportin-1
SNAIL	Choi et al., 2014	Résidus 153-264	

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

pVII de l'adénovirus, la protéine oncogénique E6 des papillomavirus, les protéines Tat et Rev du VIH-1 et la protéine Rex du HTVL-1 (Le Roux and Moroianu, 2003 ; Wodrich et al., 2006 ; Cochrane et al., 1990 ; Truant and Cullen, 1999 ; Palmeri and Malim, 1999 ; Henderson and Percipalle, 1997 ; Arnold et al., 2006). La majorité de ces protéines possède un motif riche en résidus basiques (souvent appelé par le terme de NLS), et a la capacité d'interagir avec les acides nucléiques.

1.3.7 Import nucléaire de Rev : Imp β et/ou Transportin ?

Il a été montré que Rev est capable de lier directement plusieurs karyophérines- β pour pénétrer dans le noyau (**Figure 1.17** ; Truant and Cullen, 1999 ; Henderson and Percipalle, 1997 ; Arnold et al., 2006). En particulier, l'équipe allemande sous la direction de Ralph H. Kehlenbach publia des données de pull-down suggérant que la construction GST-Rev est capable de lier à la fois Imp β , Transportin-1, Transportin-5 et Transportin-7 (**Tableau 1.2** ; Arnold et al., 2006).

Une étude sur divers types cellulaires a confirmé que Rev peut être importé par Imp β ou par Transportin-1 en fonction de la lignée cellulaire (Gu et al., 2011). Cependant, de façon intéressante, dans des lignées de type lymphocytaire T (293T, Jurkat, et CEM), c'est Imp β qui semble être utilisée, tandis que dans les cellules HeLa et THP-1, c'est Transportin-1 qui est favorisée. J'ai décidé de limiter mes recherches sur l'étude et la caractérisation du complexe entre Imp β et Rev, pour sa majeure pertinence au cycle d'infection du VIH dans les lymphocytes T de l'hôte.

1.3.8 Structure et flexibilité conformationnelle d'Imp β

Chez les humains, Imp β comporte 876 résidus organisés en une répétition de motifs HEAT (Cingolani et al., 1999). De nombreuses structures d'Imp β ont été déterminées, soit sous forme isolée soit en complexe avec différents partenaires (Vetter et al., 1999a ; Lee et al., 2000 ; Bayliss et al., 2000b ; Cingolani et al., 2002 ; Bayliss et al., 2002b ; Lee et al., 2003 ; Lee et al., 2005 ; Forwood et al., 2008 ; Forwood et al., 2010 ; Bhardwaj and Cingolani, 2010 ; Choi et al., 2014). Les 18 structures déposées à ce

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

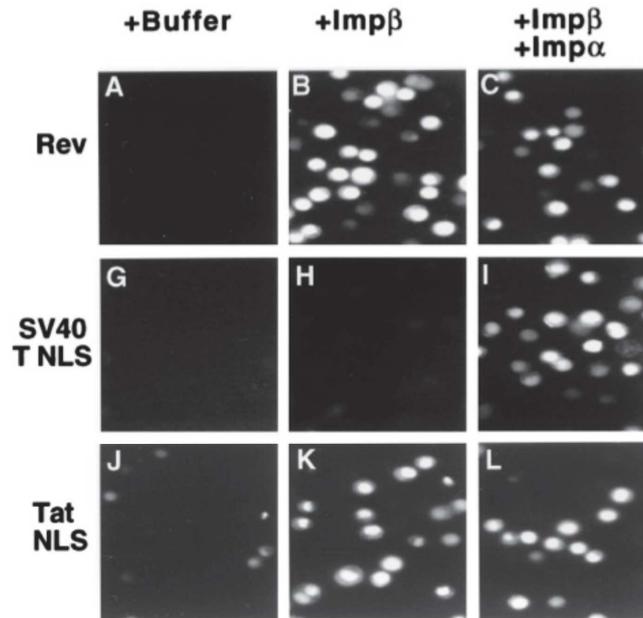


FIGURE 1.17 – Premières évidences que les protéines Rev et Tat du VIH-1 n'utilisent pas la voie classique d'import nucléaire. Expériences d'imports nucléaires *in vitro*. Les protéines Rev et Tat du VIH-1 n'ont pas besoin de la présence d'Imp α pour pénétrer dans le noyau à la différence du NLS canonique de l'antigène T du SV40. (Figure de Truant and Cullen, 1999).

jour dans la PDB sont résumées dans le **Tableau 1.3**. La plupart des structures provient d'Imp β humaine, dont certaines sont présentées sur la **Figure 1.18**. Ces structures ont révélé que Ran se lie à la surface intérieure d'Imp β et interagit principalement avec les répétitions HEAT 1-7 (Lee et al., 2005; Forwood et al., 2008), alors que des peptides mimétisant les FG-Nups du pore nucléaire interagissent avec les hélices A localisées à la surface extérieure du solénoïde (Bayliss et al., 2000b; Bayliss et al., 2002b).

La structure d'Imp β est connue en complexe avec quatre différents cargos, qu'elle reconnaît par sa surface intérieure : le domaine IBB d'Imp α , un domaine (aussi appelé IBB) du facteur de transport Snurportin1, le NLS de la protéine PTHrP (*Parathyroid Hormone-related Protein*) et les facteurs de transcription SREBP-2 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 2*) et Snail1 (références dans le **Tableau 1.3**). Cependant, Imp β utilise différentes régions pour reconnaître ces cargos : elle lie l'IBB par les répétitions HEAT 7-19, le NLS de PTHrP par les répétitions 2-11,

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

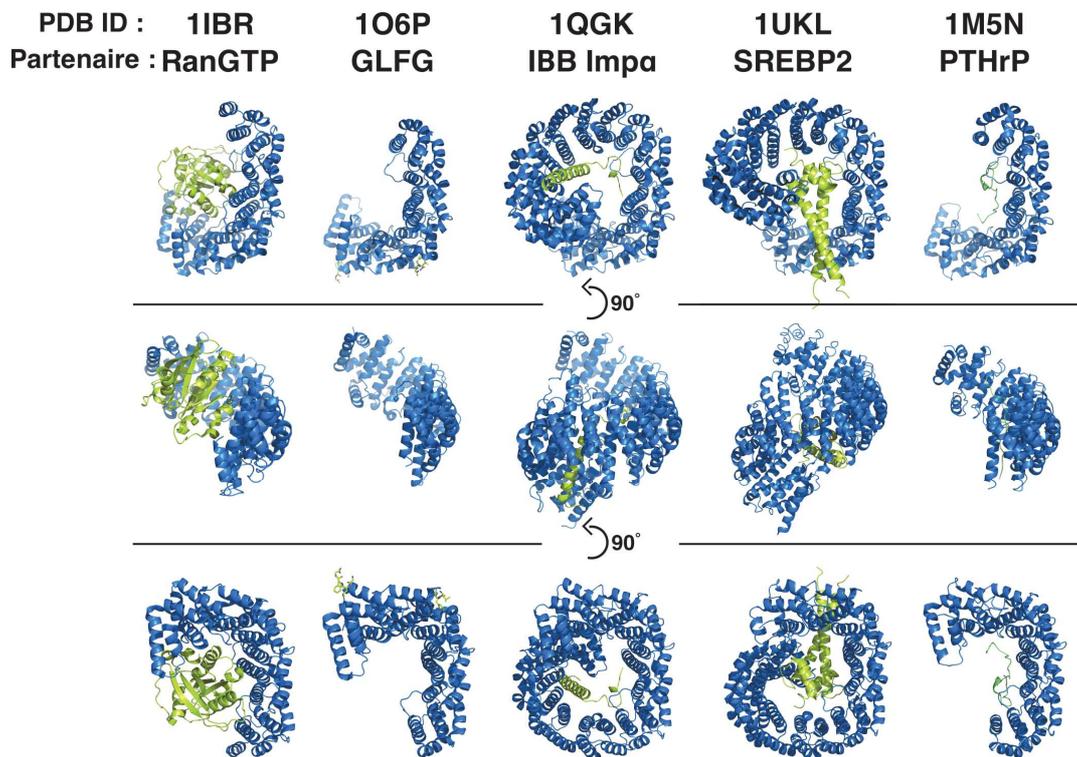


FIGURE 1.18 – Quelques structures d'Imp β en complexe. Représentation sous forme de cartoon d'Imp β (en bleu) et de différents partenaires (en vert). Les trois structures de droite sont Imp β en complexe avec différents cargos.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.3. L'IMPORT/EXPORT NUCLÉAIRE DE CARGOS

TABLEAU 1.3 – **Résumé de structures cristallines d'Imp β .** Sauf indication contraire ces structures comportent la chaîne polypeptidique d'Imp β entière.

Imp β	Partenaire	Résolution (Å)	PDB	Molécules/unité asym.	Chaîne Imp β :Partenaire	Référence
Forme isolée						
souris (rés. 1-449)	aucun	2.6	1GCJ	2	A, B	Lee et al., 2000
levure	aucun	2.4 Å	3ND2	1	A	Forwood et al., 2010
Impβ+Ran						
humain (rés. 1-462)	RanGppNHp	2.3	1IBR	2	B:A, D:C	Vetter et al., 1999a
levure	RanGTP	2.7	2BKU	2	B:A, D:C	Lee et al., 2005
levure	RanGDP	2.5	3EA5	2	B:A, D:C	Forwood et al., 2008
Impβ+FG						
humain (rés. 1-442)	Nsp1p (FxFG)	2.8	1F59	2	A:C, B:D	Bayliss et al., 2000b
humain (rés. 1-442)	peptide GLFG	2.8	1O6O	3	A:D, B:F, C:E	Bayliss et al., 2002b (forme cristalline 1)
humain (rés. 1-442)	peptide GLFG	2.8	1O6P	2	A:(D+E), B:(C+F)	Bayliss et al., 2002b (forme cristalline 2)
levure	Nup1p	1.99	2BPT	1	A:B	Liu et al., 2005
Impβ+cargo						
humain	Imp α -IBB	2.5	1QGK	1	A:B	Cingolani et al., 1999 (forme cristalline 1)
humain	Imp α -IBB	2.3	1QGR	1	A:B	Cingolani et al., 1999 (forme cristalline 2)
humain (rés. 127-876)	Snurportin1-IBB	2.84	2QNA	1	A:B	Wohlwend et al., 2007
humain	Snurportin1-IBB	2.35	2P3Q	1	A:B	Mitrousis et al., 2008 (forme cristalline 1)
humain	Snurportin1-IBB	3.20	2Q5D	2	A:C, B:D	Mitrousis et al., 2008 (forme cristalline 2)
humain	Snurportin1-IBB	3.15	3LWW	2	A:B, C:D	Bhardwaj and Cingolani, 2010
humain (rés. 1-485)	PTHrP NLS	2.9	1M5N	1	S:Q	Cingolani et al., 2002
souris	SREB-2	3.0	1UKL	2	A:(C+D), B:(E+F)	Lee et al., 2003
humain	Snail1	2.6 Å	3W5K	1	A:B	Cho et al., 2014

CHAPITRE 1. INTRODUCTION
1.4. OBJECTIF DE LA THÈSE

SREBP-2 par les répétitions 7-17 et Snail1 par les répétitions 4-14 (Cingolani et al., 1999; Cingolani et al., 2002; Lee et al., 2003; Choi et al., 2014). De plus, Imp β adopte différentes conformations dans ces complexes : elle est plutôt compacte en complexe avec les domaines IBB d'Imp α et de Snurportin1, et plutôt étendue en complexe avec SREBP-2 et Snail1 (**Figure 1.19**). Ces différences structurales soulignent une flexibilité conformationnelle qui caractérise tous les membres de la famille karyophérine- β (Fukuhara et al., 2004; Zachariae and Grubmüller, 2008; Forwood et al., 2010; Kappel et al., 2010; Halder et al., 2015).

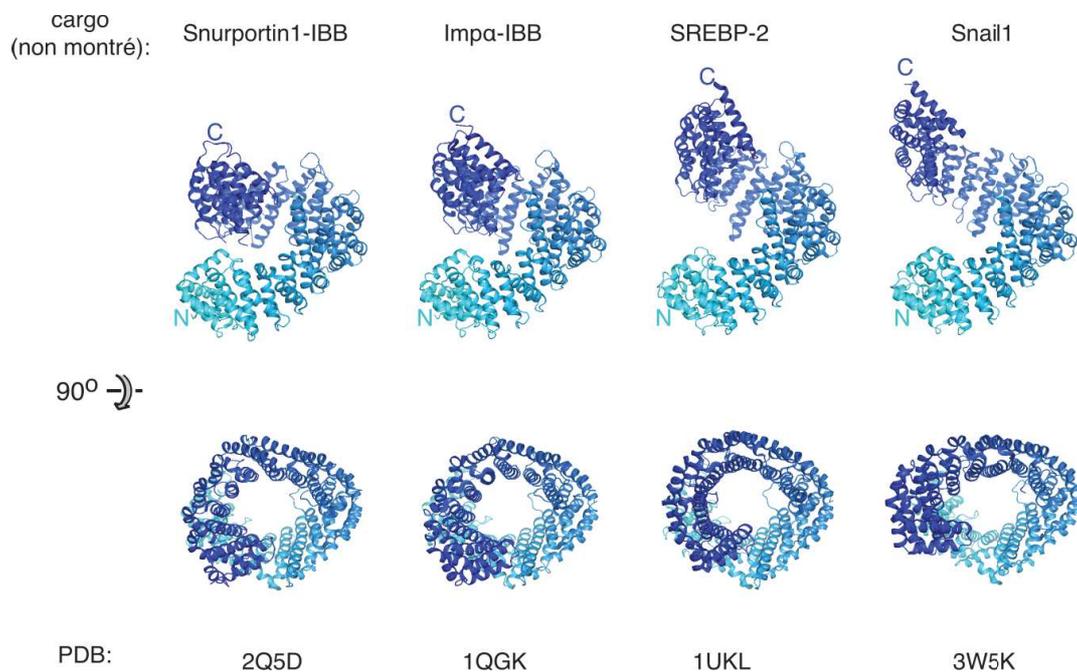


FIGURE 1.19 – **Comparaison de structures d'Imp β en complexe avec différents cargos.** La conformation des répétitions HEAT est plus compacte en complexe avec l'IBB de Snurportin1 et d'Imp α et plus étendue en complexe avec SREBP-2 et Snail1.

1.4 Objectif de la thèse

L'importance de Rev dans la réplication du VIH-1, de par ses interactions avec la machinerie de transport nucléocytoplasmique de la cellule hôte, fait de cette protéine une cible potentielle pour développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.4. OBJECTIF DE LA THÈSE

Le but de cette thèse est d'élucider les bases structurales de l'import nucléaire de Rev. Plus précisément, l'objectif est d'obtenir des informations structurales sur Rev en complexe avec Imp β , la karyophérine qui importe Rev dans les lymphocytes T, cible cellulaire cruciale du VIH-1.

Idéalement, nous souhaitons déterminer la structure du complexe Imp β /Rev à haute résolution, afin de visualiser les interactions entre ces deux protéines au niveau atomique. La réalisation de cet objectif aboutirait à une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire par lequel Rev est importé dans le noyau et de ce fait, ferait progresser nos connaissances fondamentales sur le cycle d'infection virale. A plus long terme, la structure du complexe Imp β /Rev permettrait de vérifier si le développement d'antirétroviraux ciblant l'import nucléaire de Rev est un objectif réalisable, et dans ce cas faciliterait la découverte de molécules inhibant cette étape.

Chapitre 2

Résultats

2.1 Choix de stratégie pour la purification d'Imp β /Rev

L'objectif étant de cristalliser le complexe Imp β /Rev, mes premiers efforts ont été portés sur la co-expression et la co-purification d'Imp β avec Rev dans un vecteur approprié (pETDuet ; cf. Annexe C). J'ai utilisé une construction d'Imp β sans étiquette et une construction de Rev contenant une étiquette polyhistidine N-terminale, tronquée en C-terminale (69 résidus au lieu de 116 pour la protéine entière) et incorporant les mutations L12S et L60R. Cette construction, qui favorise une forme dimérique de la protéine, a déjà pu être cristallisée dans sa forme isolée (Daugherty et al., 2010b).

Mes tentatives de co-purification sur colonne de nickel (Ni-NTA) n'ont pas été concluantes : alors que Rev était présent dans la fraction éluée, très peu d'Imp β était détectée, suggérant que le complexe Imp β /Rev purifié était loin d'avoir un ratio 1 : 1 (**Figure 2.1**). Ces conditions ne sont donc pas optimales pour copurifier les deux protéines en complexe. Parallèlement, il peut être noté que cette construction de Rev (≈ 8.4 kDa), comme toutes les autres constructions de Rev, migre sur gel dénaturant à un poids moléculaire apparent nettement plus élevé que le poids moléculaire théorique. Ce phénomène peut être dû au caractère très basique de la protéine (pI = 11.6 pour Rev₁₋₆₉, pI = 8.8 Rev₁₁₆).

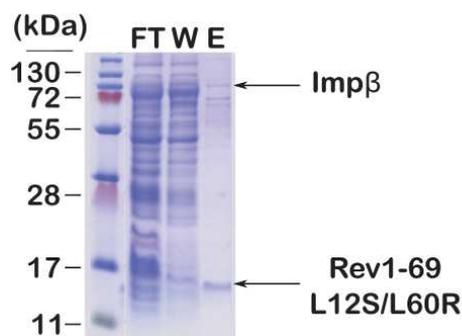


FIGURE 2.1 – **Co-expression de Rev1-69 L12S/L60R et Imp β** . Fractions de la purification d'affinité Ni-NTA analysées sur gel dénaturant (12% acrylamide). Il est montré le filtrat (FT), le lavage (W) et l'éluat (E).

Suite aux échecs répétés, j'ai décidé de changer de stratégie et de purifier les protéines séparément, puis de reconstituer le complexe et réaliser différentes tentatives de cristallogenèse.

2.2 Purification d'Imp β

2.2.1 Protocole initial de purification

Historiquement dans le laboratoire, Imp β était isolée sans étiquette à l'aide d'une étape de purification d'affinité avec une résine contenant Imp α immobilisée sur une résine de Sepharose. Cette stratégie avait été utilisée pour obtenir la structure du complexe entre Imp β et le domaine IBB d'Imp α (Cingolani et al., 1999). Un schéma simplifié de la purification d'Imp β à l'aide d'Imp α est montré dans la **Figure 2.2 (a)**.

J'ai préparé une résine de Sepharose réticulée avec Imp α (cf. 4.2.2, page 134), et je l'ai ensuite utilisée pour purifier Imp β . Après lyse des cellules exprimant Imp β , la fraction soluble a subi une étape de précipitation au sulfate d'ammonium. Après resolubilisation dans un tampon faiblement chargé en sel, Imp β a été incubé avec Imp α immobilisée sur la colonne. Après une étape de lavage, l'éluat d'Imp β a été réalisé à l'aide d'un tampon contenant du MgCl₂ à forte concentration (**Figure**

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.2. PURIFICATION D'IMP β

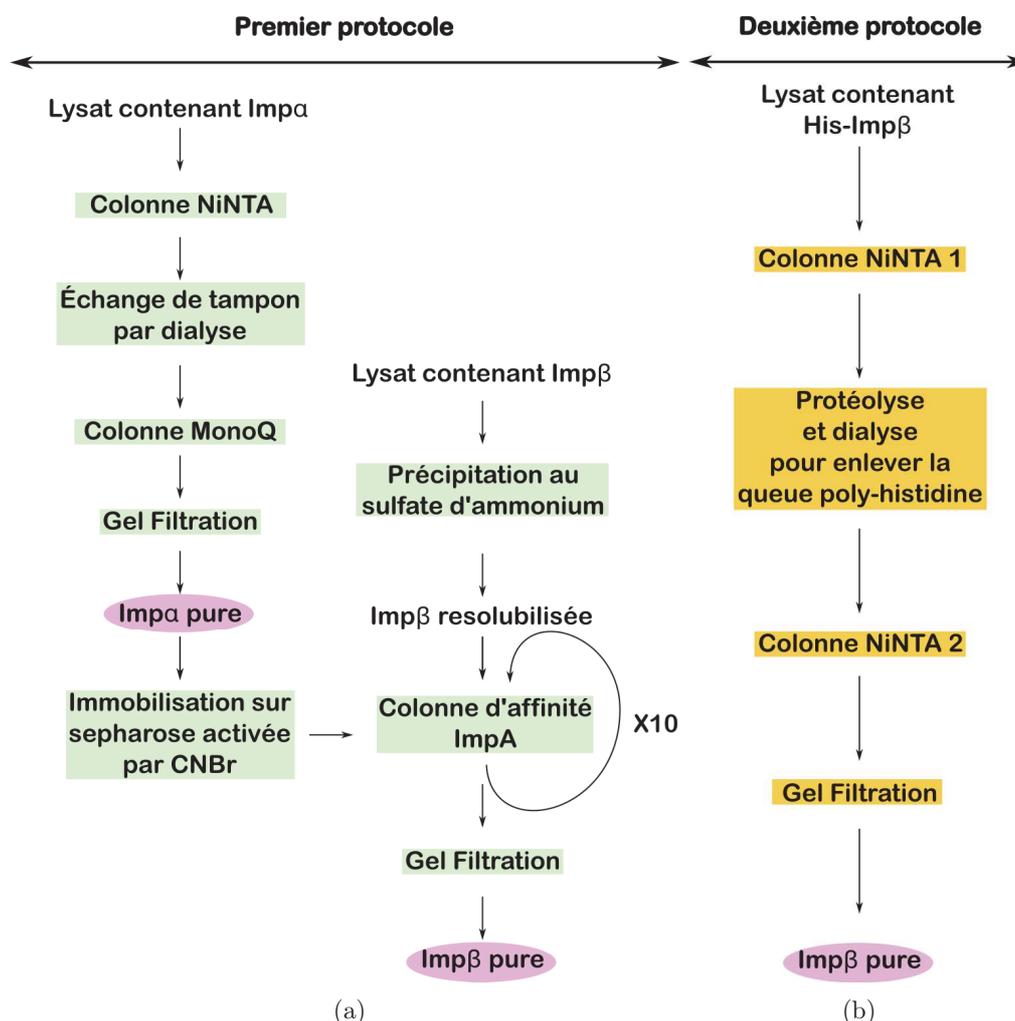


FIGURE 2.2 – Schéma de l'ancien protocole de purification d'Imp β (a) comparé au nouveau (b). Les différentes étapes de purification permettant d'obtenir la protéine Imp β pure à partir des lysats bactériens sont indiquées.

2.3), puisque les ions Mg $^{2+}$ déstabilisent les interactions électrostatiques entre le domaine IBB d'Imp α (basique) et la surface acide d'Imp β . Plusieurs cycles d'incubation avec Imp β et d'élution ont été nécessaires pour purifier Imp β en quantité suffisante, du fait que la résine avait une capacité limitée. (Figure 2.3 (a)). La purification d'Imp β est suivie par une étape de chromatographie d'échange d'anions (Figure 2.3 (b)) et d'une gel filtration afin d'éliminer respectivement les agrégats solubles et les contaminants (Figure 2.3 (c)). Ce protocole de purification a permis

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.2. PURIFICATION D'IMP β

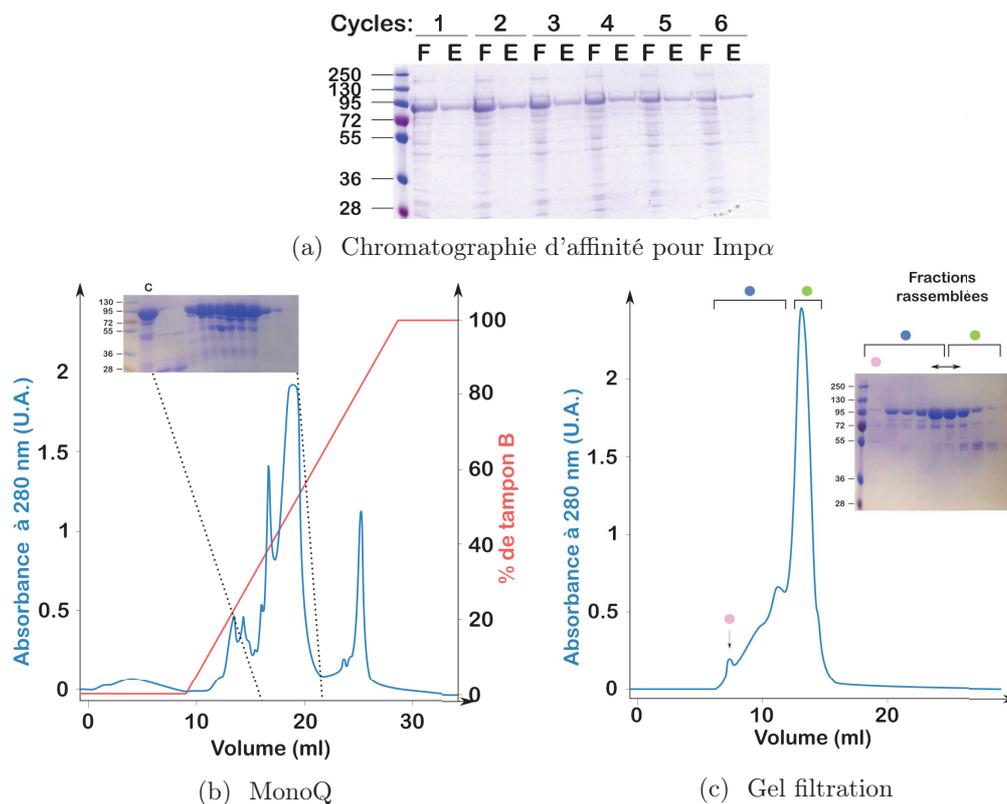


FIGURE 2.3 – Purification d'Imp β à l'aide d'Imp α (a) Gel dénaturant où a été déposé le produit de 6 cycles de la première étape par affinité. Pour chaque cycle, le filtrat (F) et l'éluat (E) ont été déposés. (b) Chromatogramme et gel dénaturant de l'étape de purification utilisant une résine échangeuse d'anions (MonoQ). Le mélange protéique injecté dans la colonne (C) est également indiqué sur le gel. (c) Étape de gel filtration. La fraction correspondant au volume mort est indiquée par un rond rose. Les fractions rassemblées et conservées sont indiquées par la flèche. Les agrégats et les formes multimériques d'Imp β sont indiquées par un rond bleu, la forme monomérique supposée d'Imp β est indiquée par un rond vert.

d'obtenir entre 2 et 4 mg d'Imp β par litre de culture.

2.2.2 Amélioration du protocole

Le protocole de purification d'Imp β précédemment décrit n'était pas idéal puisque nous n'étions pas sûrs de bien séparer les formes agrégées ou multimériques d'Imp β de sa forme monomérique (**Figure 2.3 (c)**). J'ai donc choisi d'ajouter sur Imp β une étiquette histidine ainsi qu'un site de clivage à la protéase TEV dans le but d'augmenter le degré d'homogénéité de la protéine.

La nouvelle purification d'Imp β nécessite plusieurs étapes de chromatographie (**Figure 2.2 (b)**). La première est une étape d'affinité Ni-NTA. Cette étape permet de récupérer Imp β , mais de nombreux contaminants sont toujours présents (**Figure 2.4 (a)**). Après incubation avec la protéase TEV pour éliminer l'étiquette histidine, la solution contenant Imp β est à nouveau chargée sur la résine Ni-NTA afin de retenir spécifiquement la protéase TEV (contenant une étiquette poly-histidine), l'étiquette poly-histidine clivée ainsi que la protéine de fusion His-TEV-ImpB qui n'avait pas été digérée (**Figure 2.4 (b)**). La protéine Imp β dépourvue de son étiquette poly-histidine est alors retrouvée dans le filtrat.

Très peu d'Imp β est détectée dans l'éluat après le deuxième passage sur la résine Ni-NTA montrant une bonne efficacité de clivage (**Figure 2.4 (d)**). Une dernière étape de gel filtration permet d'éliminer les agrégats solubles qui sortent près du volume mort de la colonne (**Figure 2.4 (c) et (d)**). Ce protocole permet d'obtenir entre 50 et 60 mg d'Imp β pour 12 litres de milieu de culture. C'est un meilleur rendement que le protocole utilisant la résine de Sepharose-Imp α . En utilisant les techniques MALDI et ESI en spectrométrie de masse, j'ai confirmé que la masse de la protéine purifiée correspondait à celle d'Imp β entière (les spectres sont présentés dans l'Annexe D, page 192). L'analyse par MALDI a aussi révélé une espèce minoritaire d'Imp β sous forme dimérique. Ce dimère ne semble pas être un artefact (voir plus loin les données de SEC/MALLS ; 2.4.2 , page 53).

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

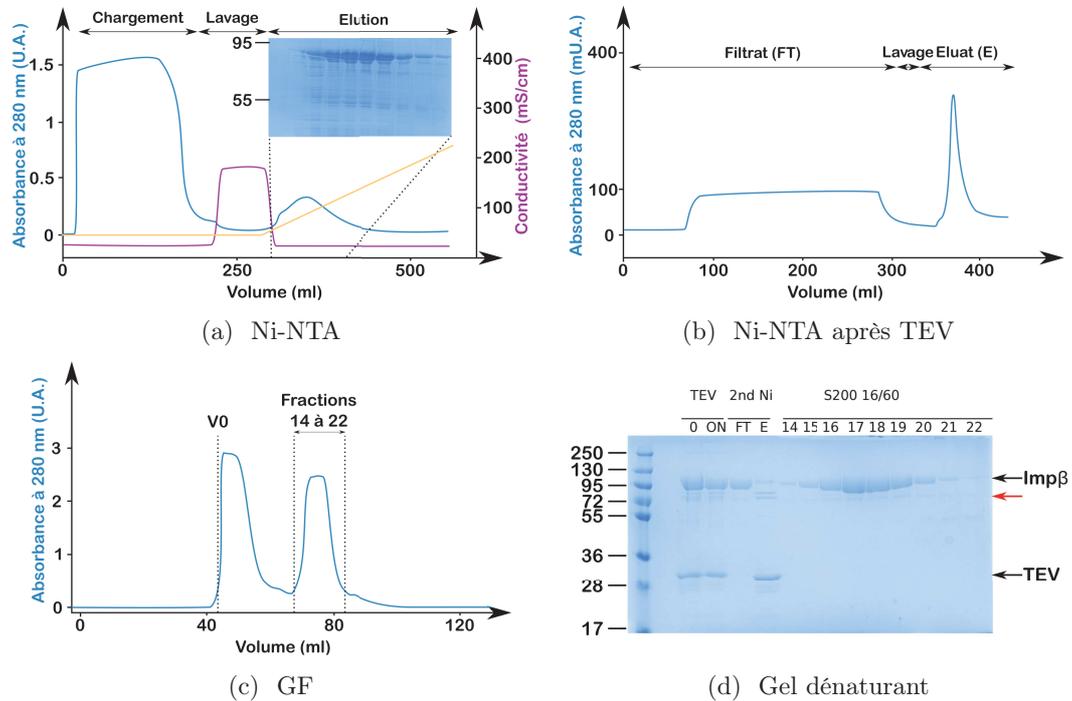


FIGURE 2.4 – **Purification d'Imp β à l'aide d'une étiquette histidine.** (a) Chromatogramme et gel dénaturant de la première étape de purification de His-ImpB sur colonne Ni-NTA. Le gradient du tampon d'éluat est indiqué en orange. (b) Chromatogramme d'Imp β après clivage de l'étiquette histidine à l'aide de la protéase TEV. (c) Gel filtration d'Imp β . Les fractions collectées sont indiquées ainsi que le volume mort (V0). (d) Gel dénaturant des étapes de fin de purification d'Imp β . Sont présents sur le gel : le traitement à la protéase TEV (TEV) au début de la réaction (0) et après une nuit (ON) ; les fractions d'Imp β de la deuxième chromatographie d'affinité Ni-NTA (2nd Ni), c'est-à-dire le filtrat (FT) et l'éluat (E) ; les différents échantillons provenant de gel filtration (S200 16/60). La flèche rouge correspond à un contaminant ou produit de dégradation d'Imp β .

2.3 Rev peut être purifié dans une forme monomérique

2.3.1 Premières tentatives de purification de Rev isolé

La purification de Rev recombinant sous forme sauvage présente deux obstacles importants. Le premier est que Rev se lie fortement à des acides nucléiques (contami-

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

nants bactériens) de part le nombre important de résidus basiques dans le motif riche en arginine (*Arginine Rich Motif* (ARM)). Le deuxième est sa tendance à s'agréger ou à précipiter, très probablement à cause des résidus hydrophobes responsables de la multimérisation de Rev.

Dans un premier temps, j'ai décidé de suivre un protocole de purification de Rev publié en 2009 (Marenchino et al., 2009). Ce protocole comprend une dénaturation chimique de Rev suivie par une étape de renaturation sur colonne. J'ai testé ce protocole avec une construction disponible au laboratoire comprenant une étiquette poly-His fusionnée à la protéine fluorescente verte (GFP), un site de clivage à la protéase TEV et la protéine Rev. Le protocole de purification est résumé dans la **Figure 2.5** et les résultats d'une purification typique sont présentés dans la **Figure 2.6**. Comme le montre la **Figure 2.6 (a)**, la protéine His-GFP-Rev est récupérée dans une forme très pure après la première colonne d'affinité Ni-NTA. Cependant après clivage à la protéase TEV, les protéines Rev et His-GFP-Rev sont toutes les deux présentes dans le filtrat et l'éluat de la deuxième colonne Ni-NTA, alors qu'on s'attend à avoir Rev dans le filtrat et His-GFP-Rev dans l'éluat. L'hypothèse est que cela serait dû à une agrégation de Rev : l'association de Rev libre à des molécules His-GFP-Rev pourrait donner des espèces moléculaires qui se trouvent dans l'éluat ou dans le filtrat selon que la queue poly-His est stériquement accessible ou non. Cette hypothèse pourrait être corrélée avec une très forte précipitation de Rev observée pendant l'étape de clivage à la protéase TEV (**Figure 2.6 (b)**).

De façon intéressante, après une étape de concentration et de gel filtration, le pic majoritaire ne contient que Rev (**Figure 2.6 (c)**). Le pic minoritaire contient His-GFP-Rev (données non montrées), mais sa faible concentration suggère que cette protéine a probablement précipitée pendant l'étape de concentration. Malheureusement le pic contenant Rev sort à un volume correspondant au volume mort de la colonne, indiquant que Rev est très probablement sous forme d'agrégats solubles, une forme peu idéale pour les études biophysiques et structurales que nous souhaitons réaliser.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

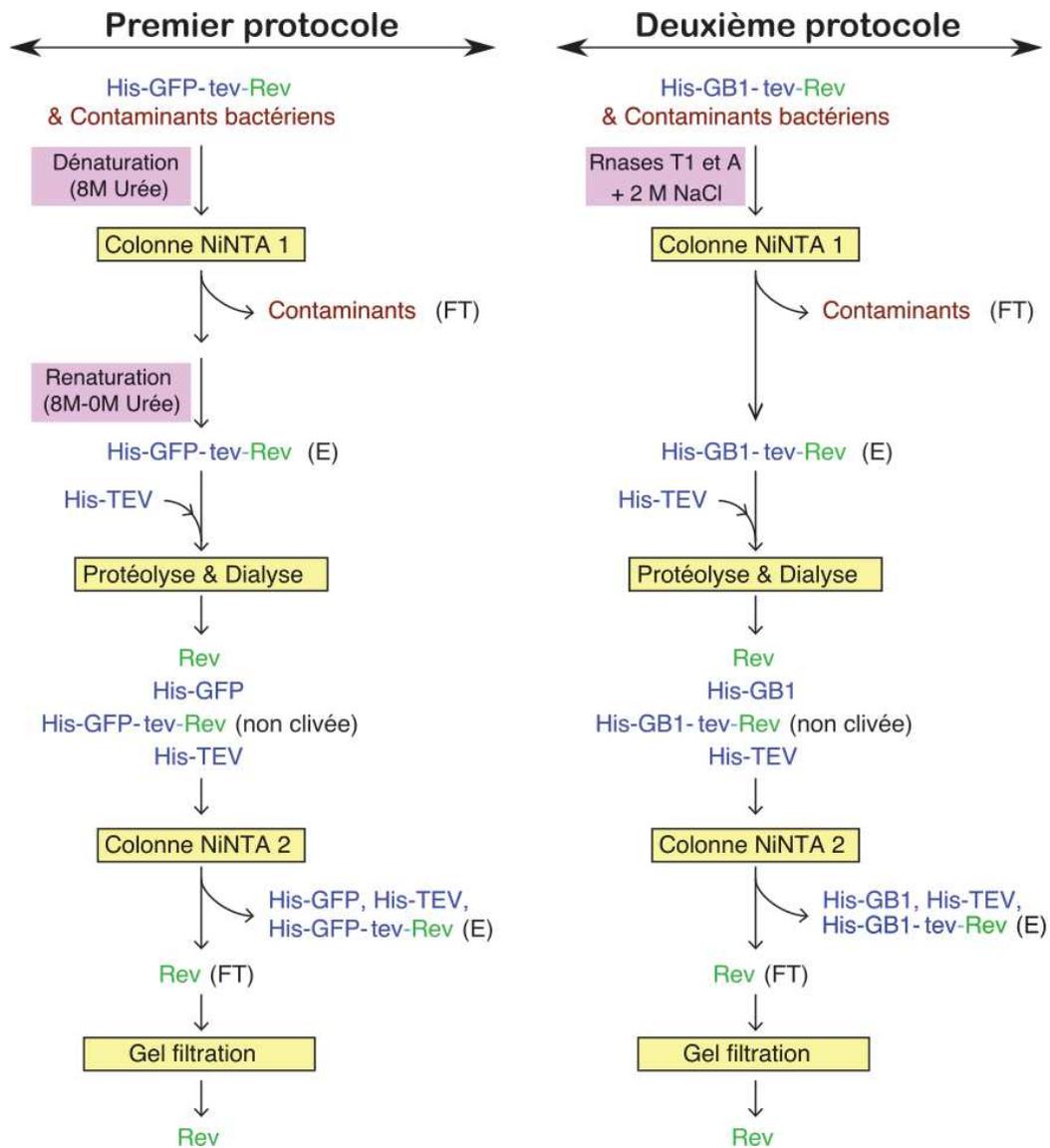


FIGURE 2.5 – Schéma des protocoles de purification de Rev. Protocole utilisant fusion de Rev avec la GFP, contenant des étapes de dénaturation et renaturation (à gauche). Protocole utilisant une fusion de Rev avec le domaine GB1, contenant une étape de dégradation de l'ARN bactérien dans un tampon de charge ionique importante (à droite).

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

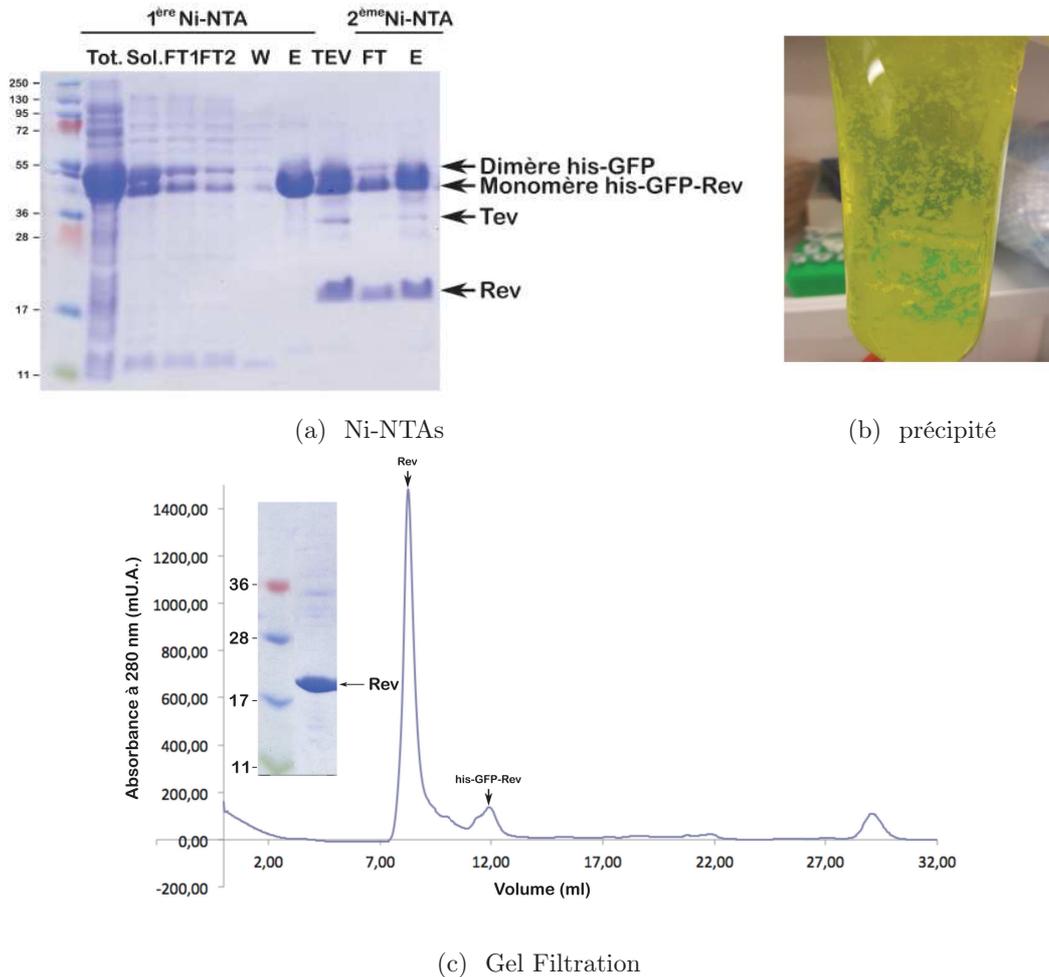


FIGURE 2.6 – **Première stratégie (infructueuse) de la purification de Rev.** (a) Analyse par gel dénaturant (15% acrylamide) des différentes étapes de purification par colonne d'affinité Ni-NTA : lysat total (tot.), lysat soluble (Sol.), divers filtrats (FT), lavage (W), elutions (E) et le produit de la protéolyse catalysée par la protéase TEV sur la nuit. (b) Exemple de précipité de Rev pouvant être obtenu lors d'une dialyse sur la nuit. L'interprétation de ce gel est compliquée par la présence d'une bande d'un poids moléculaire de ≈ 52 kDa, que nous avons attribué à une forme dimérique de GFP (54 kDa), dont la queue His semble être dégradée ou inaccessible au cours de la première étape Ni-NTA, mais est fonctionnelle au cours de la deuxième. (c) Gel filtration S75 10/300 GL montrant la séparation de Rev et de His-GFP-Rev.

2.3.2 Deuxième protocole de purification de Rev

Etant donné que le protocole de dénaturation/renaturation n'a pas permis d'obtenir Rev sous forme monodisperse, j'ai décidé d'exploiter une stratégie alternative

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

publiée en 2010 qui consiste à fusionner une étiquette GB1 à Rev (Daugherty et al., 2010a). L'étiquette GB1 est le domaine B1 de la protéine G issue de *Streptococcus pneumoniae* et fait partie d'un groupe d'étiquettes appelées *solubility-enhancement tags* (SETs) qui augmentent la solubilité de la protéine à laquelle elles sont fusionnées (Zhou and Wagner, 2010). La surface très acide du domaine GB1 semble stabiliser Rev en interagissant avec les résidus basiques de celle-ci. Un protocole de purification de GB1-Rev avait été mis à point par une étudiante thésarde de notre équipe, Mizar Oliva, dans le cadre de ses études du RRE en complexe avec Rev. Pour ce faire Mizar a réalisé une construction qui comprend à l'extrémité N-terminale une queue polyhistidine fusionnée au domaine GB1, un site de clivage à la protéase TEV, et Rev de type sauvage. Afin de favoriser une forme monomérique ou dimérique de Rev, j'ai introduit respectivement la double mutation V16D/I55N ou la simple mutation V16D (Jain and Belasco, 2001).

Ce nouveau protocole implique une première étape de traitement du lysat clarifié avec des RNases (afin de dégrader les ARNs bactériens) en présence d'une forte concentration en sels. Une étape de chromatographie par affinité Ni-NTA permet ensuite d'isoler la protéine His-GB1-Rev. Le fragment His-GB1 est éliminé lors d'une étape de coupure à la protéase TEV suivie d'une deuxième colonne Ni-NTA. Enfin, une étape de gel filtration permet d'obtenir une forme de Rev^{V16D/I55N} non-étiquetée relativement pure. Les différentes étapes de purification de Rev^{V16D/I55N} avant et après clivage à la TEV sont montrées dans la **Figure 2.7**. À la différence du protocole précédent, nous ne constatons pas d'anomalie particulière dans ces résultats. En effet, la fusion GB1-Rev (flèche rose) semble parfaitement clivée et Rev est quasiment pure dans le filtrat de la deuxième chromatographie d'affinité Ni-NTA (flèche verte).

La **Figure 2.8** compare les résultats de gel filtration obtenus par Mizar Oliva pour Rev^{WT} avec ceux que j'ai obtenu pour Rev^{V16D/I55N}. Dans le cas du Rev^{WT}, la majorité de la protéine élue dans le volume mort de la colonne (**Figure 2.8 (a)**). Le profil d'élution de cette protéine est étrange puisque la protéine est éluee sur l'ensemble des fractions collectées. Ce phénomène suggère que Rev existe en solution sous forme de différents degrés d'oligomérisation ou interagit avec la résine de la colonne.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

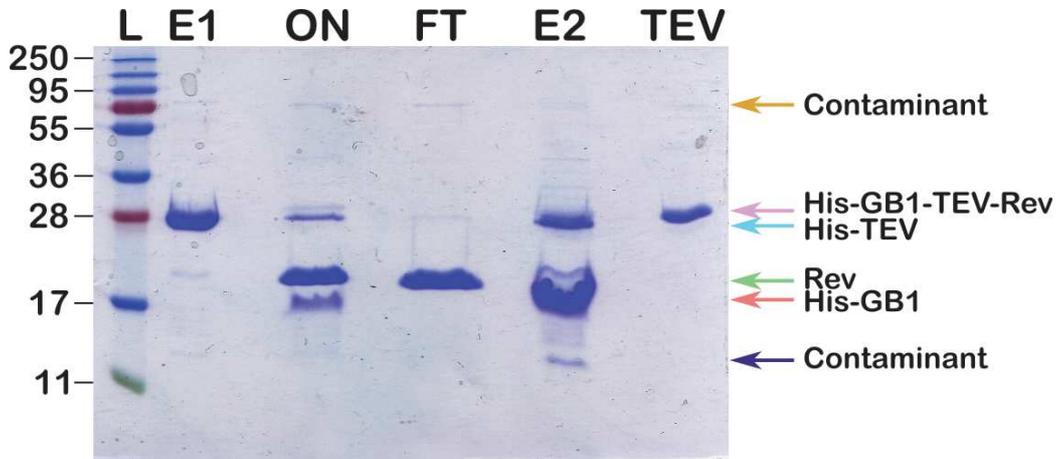


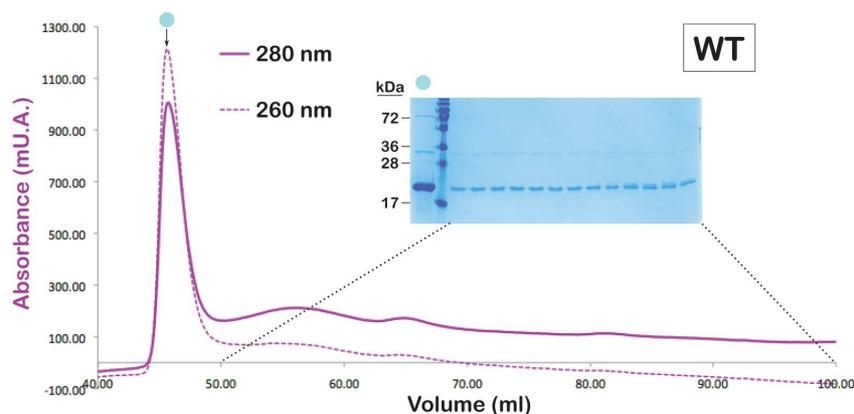
FIGURE 2.7 – Gel dénaturant des chromatographies d'affinités Ni-NTA de $Rev^{V16D/I55N}$. Gel dénaturant analysant l'élu de la première et de la deuxième Ni-NTA (E1 et E2), le produit de l'incubation avec la protéase TEV sur la nuit (ON) et un échantillon de la protéase TEV pure (TEV). Dans le filtrat (FT) de cette étape de purification, il reste un peu de protéase TEV ainsi qu'une protéine contaminante ayant un poids moléculaire d'environ 80 kDa (flèche orange). Sur gel dénaturant, la flèche rouge semble correspondre à la partie His-GB1 avec la partie N-terminale du site de clivage par la protéase TEV (résidus ENLYFQ). La flèche bleue montre une protéine contaminante qui pourrait correspondre à un contaminant ou un produit de dégradation. Cette protéine semble être retenue par la deuxième chromatographie d'affinité Ni-NTA, elle ne représente donc pas de problème pour obtenir une protéine Rev pure. Fourni par Mizar Oliva.

Dans le cas de $Rev^{V16D/I55N}$, le volume d'élu (82 ml) correspond à un rayon hydrodynamique cohérent avec celui d'une forme monomérique (**Figure 2.8 (b)**). Cette protéine est obtenue en forme très pure, à l'exception d'une petite bande de taille inférieure à Rev et qui semble correspondre à un produit de dégradation de Rev.

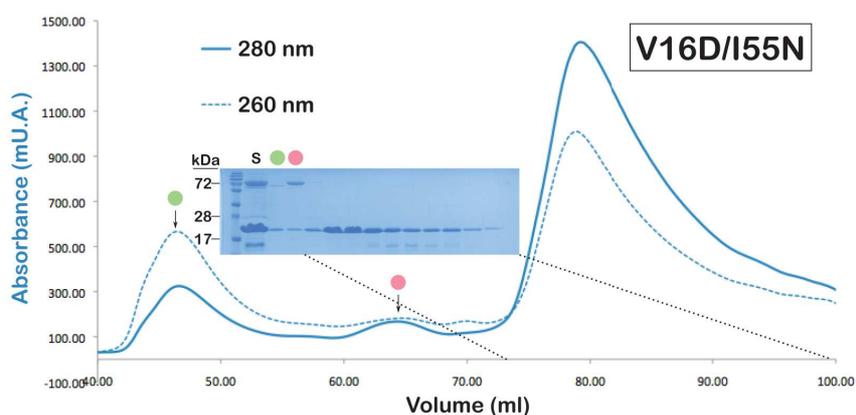
Nous avons vérifié par des spectromètres MALDI et ESI la qualité de Rev. Ce dernier est intact et de bonne qualité (cf. Annexe E, page 195). Le spectre MALDI révèle une quantité infinitésimale de dimère de $Rev^{V16D/I55N}$, tandis que le spectre ESI présente une espèce minoritaire de Rev qui semble oxydé à du β -mercaptoéthanol. Pour résumer, l'utilisation de ce nouveau protocole et des mutations V16D/I55N, a permis d'obtenir une protéine monodisperse par gel filtration, permettant de réaliser les études biophysiques et biochimiques décrites ci-dessous.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE



(a) WT



(b) V16D/I55N

FIGURE 2.8 – **Stratégie de purification de Rev.** Chromatogrammes des gel filtrations Superdex S75 16/60 obtenus pour Rev (WT et mutant V16D/I55N). Les courbes pleines correspondent à la DO_{280} , les courbes pointillées à la DO_{260} . Les droites en pointillés indiquent les fractions analysées sur gels électrophorétiques. Les cercles colorés permettent de mettre en évidence certaines fractions analysées sur gel dénaturant (SDS 15%). (a) Profil obtenu avec Rev^{WT}. (b) Profil obtenu avec Rev^{V16D/I55N}.

2.3.3 Analyse de Rev par SEC/MALLS

Afin de vérifier l'état oligomérique de nos différentes constructions de Rev, nous avons réalisé des expériences de SEC/MALLS. Par cette technique, l'échantillon est chargé sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (SEC) et l'éluat est

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

analysé par diffusion de la lumière laser à angles multiples (MALLS), qui donne un signal pouvant être converti à une estimation de la masse moléculaire de l'espèce éluée (Oliva et al., 2001). Parmi les diverses constructions de Rev entier, nous en avons analysé trois en SEC/MALLS (Rev^{WT} , Rev^{V16D} , $Rev^{V16D/I55N}$). Nous avons également étudié la forme tronquée de Rev avec les extrémités suggérées à l'aide de nos expériences de RMN (résidus 4-69; cf. 2.6.1, page 63), construction possédant également les deux mutations (V16D/I55N). Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme de l'IBS "PAOL" (Protein Analysis On-Line) par Marjolaine Noirclerc-Savoie dans notre équipe.

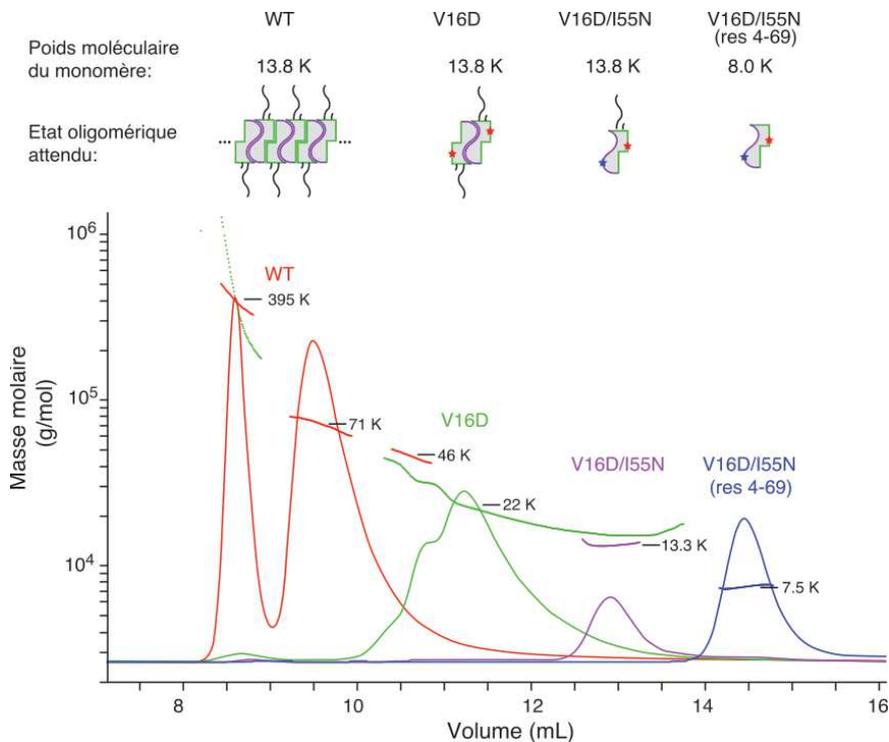


FIGURE 2.9 – **Analyse des différentes constructions de Rev par SEC/MALLS.** Les courbes d'élution suivies à 280 nm et les distributions de masses molaires calculées par MALLS sont superposées pour les différentes constructions (rouge, Rev^{WT} ; vert, Rev^{V16D} ; magenta, $Rev^{V16D/I55N}$; bleu, $Rev^{V16D/I55N}$ (rés. 4-69)). Rev^{WT} a été injectée à une concentration de 70 μ M, Rev^{V16D} à 45 μ M et les deux formes de $Rev^{V16D/I55N}$ à 30 μ M.

Comme montre la **Figure 2.9**, les formes tronquées et entières du double mutant V16D/I55N donnent des pics relativement étroits à respectivement 14.5 et 12.8 ml.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

Ces pics correspondent à des distributions de masse assez homogènes, centrées autour de respectivement 7.5 kDa et 13.3 kDa, en bon accord avec les poids moléculaires attendus des formes monomériques (respectivement 8.0 kDa et 13.8 kDa). En revanche, le mutant Rev V16D donne un pic large avec deux épaulements (volume d'élution entre 10.0 et 12.5 ml) correspondant à une distribution de poids moléculaires entre 15 et 45 kDa. Le maximum de ce pic à 11.3 ml correspond à un poids moléculaire autour de 23 kDa, proche de celui attendu du dimère (27.6 kDa). Cette protéine donne aussi un petit pic proche du volume mort. Ce dernier pic est beaucoup plus important pour la forme sauvage de Rev et correspond à des espèces moléculaires dont le poids moléculaire varie entre 300 et 500 kDa, suggérant la présence de gros oligomères ou des fibres de Rev. Rev^{WT} donne aussi un deuxième pic éluant entre 9 et 11 ml et correspondant à une distribution d'espèces oligomériques composées de 3 à 6 monomères.

Ainsi, l'analyse PAOL confirme la tendance de la forme sauvage de Rev à s'oligomériser et à s'aggréger. D'ailleurs, pendant que le mutant Rev^{V16D} semble former principalement des dimères comme attendu, on peut observer aussi d'autres espèces, notamment des monomères, des trimères et des tétramères. De plus, l'analyse PAOL confirme l'état monodispersé et monomérique du double mutant Rev^{V16D/I55N}, que ce soit dans sa forme entière ou tronquée. C'est la raison pour laquelle nous avons privilégié cette forme de Rev pour nos études biophysiques et structurales.

2.3.4 Confirmation de la structure secondaire de Rev par RMN

Afin de vérifier que notre préparation de Rev^{V16D/I55N} était bien repliée, nous l'avons analysée par RMN en mesurant un spectre HSQC après avoir marqué la protéine au ¹⁵N. Une analyse similaire a déjà été publiée (Casu et al., 2013). Le travail en RMN a été réalisé en collaboration avec le groupe de Martin Blackledge à l'IBS. Les efforts ont été surtout fournis par Elise Delaforge, étudiante en thèse dans cette équipe, qui a réalisé certaines acquisitions, l'attribution et l'analyse des spectres et qui a toujours été là pour partager son expertise. Une première partie des résultats est présentée dans cette section, le reste des résultats sera détaillé un peu plus loin.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.3. REV PEUT ÊTRE PURIFIÉ DANS UNE FORME MONOMÉRIQUE

L'attribution de 66 résidus sur 116 a pu être effectuée sachant que les prolines (Rev en contient 10) ne sont pas attribuables en RMN. Ce taux d'attribution (57%) est plus élevé que celui publié (47%; Casu et al., 2013).

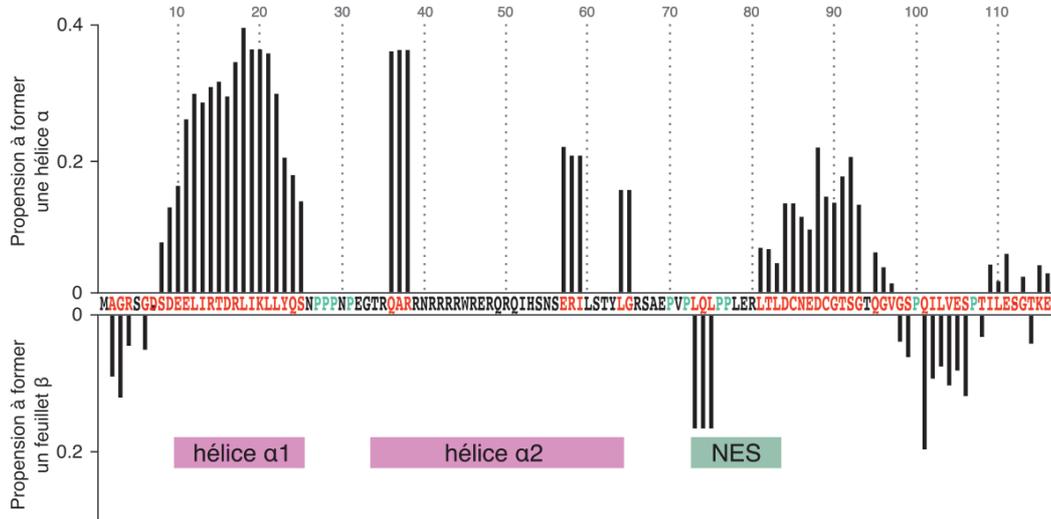


FIGURE 2.10 – **Analyse des structures secondaires de Rev.** Le graphique représente les propensions de Rev à établir des structures secondaires (hélices α et feuillets β). Les données ont été obtenues à l'aide du logiciel SSP. La séquence de Rev^{V16D/I55N} est indiquée et les résidus attribués sont mis en évidence (en rouge). Les prolines non attribuables en RMN sont mises en évidence (en cyan).

Comme le montre la **Figure 2.10**, les résidus 8-25, 57-79 et 65-66 présentent une forte propension à réaliser des hélices, en cohérence avec la structure connue du domaine N-terminal de Rev (cf. **Figure 1.6**, page 14). Les résidus 81-95 dans la queue C-terminale semblent aussi avoir une faible propension à réaliser une hélice. Ces résidus sont en aval du NES et pourraient interagir avec le facteur d'export CRM1.

2.4 Rev et Imp β forment un complexe stable

2.4.1 Analyse du complexe Imp β /Rev par SEC

Après avoir purifié Rev et Imp β séparément, j'ai essayé de reconstituer le complexe formé par ces deux protéines. La **Figure 2.11 (a)** montre une expérience de gel filtration à une échelle analytique en chargeant Imp β seul, Rev seule, ou un mélange des deux protéines sur une colonne superdex S200. Rev^{V16D/I55N} et Imp β éluent à un volume de 2.2 et 1.9 ml, respectivement, tandis que le complexe formé entre Imp β et un excès de Rev^{V16D/I55N} donne un pic à 1.7 ml, ce qui indique une espèce moléculaire dont le rayon hydrodynamique est supérieur à celui d'Imp β . Un deuxième pic à 2.2 ml correspond à l'excès de Rev^{V16D/I55N} non lié. L'analyse par gel dénaturant a confirmé la présence des deux protéines dans le premier pic (**Figure 2.11 (b)**). À la différence de mes tentatives de co-expression (**Figure 2.1 (b)**), l'intensité des deux bandes suggère la formation d'un complexe stoechiométrique. La stabilité du complexe a été confirmée par un gel natif, qui montre une seule bande correspondant au premier pic (**Figure 2.11 (c)**). Ces résultats confirment que la reconstitution du complexe à partir d'Imp β et Rev séparément purifiés est une stratégie efficace. De cette manière, nous avons pu vérifier qu'Imp β et Rev formaient un complexe stable.

2.4.2 Analyse du complexe Imp β /Rev par SEC/MALLS

Imp β seule ou en complexe avec un excès/défaut de Rev^{V16D/I55N} a été étudié par des expériences de SEC/MALLS. Les résultats sont représentés dans la **Figure 2.12**. Nous pouvons voir que lorsqu'Imp β est seule, la protéine est à 96% sous forme monomérique avec une masse moléculaire observée de 95 kDa. La forme dimérique représente le 4% restant avec une masse moléculaire observée de 178 kDa. Ces valeurs se rapprochent des valeurs théoriques attendues (c'est-à-dire 97 kDa pour la forme monomérique et 194 kDa pour la forme dimérique).

Pour les complexes, lorsque Rev est en excès par rapport à Imp β , la masse molaire observée par la technique de SEC/MALLS est de 105 kDa. Dans le cas d'un complexe avec un ratio 1 : 1 ; la masse molaire théorique attendue est de 110 kDa. Lorsqu'Imp β

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.4. REV ET IMP β FORMENT UN COMPLEXE STABLE

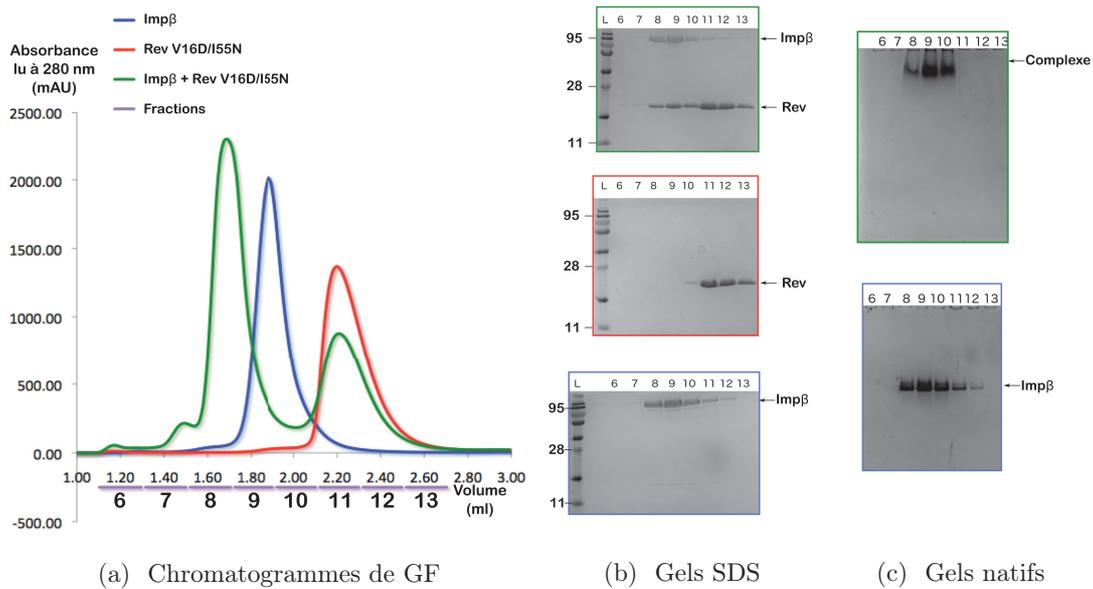


FIGURE 2.11 – **Gel filtration de Rev et d'Imp β** (a) Superposition des chromatogrammes obtenus sur colonne S200 15 150 GL. Il s'agit des chromatogrammes d'Imp β seule (en bleu), de Rev^{V16D/I55N} seul (en rouge) et du complexe préparé en utilisant un large excès de Rev (en vert). Les différentes fractions collectées et analysées sont mises en évidence sous les chromatogrammes. (b) Gels dénaturants (15 % acrylamide) obtenus pour ces différentes purifications. Le code couleur est le même que précédemment. Les fractions sont indiquées au-dessus des gels. Les gels contiennent également des marqueurs de poids moléculaire (L). (c) Gels natifs TGX (10% acrylamide) obtenus pour Imp β seule ou en présence d'un large excès de Rev. Le point isoélectrique de Rev étant très basique, la protéine seule ne migre pas dans les gels natifs TGX 10%, c'est la raison pour laquelle on n'observe pas l'excès de Rev sur gel natif. La migration d'Imp β en complexe avec Rev est légèrement retardée par rapport à Imp β seule.

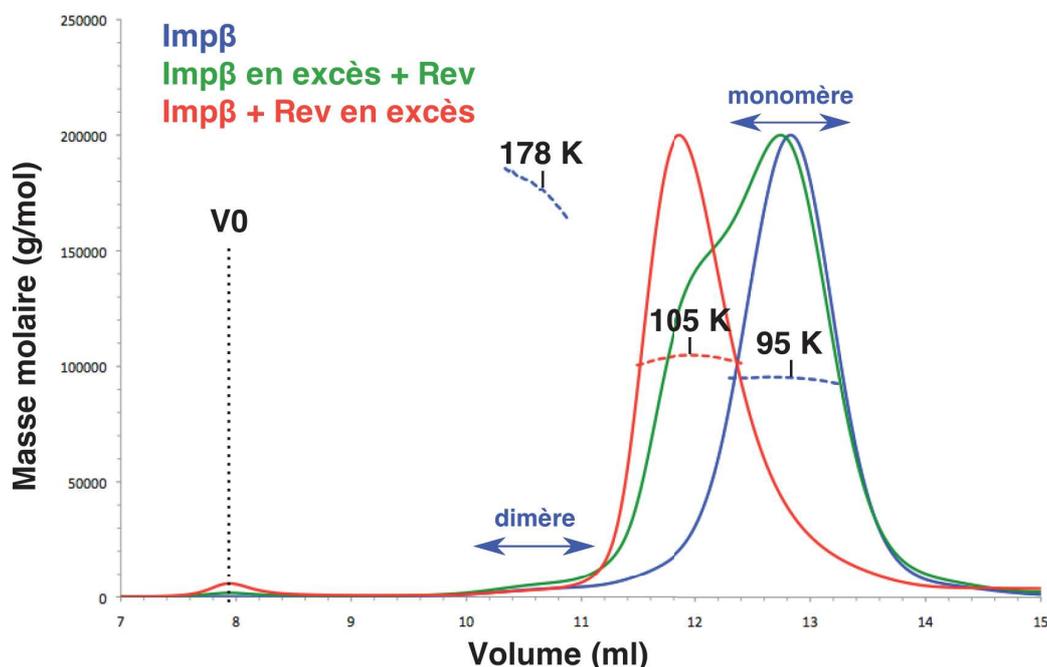


FIGURE 2.12 – SEC/MALLS d' $\text{Imp}\beta$ seule ou en complexe. Les profils d'élution suivi à 280 nm ainsi que les distributions de masse molaire calculée par MALLS sont superposées pour différents échantillons ($\text{Imp}\beta$ seule ou en complexe avec $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ en défaut ou en excès). L'excès de Rev n'est pas visible sur ce profil à cause de son faible coefficient d'extinction molaire par rapport à celui d' $\text{Imp}\beta$.

est en excès, nous observons un épaulement du pic à faible volume d'élution (11.8 ml) correspondant au complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$, ainsi que le pic correspondant à $\text{Imp}\beta$ seule (12.9 ml). La distribution de masse observée pour le complexe indique une stœchiométrie du complexe relativement bien définie.

2.4.3 Visualisation du complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$ par microscopie électronique

L'apparence monodisperse du complexe observé par SEC/MALLS contraste avec la tendance de Rev à former des fibres. Cette différence a pu être visualisée de manière frappante par microscopie électronique (ME) à coloration négative. L'avantage de cette technique est qu'elle donne une indication sur le degré d'homogénéité de

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.4. REV ET IMP β FORMENT UN COMPLEXE STABLE

l'échantillon, que ce soit en terme de distribution d'état oligomérique ou d'homogénéité conformationnelle des particules. Nous avons examiné les échantillons d'Imp β et de Rev^{WT} obtenus après l'étape finale de purification, ainsi qu'un échantillon du complexe Imp β /Rev purifié par gel filtration sur une colonne Superdex S200. Toutes les analyses de ME ont été réalisées par Francesca Coscia, étudiante en thèse au sein de notre équipe.

Imp β seule était difficilement visible sur les micrographes, le signal que nous voyons correspondait principalement à du bruit de fond (cf. Annexe F, page 198). En revanche, les micrographes de Rev^{WT} seul ou en complexe ont donné des résultats intéressants (**Figure 2.13**). Rev présente une distribution de particules de différentes tailles, y compris des formes arrondies inférieures à 10 nm de diamètre, des particules plus grosses (15-20 nm) en forme de "C", et des microfibrilles mesurant approximativement 15 nM en largeur et jusqu'à 150 nm en longueur, vraisemblablement formés par plusieurs unités en forme de "C" qui s'enchaînent. Ces observations sont en accord avec nos données de gel filtration et de SEC/MALLS qui montrent que Rev^{WT} a tendance à s'agréger et sont également en accord avec des publications montrant que Rev est capable de former des fibres en solution (Havlin et al., 2007; Daugherty et al., 2010a).

De façon frappante, lorsque Rev^{WT} est complexé à Imp β , nous observons une disparition de cet état d'agrégation (**Figure 2.13 (b) et (d)**). À la place des fibres, on observe des particules d'un diamètre d'environ 5 nm, comparables aux dimensions de la structure cristalline d'Imp β en complexe avec l'IBB d'Imp α (à peu près 80 Å x 60 Å x 50 Å). L'homogénéité de ces particules nous a encouragé à poursuivre l'étude structurale du complexe Imp β /Rev.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.5. TENTATIVES DE CRISTALLOGÉNÈSE

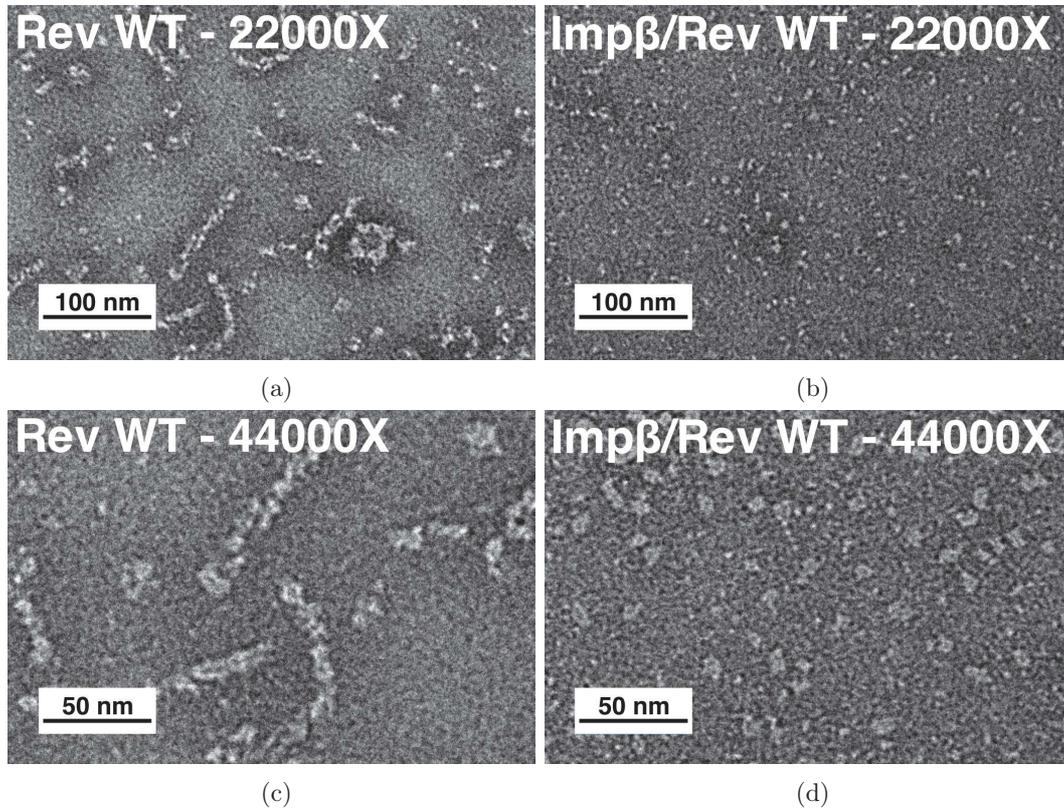


FIGURE 2.13 – Microscopie électronique sur Rev seul ou en complexe avec Imp β . (a) et (b) le grossissement est de 22000X. (c) et (d) le grossissement est de 44000X en bas. À gauche, il s'agit de micrographes de Rev^{WT} seul. Le complexe issu de gel filtration d'Imp β /Rev^{WT} est sur les micrographes de droite.

2.5 Tentatives de cristallogénèse

2.5.1 Par criblage à haut débit

Au cours de ma thèse j'ai essayé de cristalliser différentes formes du complexe Imp β /Rev en faisant varier les constructions de Rev et d'Imp β utilisées. Par souci de clarté, ces efforts sont tous résumés ici, même si en réalité les expériences se sont étalées sur plusieurs mois. Mes premières tentatives ont porté sur le complexe Imp β /Rev^{WT}, Rev étant utilisé soit sous forme entière (Rev₁₁₆) soit sous forme d'un peptide correspondant au NLS (motif ARM). Ensuite, des mutants de Rev favori-

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.5. TENTATIVES DE CRISTALLOGÉNÈSE

sant sa forme monomérique (L18Q/L60R ; V16D/I55N ; L12S/L18Q/I59D/L60D) ou dimérique (I55N) ont été utilisées . Suite à l'analyse par RMN décrite plus loin, j'ai utilisé une forme tronquée de Rev comprenant le domaine minimale d'interaction avec Imp β (Rev₉₋₆₉^{V16D/I55N}). Les diverses constructions et conditions sont résumées dans le **Tableau 2.1**. Ces échantillons ont été envoyés à la plateforme HTX-lab de l'EMBL à Grenoble, spécialisée dans le criblage à haut débit des conditions de cristallogenèse. La qualité de chaque échantillon a été d'abord confirmée par un gel natif afin de vérifier l'homogénéité du complexe et par une expérience de fluorimétrie différentielle à balayage (Thermal Shift Assay (TSA) ; décrit plus loin) afin d'estimer la stabilité du complexe en comparant sa température de fusion (Tm) avec celle d'Imp β seule. Chacun de ces échantillons a été testé dans environ 600 conditions de cristallogenèse. Entre 35 et 65% des conditions testées ont donné des précipités. Malheureusement aucune condition n'a donné des cristaux diffractants. Plusieurs conditions ont donné des pseudo-cristaux sphériques comme ceux présentés dans la **Figure 2.14**, mais lorsque ceux-ci ont été testés aux lignes de lumières de l'ESRF aucune diffraction n'a été observée.

TABLEAU 2.1 – Essais de cristallogenèse réalisés. Les identifiants correspondant aux différents lots de protéine testée sont indiqués (Batch ID). Les différentes formes de Rev et Imp β sont indiquées ainsi que la stœchiométrie relative de Rev par rapport à Imp β . Il est aussi indiqué si le complexe est issu d'une gel filtration avec un large excès de Rev ou si il est issu d'une mélange entre Imp β et Rev. Enfin, la concentration des différents complexes testés est indiquée, ainsi que la valeur de l'augmentation du Tm par rapport à Imp β seule.

Batch ID	Imp β	Rev	Ratio Rev/Imp β	GF oui/non	Concentration (mg.ml ⁻¹)	Δ Tm (°C)
2012/07/19	WT	Peptide NLS (E32-Q51)	1	non	10	10
2012/07/19	WT	Peptide NLS (E32-Q51)	2	non	10	10
2013/02/21	WT	Peptide NLS (E32-Q51)	-	oui	10	10
2013/04/15	WT	Rev116 WT	-	oui	20	5
2013/04/15	WT	Rev116 L18Q/L60R	-	oui	20	6
2013/04/15	WT	Rev116 I55N	-	oui	20	6
2014/12/04	213 KESE > AASA	Rev116 L12S/L18Q/I59D/L60D	-	oui	20	7
2014/12/19	WT	Rev9-69 V16D/I55N	-	oui	15	4
2014/12/19	213 KESE > AASA	Rev9-69 V16D/I55N	-	oui	4	6
2014/12/19	493 QEE >AAA	Rev9-69 V16D/I55N	-	oui	2	3



FIGURE 2.14 – Pseudocristaux obtenus du complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$.

2.5.2 Utilisation de mutants entropiques d' $\text{Imp}\beta$

Afin d'augmenter la probabilité d'obtenir des cristaux du complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$, j'ai fait appel à une stratégie de mutagenèse (appelé *surface entropy reduction* (SER)) qui vise la diminution de l'entropie des résidus localisés sur la surface d'une protéine. En effet, des résidus de surface ayant des longues chaînes latérales peuvent empêcher la cristallogenèse d'une protéine à cause de la forte pénalité entropique provoquée par l'immobilisation de ces chaînes latérales lorsqu'elles sont impliquées dans des contacts cristallins. Le remplacement de ces résidus par alanine permet d'améliorer la cristallogenèse de certaines protéines (Derewenda, 2004 ; Page, 2008 ; Dale et al., 2003 ; Goldschmidt et al., 2007 ; Stevens, 2000, Stevens, 2000 ; Derewenda, 2011). Le serveur SERp utilisé a permis d'obtenir des prédictions de mutations entropiques à essayer sur $\text{Imp}\beta$. Il s'agit des mutants 185 KEE > AAA, 493 QEE > AAA et 213 KESE > AASA (**Figure 2.15**). En effet, ces trois patches de résidus sont situés à la surface d' $\text{Imp}\beta$. Sur les trois mutants, un (185 KEE > AAA) n'était pas bien exprimé. Par contre, j'ai pu exprimer et purifier les deux autres mutants.

De façon intéressante le mutant d' $\text{Imp}\beta$ 493 QEE > AAA favorise une forme dimérique (**Figure 2.16 (a)**). En effet, alors qu' $\text{Imp}\beta^{WT}$ possède une propension à se dimériser de l'ordre de 4%, le patch de mutation 493 QEE > AAA augmente ce phénomène à environ 16% (**Figure 2.12** et **Figure 2.16 (a)**) ; Voir aussi Annexe ??normalchem β MutantDimericAnnexe $\text{Imp}\beta$ MutantDimeric patch de mutations 213

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.5. TENTATIVES DE CRISTALLOGÉNÈSE



FIGURE 2.15 – **Prédictions des mutants entropiques d'Imp β .** Propositions des mutations entropiques à réaliser sur Imp β obtenues à l'aide du serveur SERp (Goldschmidt et al., 2007).

KESE > AASA semble quant à lui favoriser la forme monomérique d'Imp β (2.16 (b)). Malheureusement, aucun de ces mutants n'a permis d'obtenir des cristaux en complexe avec Rev.

2.5.3 Tentatives de cristallogénèse de manière pseudo-rationnelle

Le **Tableau 2.2** résume les conditions de cristallogénèse qui ont permis d'obtenir la structure cristalline d'Imp β en complexe avec divers partenaires. En comparant ces conditions avec celles qui m'ont donné des pseudo-cristaux, j'ai remarqué certaines tendances récurrentes. Nous observons souvent par exemple, des conditions dont le pH se situe entre 5 et 9, ainsi que des conditions en sulfate d'ammonium entre 0.8 et 3.5 M ou en PEG4000/8000 entre 5 et 24%. Il existe aussi des conditions avec des ions bivalents comme le calcium ou le magnésium. Ainsi, à l'aune de ces observations, j'ai tenté d'obtenir des cristaux par la méthode de la goutte suspendue en réalisant des matrices avec des faibles incréments de tous ces paramètres expérimentaux. Malheureusement, cette stratégie fut également infructueuse.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.5. TENTATIVES DE CRISTALLOGÉNÈSE

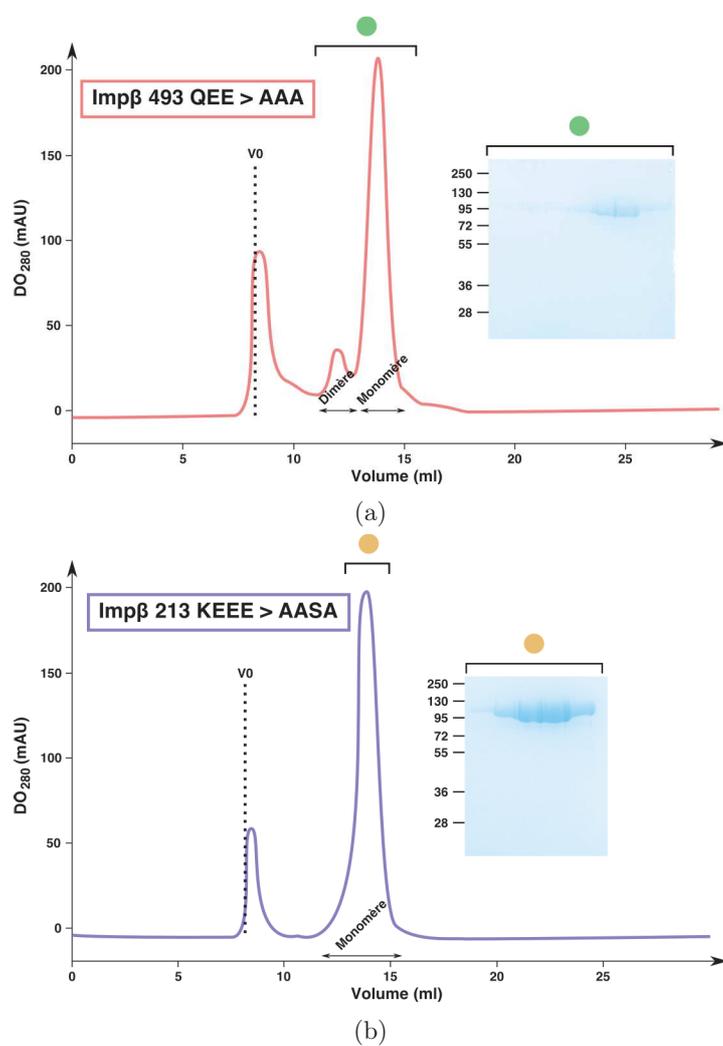


FIGURE 2.16 – Gel filtrations des mutants entropiques d'Imp β (a) Imp β 493 QEE > AAA. (b) Imp β 213 KESE > AASA.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.5. TENTATIVES DE CRISTALLOGÉNÈSE

TABLEAU 2.2 – Conditions de cristallogenèse utilisées pour Imp β en complexe avec d'autres entités peptidiques ou protéiques.

Partenaires d'Imp β	Référence(s)	Condition(s) de cristallogenèse	
		Tampon/pH	Précipitant et autres constituants
IBB d'Imp α	Cingolani et al., 1999	50 mM K ⁺ /CH ₃ COO ⁻ pH 5.8 50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH 3.9	18-22% PEG8000, 10 mM β -mercaptoéthanol 16-20% PEG8000, 10 mM β -mercaptoéthanol, 5 mM NaI
Peptide GLFG	Bayliss et al., 2002a	100 mM NH ₄ ⁺ /CH ₃ COO ⁻ pH 6.0	1.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
IBB de Snuportin	Mitrousis et al., 2008	pH 6.0	20% PEG8000, 50 mM NaCl
Peptide FxFG	Bayliss et al., 2000a Bayliss et al., 2000b Bayliss et al., 2002a	100 mM NH ₄ ⁺ /CH ₃ COO ⁻ pH 5.5 200 mM NH ₄ ⁺ /CH ₃ COO ⁻ pH 5.5	1.24 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM DTT 1.28-1.36 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM DTT
IBB de snuportin	Bhardwaj and Cingolani, 2010	pH 6.5	18% PEG8000, 50 mM NaCl
SEWBP-2	Lee et al., 2003	50 mM MES pH 6.6	5-6% PEG8000, 20% glycérol, 30 mM SrCl ₂
RanGTP	Vetter et al., 1999a Vetter et al., 1999b	100 mM MES pH 6.0	9.5% PEG4000, 110 mM Ca ²⁺ /(CH ₃ COO ⁻) ₂ , 0.5% dioxane
PTHrP	Cingolani et al., 2002	100 mM MES pH 6.0	12% PEG4000, 50 mM NaCl, 0.1-0.3% Tween-20
IBB de snuportin	Wohlwend et al., 2007	100 mM Na ₃ ⁺ /C ₃ H ₅ O(COO) ₃ ³⁻ pH 5.45	0.92 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2.5% CH ₃ CH ₂ OH

2.6 Imp β reconnaît Rev par son domaine N-terminal

2.6.1 Analyse par RMN de Rev en présence et en absence d'Imp β

N'ayant pas obtenu de cristaux du complexe entre Imp β et Rev, nous avons décidé de concentrer nos efforts sur les études biochimiques et biophysiques du complexe, ainsi que d'autres techniques structurales. Rev étant d'assez petite taille, j'ai décidé d'élucider la zone de Rev engagée dans l'interaction avec Imp β en utilisant la RMN. La protéine Rev^{V16D/I55N} donne un spectre RMN caractéristique d'une protéine désordonnée (**Figure 2.17 (a)**). En effet, le spectre de la protéine possède des résonances ¹H entre 7.5 et 8.5 ppm, les protéines ordonnées ayant une dispersion des déplacements chimiques ¹H plus large (Kragelj et al., 2013). Comme nous pouvons le voir sur cette figure, la zone centrale qui contient les arginines est difficilement attribuable, car les résonances nucléaires ne sont pas bien séparées. Cette superposition provient du fait que la quantité d'arginine dans Rev est importante (16 résidus sur 116, soit 14%).

Lorsque la protéine Imp β est ajoutée à la protéine Rev (**Figure 2.17 (b)**), certains pics disparaissent. Globalement ces pics correspondent aux résidus de Rev impliqués directement dans l'interaction avec Imp β ou qui font partie du même corps rigide reconnu par Imp β . Les intensités des pics de Rev obtenus en complexe avec Imp β sont normalisées par rapport à celles obtenues avec Rev seul dans la **Figure 2.17 (c)**. Malgré le fait que beaucoup de résidus entre les résidus N26 et R80 ne sont pas attribués, nous pouvons voir que la partie de Rev en interaction avec Imp β correspond au domaine N-terminale, c'est-à-dire l'épingle hélicoïdale (résidus 9-65). Par contre, les premiers 9 résidus, ainsi que la partie C-terminale (résidus 69-116) qui contient entre autre le NES, ne semblent pas engagés dans cette interaction.

Ainsi, il semble qu'Imp β reconnaît Rev principalement par son domaine N-terminal.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.6. IMP β RECONNAIT REV PAR SON DOMAINE N-TERMINAL

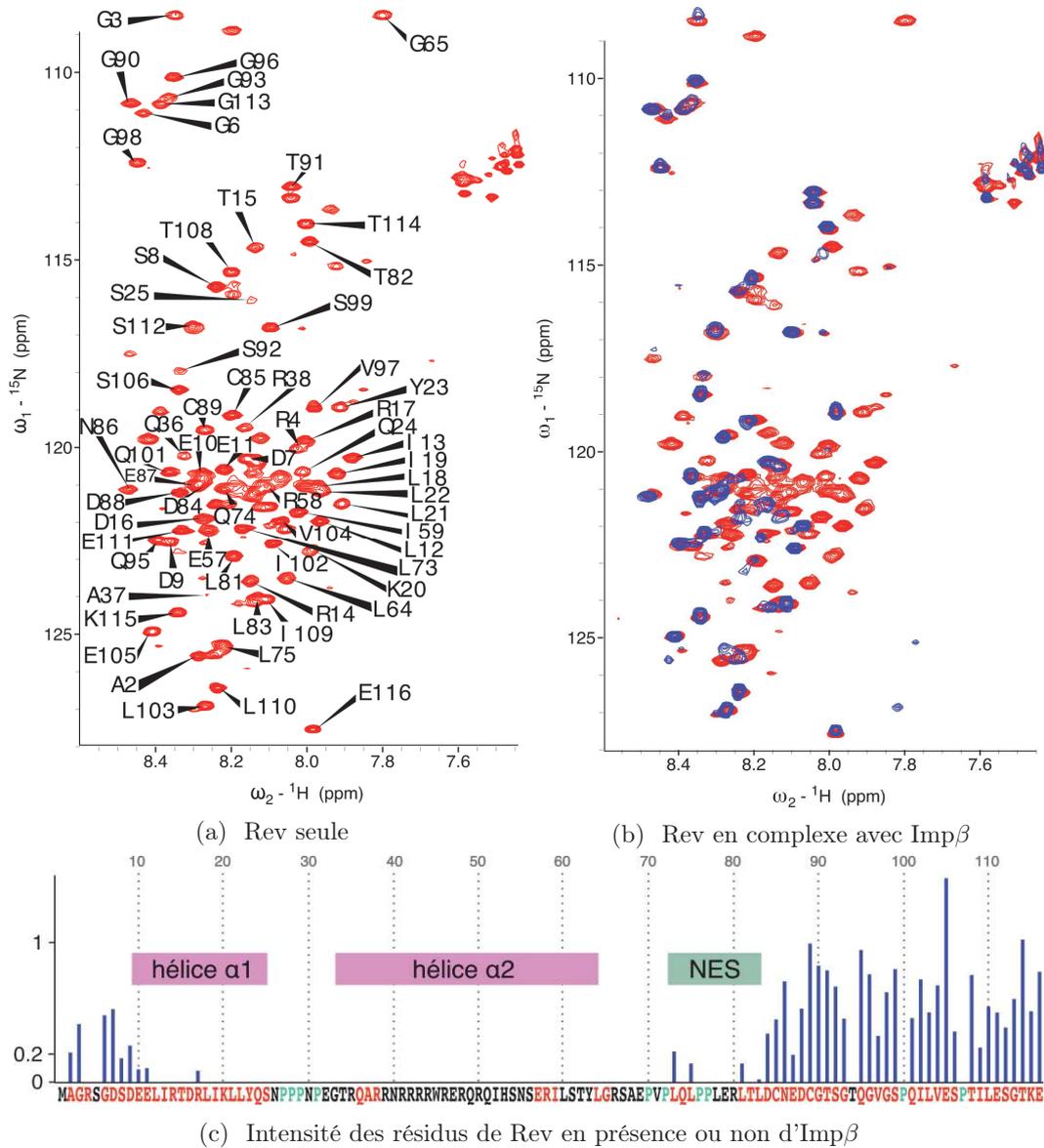


FIGURE 2.17 – Spectres RMN de Rev en présence ou non d'Imp β (a) Attributions sur deux dimensions (^1H et ^{15}N) de Rev seule. (b) Le spectre RMN de Rev seul (en rouge) et superposé avec le spectre de Rev en complexe avec Imp β (en bleu). (c) Séquence de Rev^{V16D/I55N} avec les résidus attribués en rouge et les résidus non attribués en noir. Les prolines non attribuables en RMN sont en cyan. L'intensité relative des pics obtenus en présence d'Imp β par rapport à Rev seul est montré sous forme de barres bleues.

2.6.2 Identification d'épitopes de liaison par balayage peptidique

Afin de vérifier la partie de Rev reconnue par Imp β , j'ai recouru à une expérience de fluorimétrie différentielle à balayage (*Thermal Shift Assay* (TSA)). Cette technique permet d'étudier la capacité d'une molécule à stabiliser thermiquement une autre en cas d'interaction. Nous avons tout d'abord testé la faisabilité de cette approche en étudiant la capacité de Rev entier à stabiliser Imp β . Les résultats de l'expérience ont montré que Rev^{V16D/I55N} augmente de 5.8 °C le Tm d'Imp β , ce qui représente un signal robuste (**Figure 2.18**).

Encouragé par ce résultat, nous avons ensuite utilisé cet essai pour tester différents peptides chevauchants de Rev provenant du *National Institutes of Health* (NIH, Rev peptide set). Il s'agit de peptides de 15 résidus couvrant toute la séquence de Rev et ayant un chevauchement de 10 résidus entre eux (**Figure 2.19**). La plupart des peptides n'améliore pas la stabilité thermique d'Imp β de manière significative (**Figure 2.19 (a)**). Cependant, 3 peptides augmentent le Tm de plus de 2°C. Ils sont tous situés entre les résidus 33 et les résidus 55, la zone contenant le motif riche en arginine (ARM; **Figure 2.19 (b)**). Comparé à la valeur du Tm obtenue avec Imp β seule (35.4 ± 0.7 °C), le peptide Rev₃₄₋₄₇ augmente la stabilité thermique de 2.25 ± 0.4 °C, Rev₃₇₋₅₁ l'augmente de 3.5 ± 0.7 °C et Rev₄₁₋₅₄ de 2.75 ± 0.4 °C. Ces peptides couvrent la partie N-terminale de l'hélice α 2 de l'épingle hélicoïdale (**Figure 2.19 (c)**). Ces données sont en accord avec l'observation que l'affinité d'Imp β pour Rev est compromis par la double mutation R38D/R39L de Rev (Henderson and Percipalle, 1997). Une stabilisation moins importante a aussi été observée avec le peptide couvrant les résidus 9-23 (Δ Tm=1 °C). Ces résidus correspondent presque parfaitement à l'hélice α 1. L'ensemble de ces données suggère qu'Imp β interagit avec une surface assez importante du domaine N-terminal de Rev. Par contre, aucun effet de stabilisation a été obtenu avec les peptides correspondant au domaine C-terminal désordonné, confirmant ainsi que ce domaine n'est pas reconnu par Imp β de façon significative.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.6. IMP β RECONNAIT REV PAR SON DOMAINE N-TERMINAL

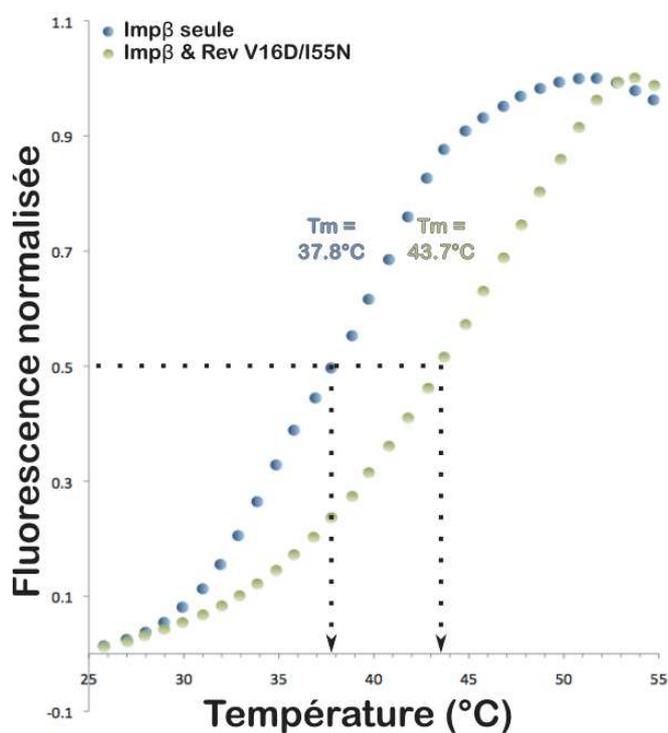
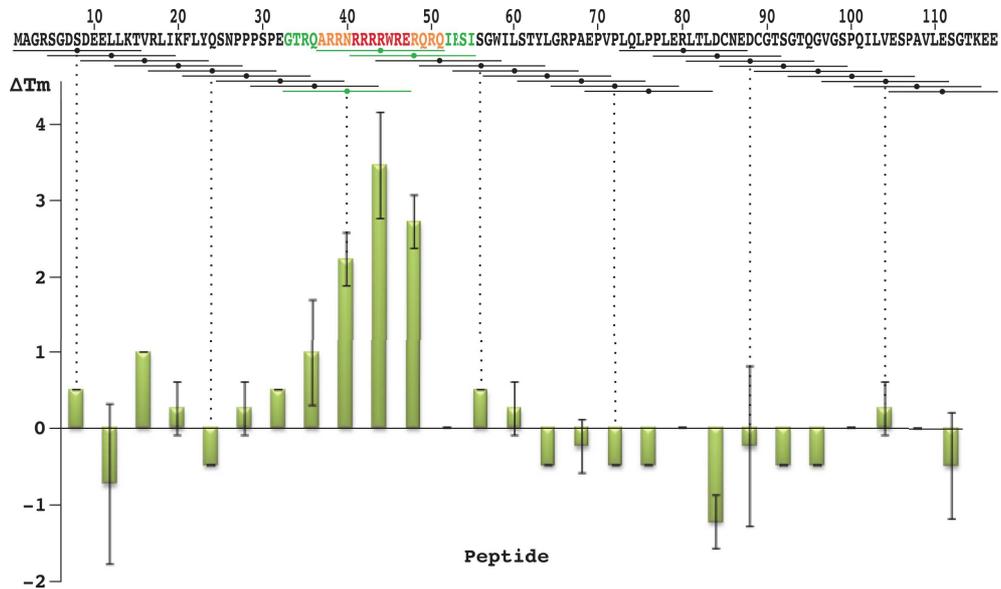


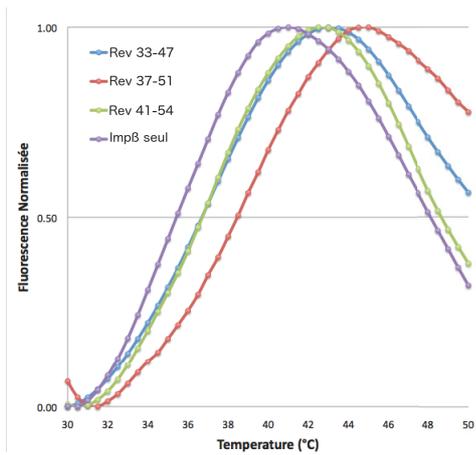
FIGURE 2.18 – Fluorimétrie différentielle à balayage d'Imp β seule ou en complexe avec Rev^{V16D/I55N}. Courbes normalisées obtenues avec les protéines issues de gel filtration. Imp β seule est en bleu, le complexe avec Rev^{V16D/I55N} en large excès est en vert. Rev^{V16D/I55N} seul, ne donne aucun signal de fluorescence (non montré).

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

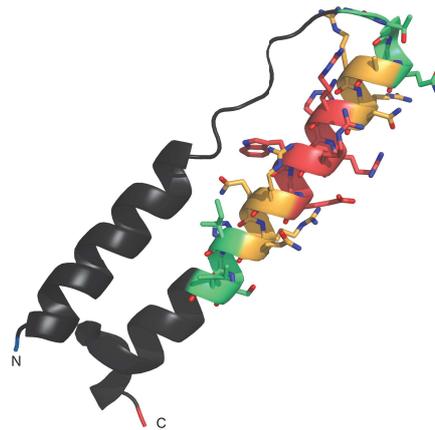
2.6. IMP β RECONNAIT REV PAR SON DOMAINE N-TERMINAL



(a)



(b)



(c)

FIGURE 2.19 – TSA d'Imp β en présence de différents peptides de Rev. (a) Différences de T_m observées entre Imp β seule et en présence de divers peptides de Rev. Les résidus colorés sont les résidus présents dans les peptides de Rev qui augmentent la stabilité thermique d'Imp β de plus de 2°C. Ces résidus sont présents soit dans un seul peptide (en vert), dans deux peptides (en orange) ou enfin dans trois peptides (en rouge). (b) Courbes de TSA obtenues avec les 3 peptides de Rev qui stabilisent Imp β de plus de 2°C. Imp β seule est en violet, le peptide 5999 (Rev₃₃₋₄₇) est en bleu, le peptide 6000 (Rev₃₇₋₅₁) est en rouge et le peptide 6001 (Rev₄₁₋₅₄) est en vert. (c) Mise en évidence sur la structure PDB 3LPH des résidus importants pour la stabilisation thermique, avec le même code couleur que dans la séquence (a).

2.7 Rev fixe $\text{Imp}\beta$ avec moins d’affinité que le motif ARM

2.7.1 Analyse par TSA

Afin de mieux apprécier le rôle du motif ARM dans l’interaction avec $\text{Imp}\beta$, j’ai répété l’essai de TSA décrit ci-dessus avec un peptide de 20 résidus couvrant le motif entier (Rev-NLS, résidus 32-51) au lieu des peptides de seulement 15 résidus. Nous pouvons voir sur la **Figure 2.20** que Rev^{WT} augmente le T_m d’ $\text{Imp}\beta$ de 4.6°C, cela est du même ordre de grandeur qu’observé précédemment avec $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ (**Figure 2.18**, 5.8°C). De façon frappante, le peptide Rev-NLS augmente encore plus la thermostabilité d’ $\text{Imp}\beta$ (9.4°C). Étant donné qu’une corrélation existe entre l’affinité d’une protéine pour son ligand et la stabilité thermique du complexe (Rogez-Florent et al., 2014), ces résultats montrent qu’ $\text{Imp}\beta$ possède une plus grande affinité pour le motif ARM que pour la protéine Rev entière.

2.7.2 Analyse par polarisation de fluorescence

Afin de vérifier la différence d’affinité pour $\text{Imp}\beta$ de Rev entier et le peptide Rev-NLS, j’ai mis au point un essai de d’interaction basé sur la polarisation de la fluorescence (FP), dont les bases théoriques sont décrites dans les Méthodes (section 4.8). Ces expériences, qui sont réalisées avec un peptide ou une protéine Rev marqués par un fluorophore, donnent des courbes d’associations caractéristiques (**Figure 2.21**). Lorsque le peptide Rev-NLS est titré avec $\text{Imp}\beta$ (**Figure 2.21 (a)**), une augmentation de polarisation de fluorescence importante est observée entre Rev-NLS seul ($FP_{min} = 40.5$) et Rev-NLS saturé par $\text{Imp}\beta$ ($FP_{max} = 249.8$). Le titrage de Rev entier avec $\text{Imp}\beta$ (**Figure 2.21 (b)**) donne une différence de signal plus faible ($FP_{min} = 34.6$ et $FP_{max} = 60.8$). Cette différence s’explique par le poids moléculaire plus important de Rev et par la présence du domaine C-terminale désordonné (Voir méthodes). Dans tous les cas, après normalisation et modélisation des données (**Figure 2.21 (c)**) nous pouvons voir que l’affinité d’ $\text{Imp}\beta$ pour le peptide NLS est plus grande que pour la protéine entière (K_D apparent de 18 ± 4 nM comparé à 220

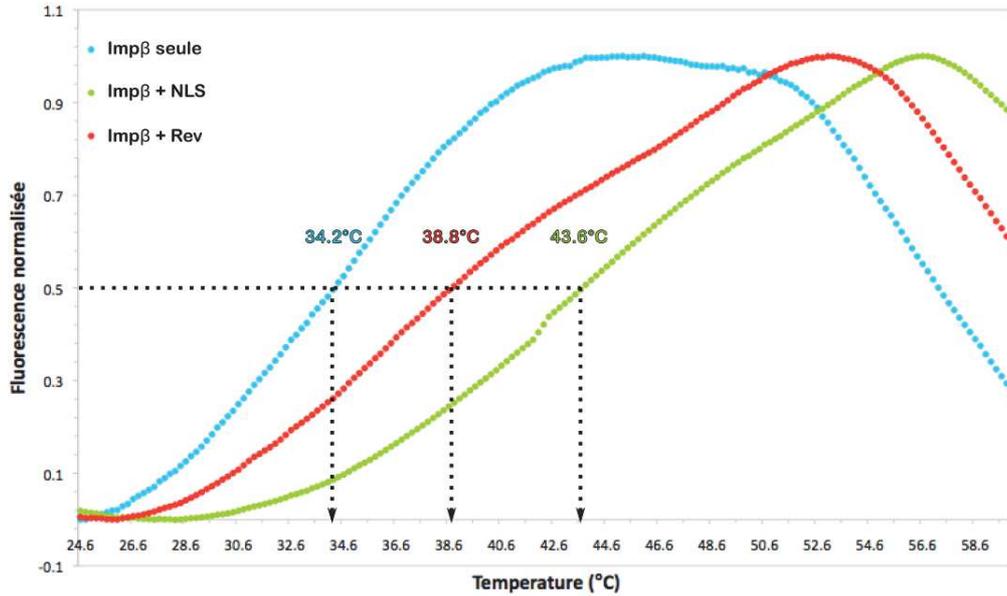


FIGURE 2.20 – TSA avec Rev^{WT} et NLS. Courbes TSA obtenues avec Imp β seule (en bleu), en complexe avec le NLS de Rev (en vert) et en complexe avec Rev^{WT} (en rouge). Par rapport à l’expérience précédente de TSA (**Figure 2.18**), le T_m absolu obtenu pour Imp β seule en solution est inférieur (34.2°C). Ces variations ont pu être observées en fonction des divers lots protéiques ou de divers instruments de RT-PCR utilisés.

± 16 nM), en cohérence avec nos données de TSA.

Pour vérifier ces résultats, j’ai réalisé une expérience de compétition en point final utilisant soit le peptide Rev-NLS, soit la protéine Rev contre le complexe préformé entre le peptide Rev-NLS fluorescent et Imp β (**Figure 2.21 (d)**). Cette expérience a montré que le peptide Rev-NLS diminue plus le signal de polarisation de fluorescence que la protéine entière (Rev-NLS diminue le signal de 41 ± 6 % tandis que Rev^{V16D/I55N} ne le diminue que de 25 ± 5 %), confirmant ainsi qu’Imp β fixe mieux le motif ARM que la protéine Rev entière. Cela implique que les résidus constituant le motif ARM peuvent interagir avec Imp β de manière plus efficace sous forme peptidique que lorsqu’ils sont dans le contexte du domaine N-terminal replié.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.7. REV FIXE IMP β AVEC MOINS D’AFFINITÉ QUE LE MOTIF ARM

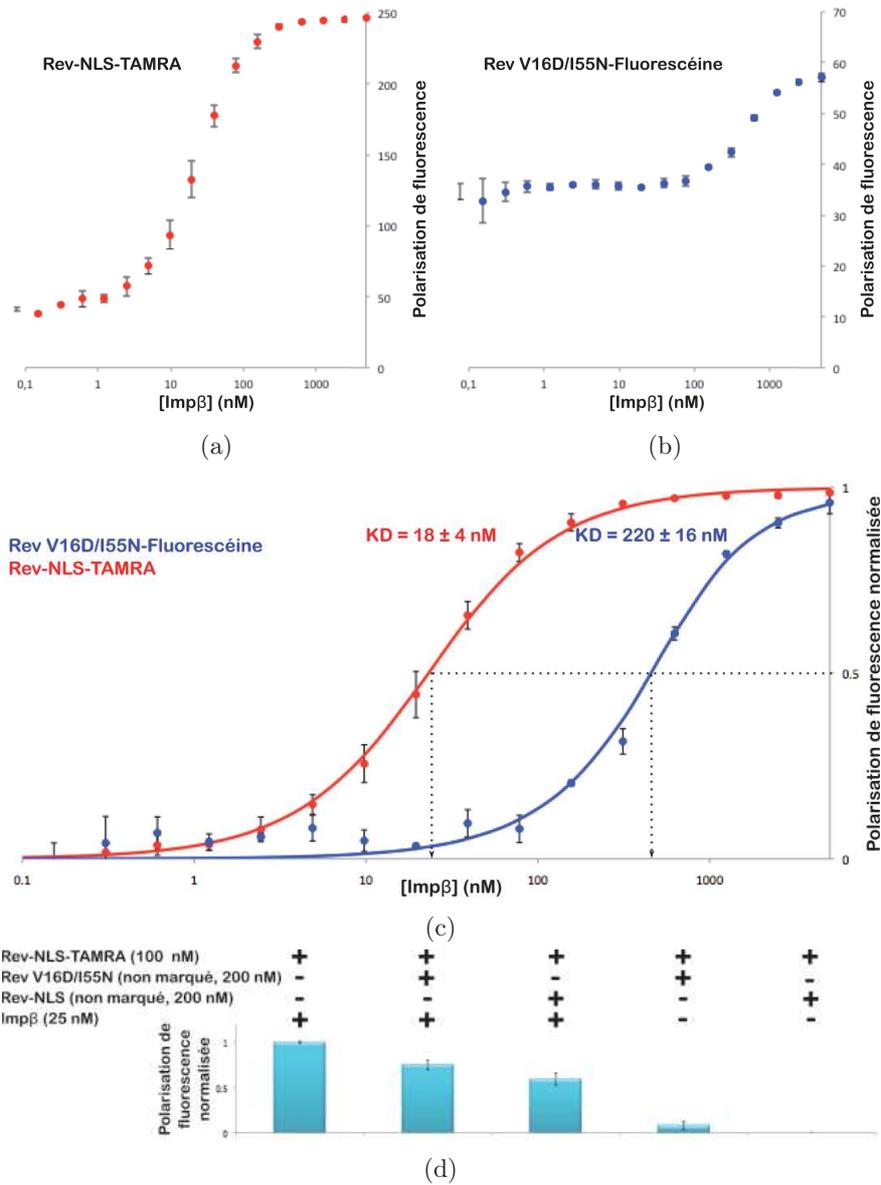


FIGURE 2.21 – Courbes de polarisation de fluorescence montrant l’interaction entre Imp β et Rev (a) Données brutes montrant l’augmentation du signal de FP lorsque le peptide fluorescent Rev-NLS-TAMRA est titré avec Imp β . (b) Données brutes obtenues lorsque Rev^{V16D/I55N} marqué à la fluorescéine est titré avec Imp β . (c) Courbes d’association normalisées d’Imp β en présence de Rev-NLS (en rouge) ou Rev^{V16D/I55N} (en bleu). Les données expérimentales ont été modélisées en utilisant l’équation 4.3 (cf 4.8.2, page 149). (d) Essai de compétition entre le peptide fluorescent Rev-NLS-TAMRA et le peptide (Rev-NLS) ou la protéine (Rev^{V16D/I55N}) non marquée.

2.8 Compétition d'Imp α et Ran sur Rev-NLS/Imp β

2.8.1 Compétition entre Rev-NLS et Imp α

Il a été montré par des expériences de type "pull-down" que la protéine Rev entière et Imp α sont en compétition pour se lier à Imp β (Henderson and Percipalle, 1997). J'ai voulu vérifier si cette compétition pouvait aussi être observée entre Imp α et le peptide Rev-NLS. Pour ce faire j'ai réalisé une expérience de compétition à l'aide de polarisation de fluorescence. L'expérience consista à former le complexe entre Imp β et le peptide Rev-NLS fluorescent et d'ajouter une concentration croissante d'Imp α . Comme le montre la **Figure 2.22**, Imp α entre en compétition avec le Rev-NLS de façon efficace. Dans ces conditions expérimentales, la valeur de la concentration inhibitrice médiane (IC50) obtenue est égale à 3.5 μ M. Le fait qu'Imp α et le peptide Rev-NLS sont en compétition pour Imp β suggère que le motif ARM interagit avec la même partie d'Imp β que le domaine IBB d'Imp α .

2.8.2 Absence de compétition entre Rev-NLS et Ran

Il a déjà été montré que RanGTP permet de dissocier le complexe formé entre Imp β et Rev entier (Henderson and Percipalle, 1997). En utilisant le test de compétition d'interaction que j'avais mis au point ci-dessus, j'ai vérifié si RanGTP était capable de dissocier le complexe formé entre Imp β et le peptide Rev-NLS. Comme le montre la **Figure 2.23 (a)**, même à forte concentration de RanGTP (100 μ M, soit un excès de 100 fois par rapport à la concentration d'Imp β), le complexe Imp β /Rev-NLS n'est pas dissocié, puisque la polarisation de fluorescence reste à une valeur approximative de 350.

Afin de confirmer la fonctionnalité de RanGTP, j'ai vérifié sa capacité à augmenter l'affinité de l'exportine humaine CRM1 pour un cargo possédant un signal d'export nucléaire (*Nuclear Export Signal* (NES); Güttler et al., 2010). J'ai pour cela vérifié la capacité de ma protéine RanGTP à augmenter l'affinité de CRM1 pour un peptide NES-PKI fluorescent, peptide issue d'une protéine inhibitrice de kinases (*Protein Kinase Inhibitor* (PKI); Dian et al., 2013). Comme le montre la **Figure 2.23 (b)**,

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.8. COMPÉTITION D'IMP α ET RAN SUR REV-NLS/IMP β

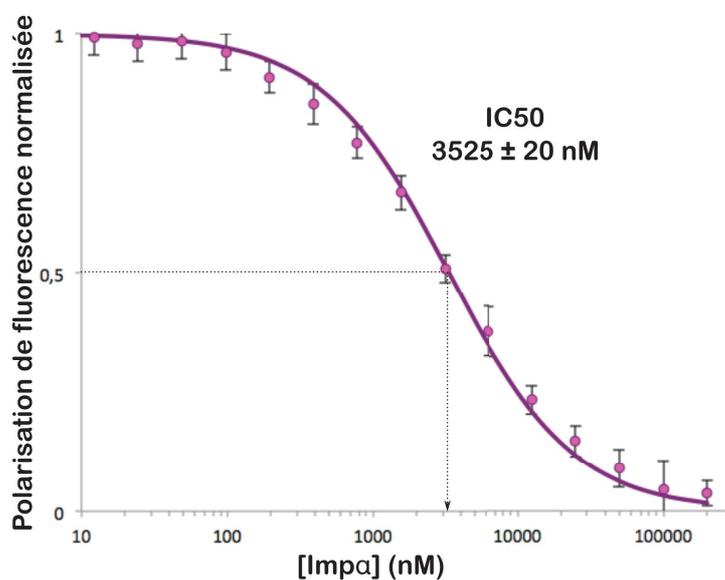


FIGURE 2.22 – **Compétition d'Imp α sur le complexe Rev-NLS/Imp β .** Les données brutes normalisées obtenues (points roses) et la modélisation de la compétition (courbe violette) ainsi que la valeur obtenue pour l'IC50 sont représentées. La modélisation a été obtenue à l'aide d'un logiciel de régression non linéaire utilisant l'équation 4.7 (cf. 4.8.4, page 153).

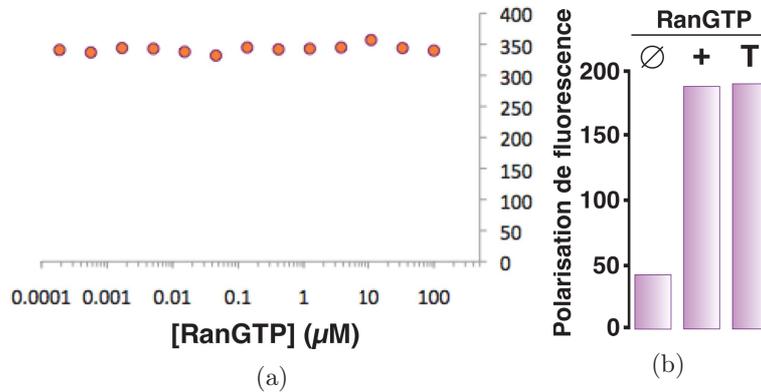


FIGURE 2.23 – **Polarisation de fluorescence avec RanGTP.** (a) Valeurs de polarisation de fluorescence obtenues sur le complexe Imp β /Rev-NLS avec différentes concentrations de RanGTP testées. (b) Test de fonctionnalité de RanGTP sur la valeur de polarisation de fluorescence entre le peptide TAMRA-NES-PKI et CRM1. Sans GTPase (\emptyset), avec une protéine fonctionnelle (+) et en testant ma protéine RanGTP (T).

la valeur de polarisation de fluorescence obtenue en présence de RanGTP provenant de ma purification (T) est nettement supérieure à celle obtenue en absence de Ran. De plus, cette valeur est comparable à celle obtenue avec un autre échantillon de RanGTP (+) purifié par un postdoctorant dans l'équipe (Florent Bernaudat) dont la fonctionnalité avait été confirmée dans plusieurs autres essais.

Ce résultat confirme que RanGTP est bien fonctionnelle. Par conséquent, l'absence de compétition entre RanGTP et Rev-NLS suggère que RanGTP et Rev-NLS sont reconnues par des zones différentes d'Imp β .

2.9 Imp β fixe deux monomères de Rev^{V16D/I55N}

2.9.1 Première évidence par gel natif

Initialement je pensais que le complexe entre Rev et Imp β était équimolaire, car le modèle de stœchiométrie 1 : 1 m'a permis d'avoir une bonne modélisation lors de mes expériences de polarisation de fluorescence et parce que la plupart des cargos reconnus par Imp β sont sous une forme monomérique. Une expérience de retard

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.9. IMP β FIXE DEUX MONOMÈRES DE REV^{V16D/I55N}

sur gel m'a permis de constater que ce n'était pas forcément le cas (**Figure 2.24**). En effet, en gardant la concentration d'Imp β constante et en augmentant progressivement la concentration de Rev jusqu'à un excès molaire de 4 fois, nous pouvons voir deux décalages successifs de la bande correspondant à Imp β . C'est la première évidence que j'ai obtenue suggérant qu'une molécule d'Imp β pouvait interagir avec 2 molécules de Rev.

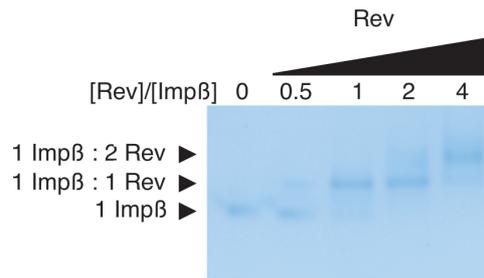
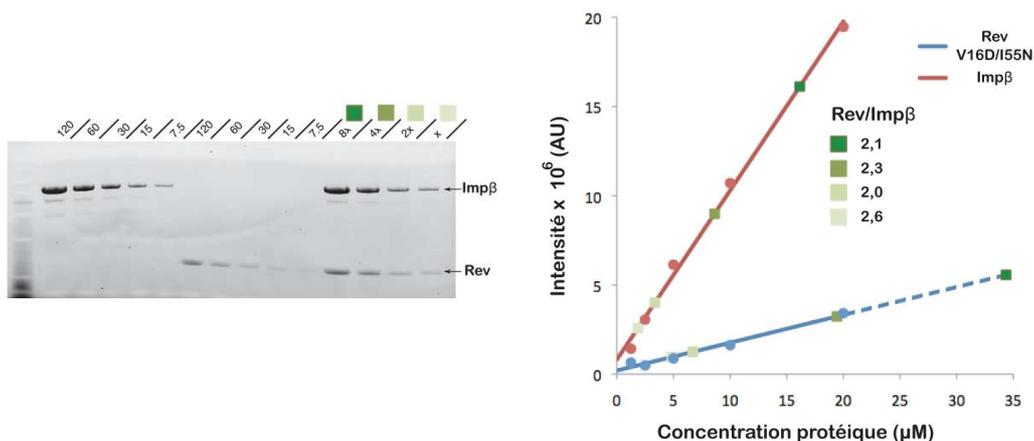


FIGURE 2.24 – **Gel natifs entre Imp β et Rev.** Gel électrophorétique natif (TGX, 10% acrylamide) d'Imp β avec différents ratio de Rev.

2.9.2 Quantification sur gel du complexe purifié par SEC

Suite à l'expérience du retard sur gel, j'ai voulu déterminer la stoechiométrie du complexe Imp β /Rev^{V16D/I55N} purifié par gel filtration (ex. courbe verte dans la **Figure 2.11 (a)**). Pour ce faire, j'ai analysé le pic correspondant au complexe Imp β /Rev sur gel dénaturant. J'ai ensuite quantifié les intensités des bandes et je les ai comparé à une courbe d'étalonnage construite en faisant migrer différents montants des deux protéines. J'ai exploité la technologie "TGX *Stain Free*" de Biorad, qui permet la détection des protéines à l'aide d'un agent qui réagit avec les tryptophanes. Sur gel dénaturant, nous pouvons voir qu'à quantité égale les bandes d'Imp β sont plus intenses que celles de Rev^{V16D/I55N} (**Figure 2.25 (a)**), en accord avec le fait qu'il y a 8 tryptophanes par molécule d'Imp β et uniquement un par molécule de Rev. En effet, à concentration identique l'intensité d'Imp β est bien environ 8 fois supérieure (**Figure 2.25 (b)**). En quantifiant l'intensité de 4 échantillons du complexe Imp β /Rev, j'ai trouvé qu'en moyenne 2.25 ± 0.26 molécules de Rev interagissaient avec une molécule d'Imp β . Ces données suggèrent que la stoechiométrie du complexe est de deux molécules de Rev^{V16D/I55N} pour une molécule d'Imp β .

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.9. IMP β FIXE DEUX MONOMÈRES DE REV^{V16D/I55N}



(a) Gel TGX10%

(b) Quantification de Rev et Imp β

FIGURE 2.25 – **Quantification d'Imp β et Rev^{V16D/I55N} par gel électrophorétique.** (a) Gel dénaturant (12% acrylamide) de quantités croissantes de Rev et d'Imp β (pmoles). Les échantillons du complexe sont indiqués par des carrés de couleurs différentes. Leurs concentrations est indiquée en valeur relative. (b) Courbes d'étalonnage d'Imp β (en rouge) et de Rev (en bleu). Les données expérimentales sont sous forme de points. Les quantités de Rev et Imp β déterminé à partir du complexe sont indiquées (carrés verts). L'intensité de la bande de Rev issue du complexe avec la plus haute concentration dépasse les concentrations testées avec la protéine seule. Sa concentration a donc été extrapolée (pointillées). Le nombre de molécules de Rev par rapport à Imp β est ajouté. Les coefficients des corrélations sont 0.995 pour Imp β et 0.981 pour Rev.

2.9.3 Quantification des acides aminés du complexe purifié par SEC

Afin de confirmer la stœchiométrie de 2 : 1 pour le complexe Imp β /Rev^{V16D/I55N} purifié par gel filtration, les acides aminés présents dans ce complexe ont été quantifiés. J'ai ensuite comparé la composition des acides aminés observée avec celle attendue selon différents modèles stoechiométriques. Afin de valider la méthode, les acides aminés des protéines purifiées seules ont été quantifiées également. Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme "Analyses d'acides aminés" gérée par Jean-Pierre Andrieu à l'IBS. L'analyse des protéines seules (**Figure 2.26 (a) et (b)**) montre

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.9. IMP β FIXE DEUX MONOMÈRES DE REV^{V16D/I55N}

que la différence entre les fréquences théoriques et les fréquences observées est inférieure à 40% pour la plupart des acides aminés mais peut aller au-delà de 100% pour certains. Pour chaque protéine, j'ai calculé un score en faisant la somme de ces différences sur l'ensemble des acides aminés fiables (Équation 4.1, page 145). Ainsi, le score obtenu est de 4.24 pour Rev et de 3.30 pour Imp β .

TABLEAU 2.3 – **Composition en acides aminés du complexe Imp β /Rev.** Les protéines utilisées proviennent de la purification par gel filtration (Figure 2.11). Le complexe provient de la fraction 8, Imp β provient de la fraction 9 et Rev de la fraction 12. Les acides aminés non utilisés dans l'analyse sont mis en évidence (fond violet). Les fréquences en acides aminés pour différents modèles stoechiométriques ainsi que ceux obtenus expérimentalement sont affichés.

Acides aminés	Quantités (pmoles)	Quantité par molécule de Rev116 V16D/I55N	Quantité par molécule de Imp β	Fréquence observée	Fréquence modèle 1 Imp β : 1 Rev	Fréquence modèle 1 Imp β : 2 Rev	Fréquence modèle 2 Imp β : 1 Rev
Asp/Asn	3222	10	90	11.34	11.56	11.35	11.69
Thr	1690	8	43	5.95	5.90	6.09	5.78
Ser	1977	11	49	6.96	6.94	7.33	6.70
Glu/Gln	4766	18	126	16.78	16.65	16.72	16.61
Pro	1720	10	37	6.05	5.43	5.88	5.17
Gly	1973	10	39				
Ala	2765	4	88	9.73	10.64	9.91	11.07
Cys	181	2	23				
Val	2001	3	67	7.04	8.09	7.53	8.43
Met	667	1	24				
Ile	1765	6	49	6.21	6.36	6.30	6.40
Leu	3817	13	101	13.44	13.18	13.11	13.22
Tyr	784	2	23	2.76	2.89	2.79	2.95
Phe	518	0	23				
His	458	1	13	1.61	1.62	1.55	1.66
Lys	1469	2	43	5.17	5.20	4.85	5.41
Arg	1973	16	32	6.95	5.55	6.60	4.92
Trp	0	1	8				
Total	29773	118	878				

Les données expérimentales obtenues sur le complexe Imp β /Rev sont résumées dans le **Tableau 2.3**. Les fréquences observées des différents acides aminés sont comparées avec 3 différents modèles de stœchiométrie, à savoir, une ratio Imp β : Rev de 1 : 1, de 1 : 2 et de 2 : 1. Les différences entre les fréquences observées et prédites sont tracées dans la **Figure 2.26 (c)**. Pour la plupart des acides aminés, les différences moins importantes sont observées pour le modèle 1 : 2. C'est aussi ce modèle qui donne le meilleur score (2.58 au lieu de 4.96 et 7.45 pour les modèles 1 : 1 et 2 :

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
 2.9. IMP β FIXE DEUX MONOMÈRES DE REV^{V16D/I55N}

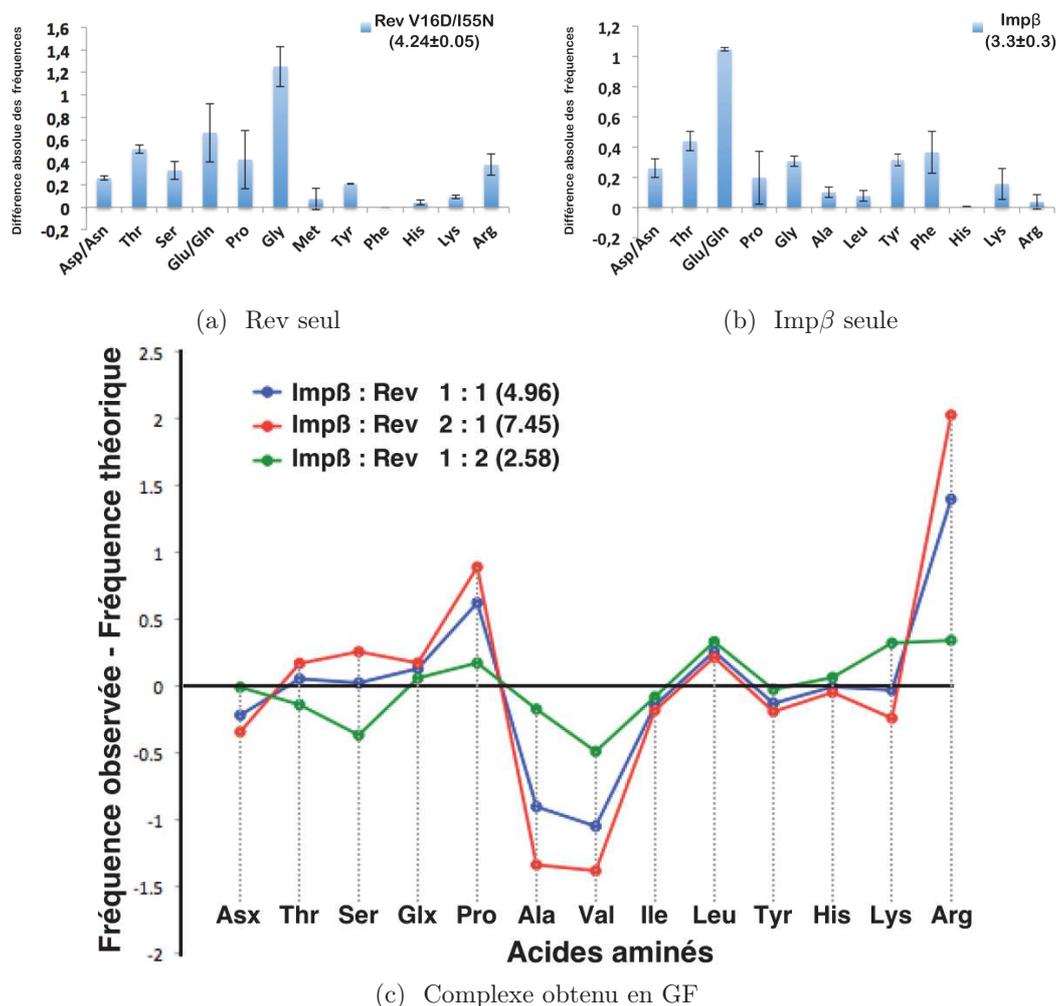


FIGURE 2.26 – Quantification des acides aminés. Les différences absolues entre les fréquences observées et les fréquences théoriques en acide aminé fiable des protéines sont représentées. La valeur obtenue par l'équation donnant le score (Équation 4.1) sont affichées entre parenthèses. (a) Rev^{V16D/I55N}. (b) Imp β . (c) Différents modèles de complexe.

1, respectivement). Ces résultats confirment ainsi l'hypothèse qu'Imp β fixe deux molécules de Rev^{V16D/I55N}.

2.9.4 Réticulation chimique suivie de spectrométrie de masse

Une autre façon de vérifier la stœchiométrie du complexe entre Rev et Imp β est d’analyser la capacité de ces protéines à être réticulées par un agent chimique tel que le glutaraldéhyde. J’ai incubé ces protéines, seules ou ensembles, avec du glutaraldéhyde, et les différents produits obtenus ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse (**Figure 2.27**). Nous pouvons voir sur le spectre MALDI de Rev^{V16D/I55N} seule (en haut à droite de la figure) que la réticulation au glutaraldéhyde n’induit pas la présence d’un dimère de Rev. Cette conclusion est évidente en comparant ce spectre avec celui de Rev non réticulé (cf. Annexe E ; **Figure E.1**).

Dans les conditions où la concentration de Rev par rapport à Imp β est augmentée, nous pouvons voir sur gel et dans les spectres MALDI qu’Imp β semble fixer une molécule de Rev puis une deuxième.

Sur les spectres MALDI des complexes, nous sommes également en mesure de détecter Rev sous forme de dimère. Le signal correspondant à ce pic augmente de plus en plus à mesure que la concentration de Rev par rapport à Imp β augmente. Cela suggère que la présence d’Imp β augmente la mise en proximité des résidus de Rev pouvant être réticulés par le glutaraldéhyde, en accord avec l’hypothèse qu’une molécule d’Imp β fixe deux molécules de Rev.

2.9.5 Analyse par spectrométrie de masse en condition native

Une dernière approche que j’ai utilisée pour vérifier la stœchiométrie du complexe Imp β /Rev^{V16D/I55N} est la spectrométrie de masse sous conditions natives. Globalement, un électrospray est utilisé, mais les conditions d’ionisation sont suffisamment douces afin de permettre de conserver des complexes macromoléculaires intacts. Ainsi la masse mesurée permet directement de déterminer la stœchiométrie du complexe analysé (Boeri Erba and Petosa, 2015 Sharon and Horovitz, 2015 Sinz et al., 2015 Chen et al., 2015 Rajabi et al., 2015). J’ai utilisé cette approche pour analyser Imp β seule ou en complexe avec Rev^{V16D/I55N} ou avec Rev₄₋₆₉^{V16D/I55N}. L’acqui-

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
 2.9. IMP β FIXE DEUX MONOMÈRES DE REV^{V16D/I55N}

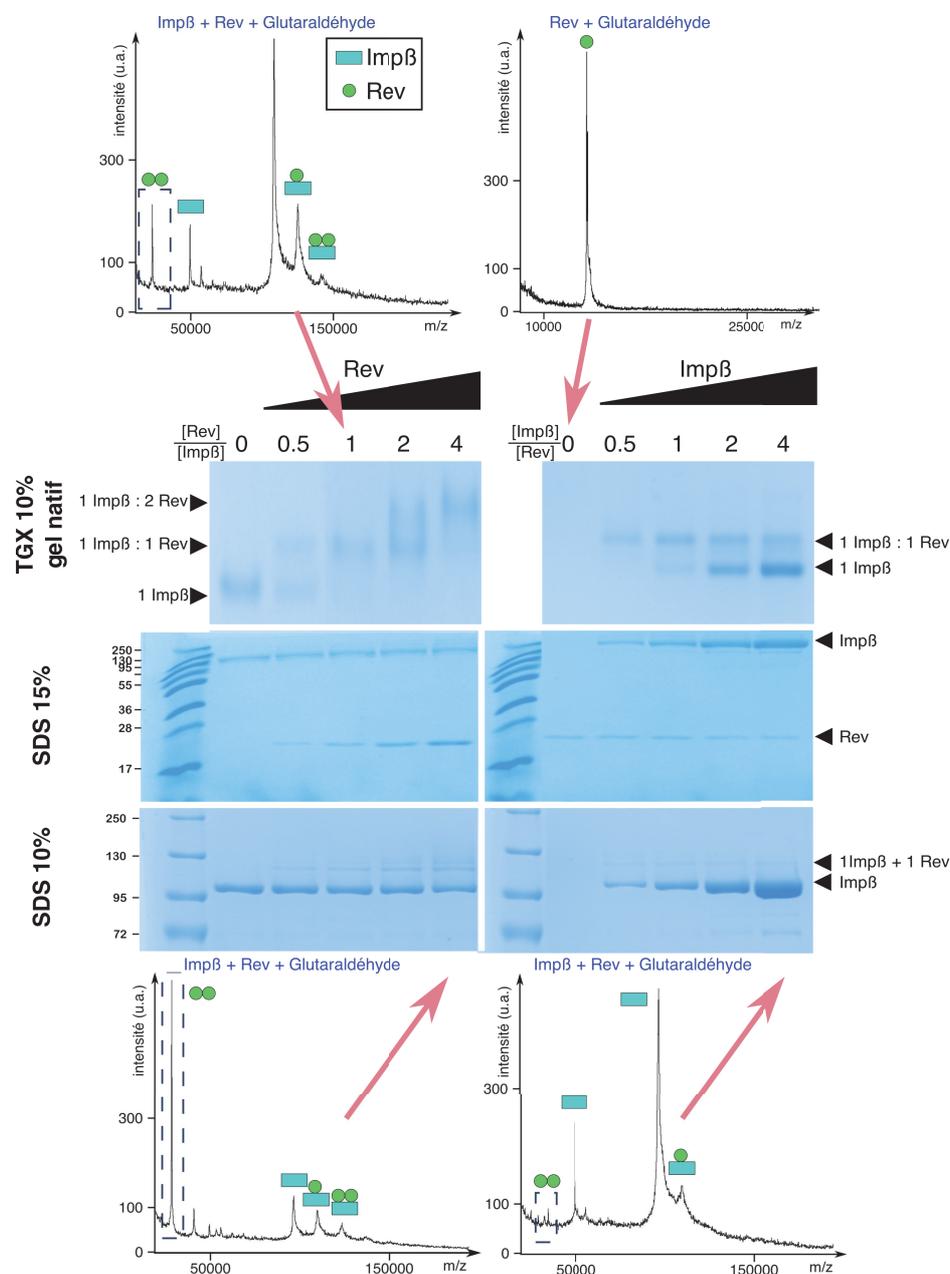


FIGURE 2.27 – Réticulation du complexe Imp β /Rev^{V16D/I55N} à l'aide du glutaraldéhyde. Gels électrophorétiques (natifs et dénaturant à 10% ou 15% d'acrylamide) des protéines Rev^{V16D/I55N} et Imp β seules ou en complexe avec différents ratios. La valeur en haut des gels correspondent à la quantité relative du partenaire ajouté par rapport à respectivement Imp β (à gauche) et Rev (à droite). Les spectres MALDI-TOF obtenus sur certains échantillons sont représentés également (indiqués par des flèches rouges). Il est ajouté au spectre de façon schématisée Rev (en vert) et Imp β en respectant la stœchiométrie observée expérimentalement.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.9. $\text{Imp}\beta$ FIXE DEUX MONOMÈRES DE $\text{REV}^{V16D/I55N}$

tion et l'attribution des spectres obtenus ont été réalisées par Elisabetta Boeri Erba, chercheuse dans notre groupe de recherche.

Les données obtenues avec $\text{Imp}\beta$ seule sont présentées sur la **Figure 2.28**. Par rapport au spectre obtenu sous conditions dénaturantes (**Figure D.2 (a)**), nous pouvons voir que la protéine est dans un état moins chargé : elle présente un état de charge compris uniquement entre 18 et 21. Nous retrouvons ces mêmes pics dans les spectres des complexes $\text{Imp}\beta/\text{Rev}^{V16D/I55N}$ et $\text{Imp}\beta/\text{Rev}_{4-69}^{V16D/I55N}$, mais en plus nous pouvons observer des pics correspondant à $\text{Imp}\beta$ en complexe avec une ou deux copies de Rev (**Figure 2.28 (b)** et **Figure 2.28 (c)**).

Ces résultats confirment encore une fois qu' $\text{Imp}\beta$ peut fixer jusqu'à deux molécules de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
 2.9. IMP β FIXE DEUX MONOMÈRES DE REV^{V16D/I55N}

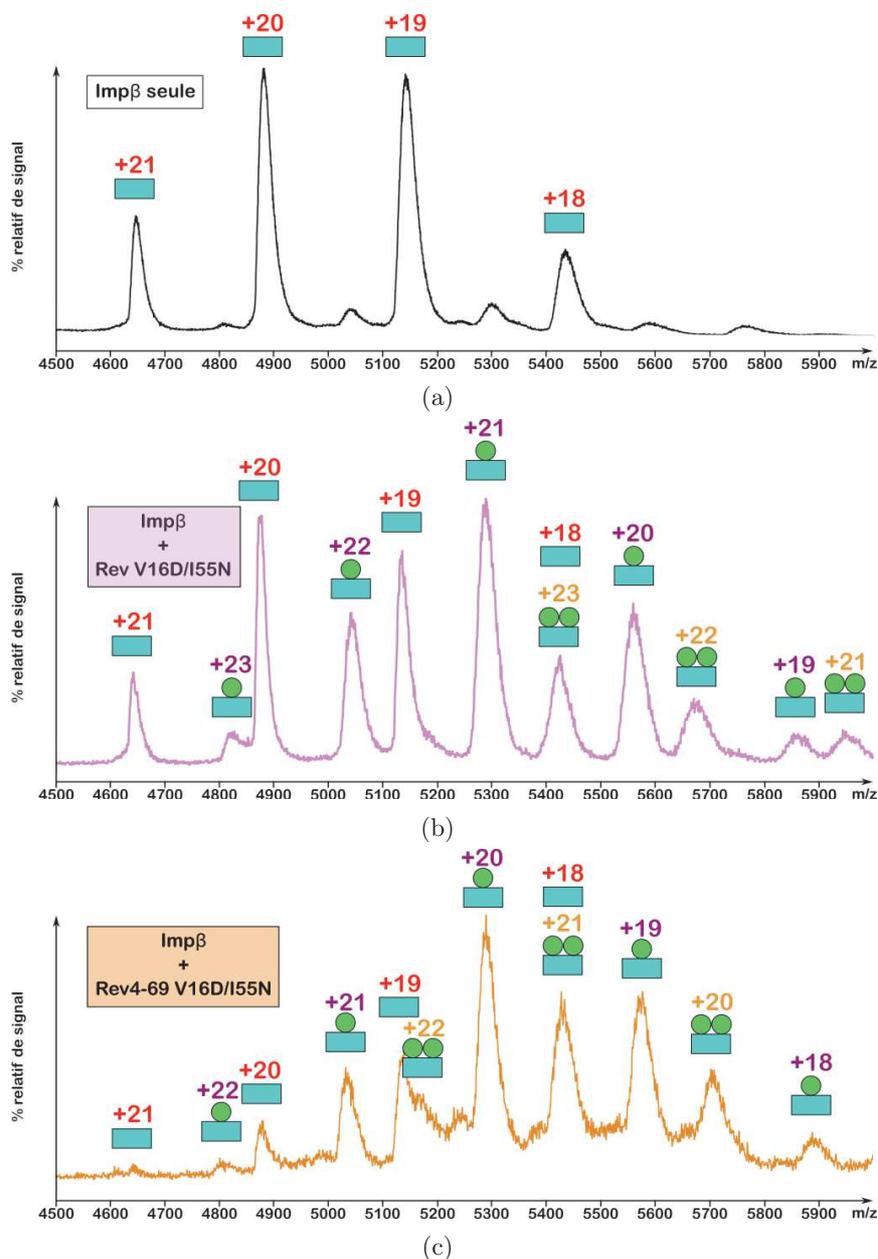


FIGURE 2.28 – Spectrométrie de masse en conditions natives. Imp β est représentée en bleu et Rev en vert. Les états de charge sont indiqués. (a) Spectre obtenu avec Imp β seule. (b) Spectre obtenu avec le complexe Imp β /Rev^{V16D/I55N}. (c) Spectre obtenu avec le complexe Imp β /Rev₄₋₆₉^{V16D/I55N}.

2.10 $\text{Imp}\beta$ fixe un seul monomère de Rev^{V16D}

2.10.1 Analyse par spectrométrie de masse en condition native

Afin de vérifier si la stœchiométrie de 1 : 2 observée ci-dessus était provoquée par la mutation V16D/I55N de Rev j'ai essayé d'analyser le complexe d' $\text{Imp}\beta$ avec Rev^{WT} par spectrométrie de masse native. Malheureusement, cette analyse n'a pas été concluante pour des raisons techniques. Par contre, j'ai pu réaliser une analyse avec Rev^{V16D} , le mutant qui, d'après nos expériences de SEC/MALLS et comme le montre également la littérature, se comporte majoritairement sous une forme dimérique (**Figure 2.9**, cf. 2.3.3, page 49 ; Jain and Belasco, 2001). Les résultats des ces expériences sont présentés dans la **Figure 2.29**. Comme observé précédemment pour le complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}^{V16D/I55N}$, des pics correspondants à $\text{Imp}\beta$ seule et en complexe avec une copie de Rev^{V16D} sont observés. Par contre, aucun pic correspondant à $\text{Imp}\beta$ en complexe avec deux molécules de Rev^{V16D} n'a pu être détecté. Ce résultat est plutôt étonnant, car il indique qu' $\text{Imp}\beta$ favorise la dissociation du dimère de Rev^{V16D} , alors qu'en même temps elle est capable d'interagir avec deux copies de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$. De plus, le fait qu' $\text{Imp}\beta$ ne fixe qu'une seule copie de Rev^{V16D} suggère que la stœchiométrie de 1 : 2 observée pour le complexe avec $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ pourrait être un artefact dû à la mutation I55N. Cependant, d'autres interprétations sont possibles et sont discutées en détail plus loin.

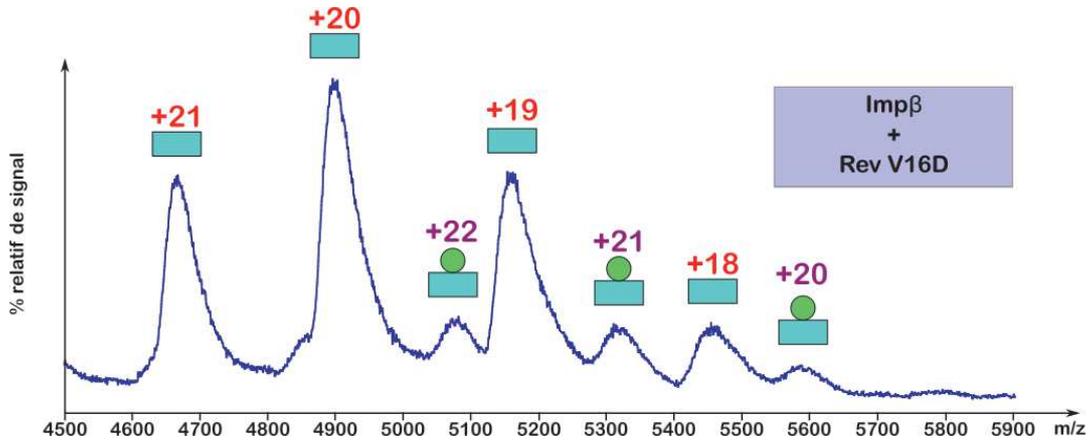


FIGURE 2.29 – Spectrométrie de masse en condition native sur le complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev V16D}$. $\text{Imp}\beta$ est représenté avec des rectangles bleu, Rev^{V16D} avec des cercles vert. Enfin l'état de charge des espèces observées est indiqué en rouge.

2.11 L'interaction $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$ est enthalpiquement favorisée

Afin d'obtenir encore plus d'informations sur le complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$ nous avons récemment commencé à étudier cette interaction par titration calorimétrique isotherme (*Isothermal Titration Calorimetry*, (ITC)). Ces études ont été réalisées en collaboration avec Andrés Palencia, responsable de la plateforme biophysique à l'EMBL-Grenoble. Il s'agit de données préliminaires qui seront poursuivies dans le futur au sein du laboratoire.

L'ITC permet de mesurer la chaleur de réaction dégagée ou absorbée lorsque deux espèces sont mélangées, donnant ainsi accès aux paramètres thermodynamiques (ΔH , ΔS et ΔG) et par ce fait à la constante de dissociation (K_D). Cependant, cette technique est problématique puisqu'elle est sensible à tout phénomène libérant ou absorbant de la chaleur. Ainsi, un changement de conformation ou d'état oligomérique d'une des espèces lors de l'interaction peut se traduire par une libération ou absorption d'énergie qui complique l'analyse des données. Par conséquent, afin de simplifier l'analyse nous avons décidé de commencer notre étude par le mutant $\text{Rev}^{\text{V16D/I55N}}$, qui est monomérique en solution, au lieu de Rev^{WT} ou de Rev^{V16D} , qui sont sous une forme oligomérique et doivent ainsi se dissocier avant de pouvoir

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.11. L'INTERACTION IMP β /REV EST ENTHALPIQUEMENT FAVORISÉE

fixer Imp β .

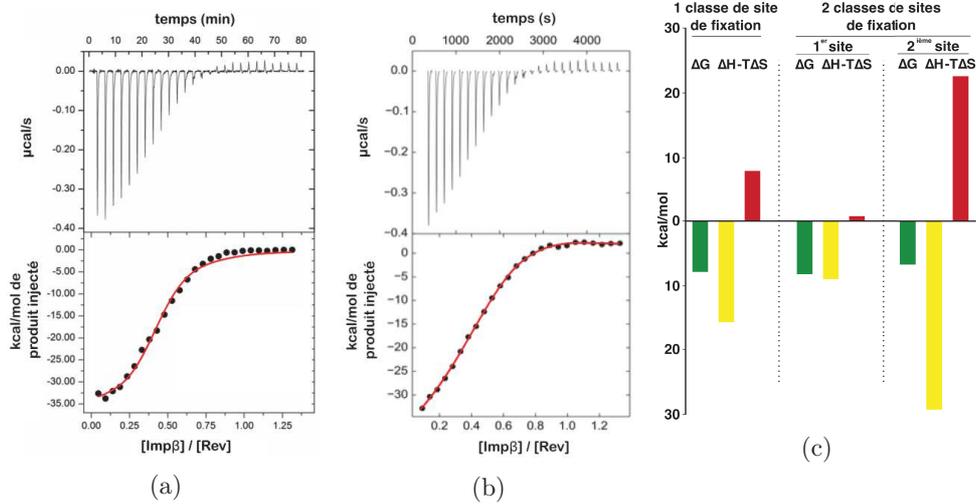


FIGURE 2.30 – **Titration calorimétrique isotherme d'Imp β /Rev.** (a) Données brutes modélisées avec une seule classe de site de fixation de Rev sur Imp β . (b) Modélisation avec deux classes de sites de fixation de Rev sur Imp β . (c) Paramètres thermodynamiques pour la modélisation avec une seule ou avec deux classes de sites. L'enthalpie libre (ΔG) est indiquée en vert, l'enthalpie (ΔH) en jaune, et la contribution entropique ($-\Delta S$) en rouge.

La chaleur dégagée en fonction du temps de réaction lorsque Rev^{V16D/I55N} est mélangé avec Imp β est montrée dans la **Figure 2.30 (a) et (b)**. L'intégration de ces données et leur modélisation en postulant une seule classe de sites d'interaction est montré dans la **Figure 2.30 (a)**. D'après ce modèle, le nombre de molécules de Rev interagissant avec chaque molécule d'Imp β est estimé à 2.3, en accord avec nos résultats biochimiques et biophysiques concernant la stœchiométrie du complexe. L'affinité d'Imp β pour Rev est estimée avoir une constante de dissociation de $K_D = 617 \pm 48$ nM, similaire à la valeur de 220 nM obtenue par polarisation de fluorescence (**Figure 2.21**).

Cependant, il n'y a aucune raison de penser que les deux molécules de Rev doivent fixer Imp β avec la même affinité. En effet, vu qu'Imp β est une molécule asymétrique, il est fort probable que les deux sites de fixation soient stéréochimiquement différents. Nous avons donc modélisé les données ITC en supposant deux sites de fixation indépendants. Comme le montre la **Figure 2.30 (b)**, la concordance entre les données observées et la courbe de modélisation théorique semble meilleure pour

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.11. L'INTERACTION IMP β /REV EST ENTHALPIQUEMENT FAVORISÉE

ce nouveau modèle que pour le modèle supposant une seule classe de sites. D'après ce nouveau modèle, les constantes de dissociation sont de $K_{D1} = 0.8 \mu\text{M}$ pour le premier site et $K_{D2} = 9.1 \mu\text{M}$ pour le deuxième site. Autrement dit, la première molécule de Rev fixerait Imp β avec une affinité 11.5 fois supérieure à celle de la deuxième molécule.

Selon cette modélisation, les valeurs thermodynamiques associées aux deux réactions est de nature très différente, même si les valeurs d'enthalpie libre sont assez proches ($\Delta G_1 = -8.2 \text{ kcal/mol}$ et $\Delta G_2 = -6.8 \text{ kcal/mol}$) (**Figure 2.30 (c)**). La fixation de la première molécule semble être principalement dominée par une contribution enthalpique ($\Delta H_1 = -9.0 \text{ kcal/mol}$) alors que la contribution entropique est quasiment nulle ($-T\Delta S_1 = +0.77 \text{ kcal/mol}$). Cela suggère que la reconnaissance par Imp β de cette première molécule de Rev n'a presque aucune conséquence sur le dynamisme conformationnel et les degrés de liberté de ces deux protéines. De plus, ces résultats suggèrent une interaction majoritairement réalisée par des liaisons hydrogènes ou par des ponts salins. Par contre, l'interaction de la deuxième molécule est associée à une contribution enthalpique ($\Delta H_2 = -29.3 \text{ kcal/mol}$) trois fois supérieure à celle de la première copie de Rev, mais aussi à une forte pénalité entropique ($-T\Delta S_2 = 22.5 \text{ kcal/mol}$). Ceci suggère que la reconnaissance de la deuxième molécule de Rev implique la formation de plus de ponts salins et/ou des liaisons hydrogènes que celle de la première molécule, mais aussi qu'il y a une importante réduction dans la flexibilité globale du système. Cette réduction pourrait, par exemple, être due à l'immobilisation d'un grand nombre de chaînes latérales d'Imp β et/ou Rev, au verrouillage de la conformation superhélicoidale d'Imp β , ou à une diminution du degré du désordre de la partie C-terminale de Rev. Des expériences prévues avec d'autres mutants (y compris la forme tronquée Rev₄₋₆₉^{V16D/I55N}) devraient nous aider à éclaircir cette question.

2.12 Un nombre limité de configurations d'Imp β /Rev

2.12.1 Étape 1 : identification des résidus d'Imp β susceptibles d'interagir avec Rev

Afin d'obtenir une meilleure compréhension de la façon dont Rev interagit avec Imp β , j'ai effectué une étude d'amarrage moléculaire *in silico*. Cette étude a été menée avec la forte participation de mon directeur de thèse Carlo Petosa. Pour simplifier cette tâche, nous avons émis trois hypothèses de travail :

1) Nous avons supposé que les conformations d'Imp β et de Rev dans le complexe Imp β /Rev sont similaires à celles d'Imp β en complexe avec l'IBB (PDB ID 1QGK ; Cingolani et al., 1999) et de Rev en complexe avec le fragment F_{ab} (PDB ID 2X7L ; DiMattia et al., 2010), respectivement. Cette supposition doit être considérée comme approximative puisque les différentes structures connues d'Imp β montrent une variabilité conformationnelle assez importante (cf. 1.3.8, page 32 ; Forwood et al., 2010). Par contre, la conformation de Rev semble être relativement constante parmi les différentes structures cristallines connues (cf. 1.2, page 12). Par convention et sauf indication contraire, le terme "Rev" sera utilisé dans cette section pour indiquer uniquement la partie N-terminale composée de l'épingle hélicale (résidus 9-65) dont la structure cristallographique est connue.

2) Étant donné que les surfaces de Rev et d'Imp β sont riches en résidus basiques et acides, respectivement, nous avons supposé que l'interaction entre ces deux protéines comporte une composante électrostatique importante. Cette hypothèse est étayée par le fait que du selon nos expériences d'ITC, la liaison de Rev à Imp β est associée à une grande variation négative de l'enthalpie (ΔH ; cf. 2.11, page 83).

3) Comme Rev et le peptide Rev-NLS interagissent avec Imp β en compétition avec Imp α (cf. 2.8.1, page 71 ; Henderson and Percipalle, 1997), nous avons supposé un chevauchement des sites de liaison d'Imp α et de Rev sur la surface d'Imp β . Autrement dit, à partir d'une superposition des structures des complexes d'Imp β /IBB et d'Imp β /Rev, on s'attendrait à voir un chevauchement de certains atomes de Rev avec certains atomes de l'IBB. En principe, la compétition observée entre Rev et

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
 2.12. UN NOMBRE LIMITÉ DE CONFIGURATIONS D'IMP β /REV

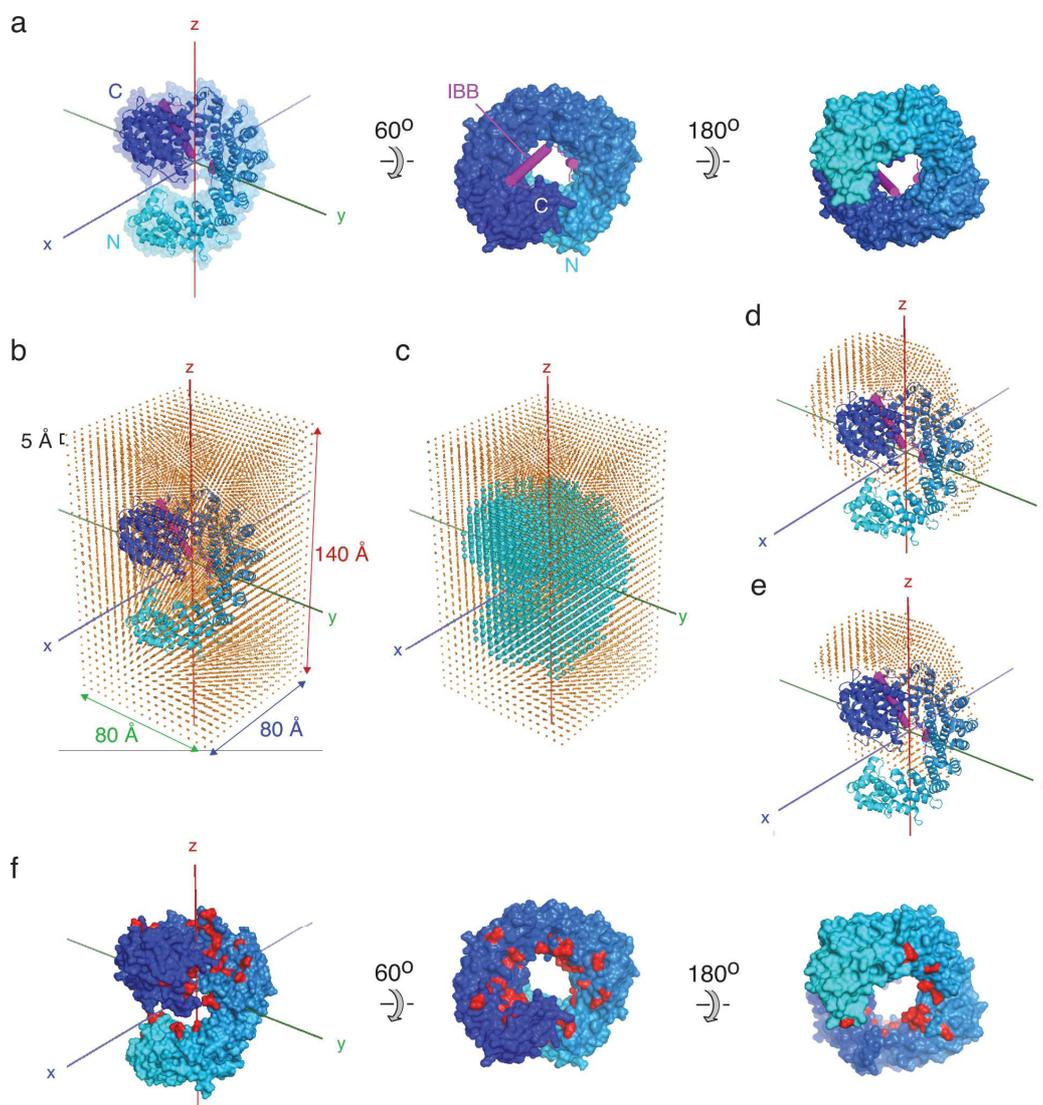


FIGURE 2.31 – **Identification des résidus acides d'Imp β susceptibles d'interagir avec Rev.** (a) Structure d'Imp β en complexe avec le domaine IBB d'Imp α (Cingolani et al., 1999; PDB ID 1QGK). (b) Points de grille utilisés afin de définir le volume de recherche pour le positionnement du centre de gravité de Rev ($17 \times 17 \times 29 = 8381$ points). (c) Volume exclu par Imp β . En bleu sont montrés les 2151 points de grille où le centre de gravité de Rev ne peut pas être positionné à cause de l'encombrement stérique qu'un tel positionnement provoquerait avec Imp β . (d) Points de la grille à moins de 30 Å de l'IBB (1436 points). (e) Sous-ensemble des points qui sont topologiquement accessibles à l'IBB (1021 points). (f) Résidus acides d'Imp β (en rouge) qui pourraient potentiellement interagir avec Rev dans une configuration où Rev empêcherait la fixation de l'IBB à Imp β .

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.12. UN NOMBRE LIMITÉ DE CONFIGURATIONS D'IMP β /REV

Imp α pourrait également s'expliquer par un effet allostérique, par lequel la fixation de Rev stabiliserait une conformation d'Imp β incompatible avec la fixation d'Imp α (sans chevauchement des sites de liaison de Rev et d'Imp α). Cependant cette situation nous paraît moins probable.

Nous avons exploité ces trois hypothèses pour essayer d'identifier les résidus d'Imp β susceptibles d'interagir avec Rev. Nous avons d'abord positionné la structure d'Imp β à l'origine d'un système de coordonnées cartésien et nous l'avons orientée de façon à ce que son axe superhélicoïdal soit parallèle à l'axe z, comme montré dans la **Figure 2.31 (a)**. Compte tenu des dimensions d'Imp β et de Rev, lorsque Rev fixe Imp β , son centre de gravité doit se situer dans une boîte autour d'Imp β de dimensions 80 Å x 80 Å x 140 Å, comme le montre la **Figure 2.31 (b)**. Nous avons échantillonné ce volume par des points de grille espacés de 5 Å.

Rev ne pouvant pas occuper le même volume qu'Imp β , nous avons retiré tous les points de grille à moins de 6 Å des atomes d'Imp β (les points indiqués en cyan dans la **Figure 2.31 (c)**), laissant un nombre réduit de points où le centre de gravité de Rev pourrait éventuellement se positionner. Dans la structure de Rev, la distance maximale du centre de gravité à tout atome est de 30 Å. Par conséquent, si les sites de liaison de Rev et de l'IBB se chevauchent, le centre de gravité de Rev doit être à moins de 30 Å d'un atome de l'IBB lorsque les complexes Imp β /IBB et Imp β /Rev sont superposés. Nous avons donc éliminé les points de grille situés à plus de 30 Å de l'IBB, laissant les points représentés sur la **Figure 2.31 (d)**. Enfin, nous avons éliminé les points de grille qui sont topologiquement inaccessibles à l'IBB parce qu'ils sont du mauvais côté d'Imp β . (Ces points n'ont pas une "ligne directe de vue" avec l'IBB. Donc si la structure de Rev était centrée sur ce point, il lui serait impossible d'interagir avec un résidu d'Imp β impliqué dans l'interaction avec l'IBB sans subir un encombrement stérique avec une autre partie d'Imp β). Cela laisse des points de grille qui définissent un volume assez restreint dans lequel le centre de gravité de Rev doit se situer (**Figure 2.31 (e)**).

Les résidus d'Imp β qui se trouvent à moins de 30 Å et qui sont topologiquement accessibles à ces points de grille définissent la surface potentielle d'interaction d'Imp β avec Rev. Cette surface comprend 68 résidus acides (31 Asp et 37 Glu, sur un total de 124 résidus acides dans Imp β), représentés en rouge dans la **Figure 2.31 (f)**.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.12. UN NOMBRE LIMITÉ DE CONFIGURATIONS D'IMP β /REV

Ces résidus se situent principalement sur la surface intérieure concave d'Imp β , sur les hélices B des répétitions HEAT et sur les boucles reliant les hélices A et B. En accord avec l'hypothèse du caractère électrostatique de l'interaction, ces résidus acides ainsi que les 14 résidus basiques des structures cristallographiques connues de Rev (**Figure 2.32**) sont susceptibles d'être impliqués dans l'interface du complexe. Ces résidus sont résumés dans le **Tableau 2.4**.

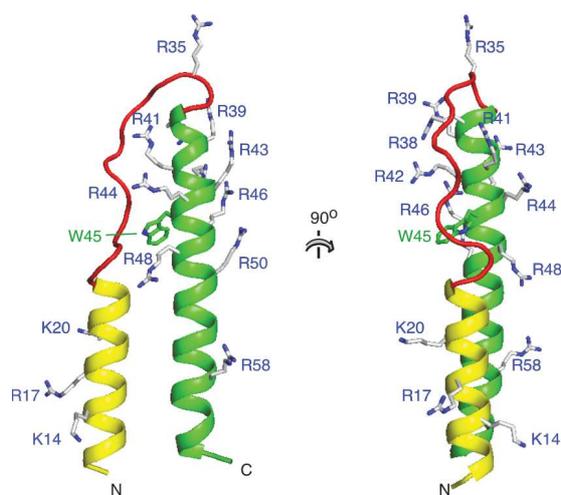


FIGURE 2.32 – Résidus basiques de Rev. Structure du domaine N-terminal de Rev (PDB ID 2X7L). Les résidus basiques définis comme actifs dans le programme HADDOCK sont mis en évidence.

TABLEAU 2.4 – Résidus chargés d'Imp β et de Rev, susceptibles d'interagir dans le complexe Imp β /Rev. Ces résidus ont été définis comme "actifs" dans le programme HADDOCK.

Impβ										
D14,	E19,	E26,	D69,	D71,	E144,	E148,	E152,	D160,	D162,	
E164,	E203,	D230,	D273,	E274,	E281,	D288,	E289,	D292,	E296,	
E299,	E302,	E308,	E335,	D337,	D338,	D339,	D340,	D341,	E360,	
D384,	E395,	E398,	D426,	E437,	E441,	E479,	E483,	D486,	D489,	
D490,	E492,	E493,	E530,	E534,	D579,	E626,	D627,	E637,	E642,	
E663,	D676,	D719,	D751,	D753,	D756,	E760,	E763,	E767,	D779,	
E781,	D802,	E808,	D809,	D812,	D824,	E849,	E868			
Rev										
K14,	R17,	K20,	R35,	R38,	R39,	R41,	R42,	R43,	R44,	
R46,	R48,	R50,	R58							

2.12.2 Étape 2 : Amarrage moléculaire (*Docking*) par HADDOCK

Afin de réaliser l'amarrage entre Rev et Imp β , nous avons utilisé le logiciel HADDOCK (de Vries et al, 2010). HADDOCK exploite des informations biochimiques des résidus impliqués dans l'interaction intermoléculaire, comme des termes énergiques à minimiser au cours des différentes étapes du protocole d'amarrage (cf. 4.15, page 164). Les résidus ayant une forte probabilité d'être impliqués dans l'interaction sont définis comme "actifs", tandis que ceux avec une plus faible probabilité sont définis comme "passifs". Dans notre cas, nous avons défini comme actifs les 68 résidus acides d'Imp β et les 14 résidus basiques de Rev préalablement identifiés et décrits ci-dessus (**Tableau 2.4**; **Figures 2.31 (f) et Figure 2.32**), et comme passifs tous les résidus exposés en surface à moins de 12 Å d'un résidu actif. Nous avons ensuite utilisé le logiciel comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes (cf. 4.15, page 164).

En tout, HADDOCK a identifié 200 configurations pour le complexe Imp β /Rev. Pour chaque configuration, le programme calcule un "score" en fonction de la surface enterrée dans l'interface et des énergies d'interactions (somme des termes énergiques c'est-à-dire électrostatique, Van Der Waals, etc.). Ce score est exprimé en unité arbitraires (score HADDOCK) ainsi qu'en unités d'écart-type par rapport à la moyenne (Z-score). Plus le score est négatif, plus la configuration est calculée comme énergétiquement favorable. Les 200 scores sont représentés par des petits carrés et triangles dans la **Figure 2.33 (a)**, où ils sont tracés en fonction de l'iRMSD (le RMSD calculé pour la chaîne principale des résidus situés dans l'interface) avec la configuration ayant le score le plus bas.

En analysant les 200 configurations, HADDOCK a identifié 8 regroupements, ou "clusters", de structures similaires (chacun composé d'au moins quatre configurations dont la valeur moyenne d'iRMSD calculée par paires est inférieure à 1 Å). A titre d'illustration, 20 configurations appartenant au Cluster 1 sont superposées dans la **Figure 2.33 (b)**. Les scores HADDOCK des quatre meilleures configurations de chaque cluster sont moyennés (grands carrés et triangles dans **Figure 2.33 (a)**) et utilisés pour classer les clusters. Plus le score d'un cluster est négatif et plus

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.12. UN NOMBRE LIMITÉ DE CONFIGURATIONS D'IMP β /REV

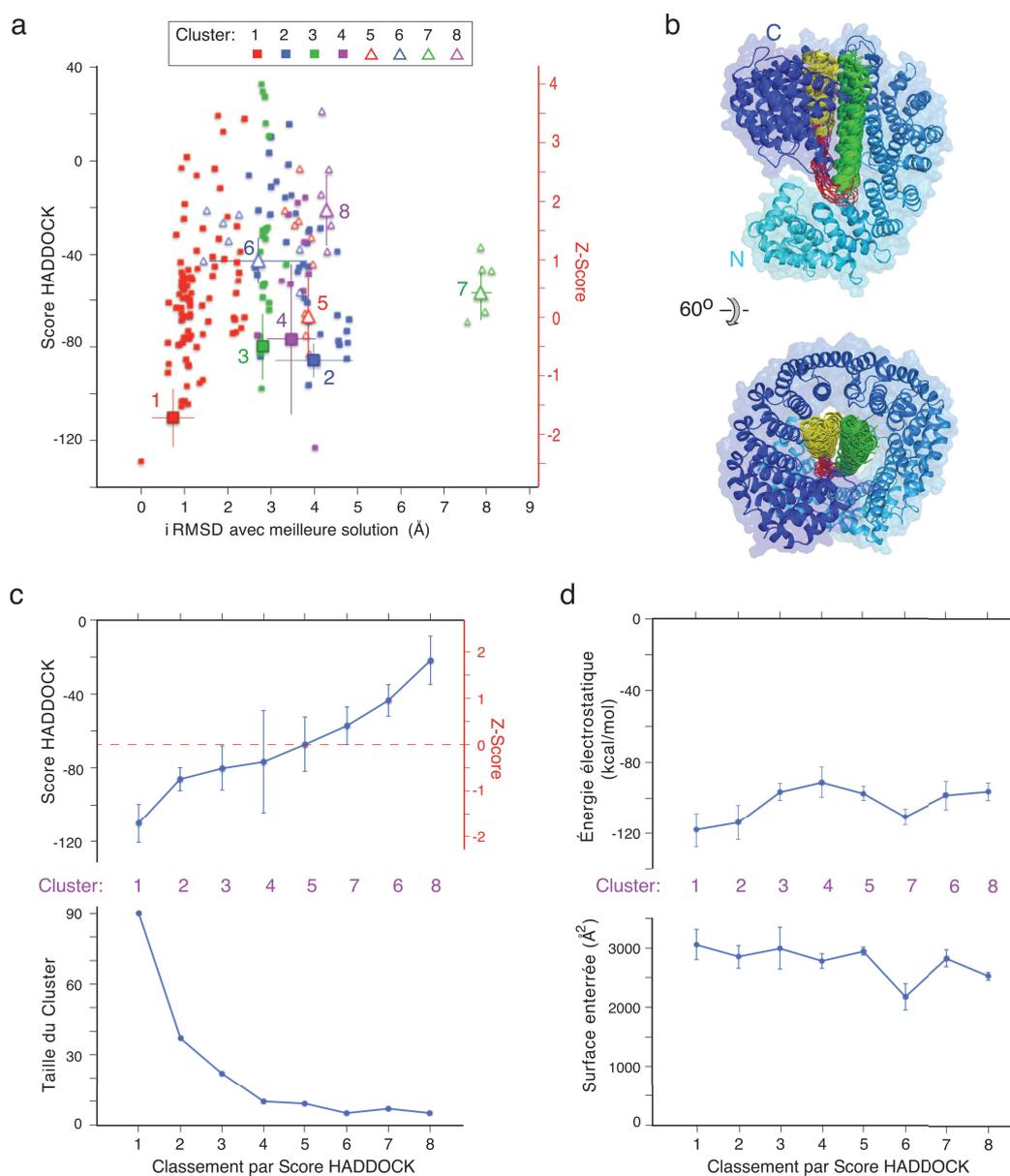


FIGURE 2.33 – Résultats d'amarrage moléculaire par HADDOCK. (a) Valeurs de score des 200 configurations déterminées par HADDOCK, tracées en fonction de l'iRMSD avec la structure de plus basse énergie. Les configurations appartenant aux différents clusters sont colorées comme indiqué dans la légende au-dessus de la figure. (b) Superposition des 20 meilleures structures du Cluster 1. Les hélices N- et C-terminales de Rev sont en jaune et vert, respectivement, et la boucle interhélicale est en rouge. (c) Taille et score HADDOCK (moyenne des quatre meilleures configurations) de chaque cluster. (d) Énergie électrostatique et surface enterrée (moyennes des quatre meilleures configurations) de chaque cluster.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.12. UN NOMBRE LIMITÉ DE CONFIGURATIONS D'IMP β /REV

sa taille en nombre de membres est importante, plus la solution est favorable. Les statistiques des 8 clusters sont résumées dans les **Figures 2.33 (c) et (d)** et dans le **Tableau 2.5**. La meilleure structure dans chaque cluster est montrée dans la **Figure 2.34**.

TABLEAU 2.5 – **Statistiques des clusters identifiés par HADDOCK.**

Cluster	1	2	3	4	5	6	7	8
Taille du cluster	90	37	22	10	9	7	5	5
Score HADDOCK	-110	-85.9	-79.9	-76.5	-67.0	-43.3	-57.1	-21.7
	± 10.6	± 6.2	± 12.0	± 27.7	± 14.6	± 8.6	± 10.2	± 13.0
Classement par Score HADDOCK	1	2	3	4	5	7	6	8
RMSD de la structure d'énergie plus basse (Å)	0.7	4.0	2.8	3.5	3.9	2.7	7.9	4.3
	± 0.4	± 0.8	± 0.1	± 0.5	± 0.1	± 1.0	± 0.2	± 0.1
Énergie van der Waals (kcal/mol)	-44.8	-40.6	-39.5	-41.7	-35.8	-25.1	-19.0	-21.5
	± 12.6	± 8.2	± 19.5	± 6.9	± 5.2	± 2.4	± 11.3	± 6.4
Énergie électrostatique (kcal/mol)	-1179.5	-1137.5	-963.8	-909.6	-973.1	-985.9	-1106.0	-966.3
	± 95.7	± 95.9	± 48.5	± 83.5	± 39.5	± 80.7	± 45.2	± 50.3
Surface enterrée (Å ³)	3046.2	2839.7	2983.2	2772.4	2935.9	2823.9	2168.3	2525.7
	± 251.5	± 188.5	± 351.4	± 125.5	± 67.7	± 141.6	± 217.6	± 67.7
Z-score	-1.7	-0.7	-0.5	-0.3	0.0	1.0	0.4	1.8

Le Cluster 1 a un score nettement meilleur et comporte beaucoup plus de membres que les autres clusters (Z-score de -1.7 et 90 membres comparé à un Z-score de -0.7 et 37 membres pour le Cluster 2). Cependant, tous les clusters montrent des interfaces raisonnables, caractérisées par de nombreux ponts salins, liaisons hydrogène et interactions de type Van Der Waals. En effet, pour tous les clusters, au moins la moitié des résidus basiques de Rev sont impliqués dans des ponts salins avec des résidus acides d'Imp β (**Tableau 2.6**). D'ailleurs, pour tous les clusters, Rev interagit avec la surface concave d'Imp β de façon à donner lieu à un encombrement stérique avec l'IBB. Par conséquent, il est difficile de valider ou d'invalider un cluster de modèles.

Dans chaque cluster, l'axe longitudinal de Rev est orienté de façon plus ou moins parallèle à l'axe superhélicoïdal d'Imp β ; cependant, l'orientation précise varie de façon significative (**Figure 2.34**). Par exemple, dans le Cluster 1 Rev interagit principalement avec les répétitions HEAT 4-5, 7 et 15-17. Dans le Cluster 2, Rev interagit aussi avec les répétitions 7 et 15-17 mais une différence d'orientation de 55° fait en sorte qu'elle interagit avec les répétitions 9-11 au lieu des répétitions 4-5. Dans le Cluster 3, Rev occupe à peu près le même volume que dans le Cluster 1 mais est tournée de $\approx 180^\circ$ autour de son axe longitudinal, inversant ainsi l'emplacement des hélices N- et C-terminales. Le Cluster 4 ressemble aussi au Cluster 1 sauf que

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.12. UN NOMBRE LIMITÉ DE CONFIGURATIONS D'IMPβ/REV

TABLEAU 2.6 – Ponts salins entre Impβ et Rev observés dans les configurations calculées par HADDOCK. Les données sont triées selon l'ordre des résidus de Rev (tableau A) ou d'Impβ (tableau B).

A.								
Rés. basique de Rev	Résidu acide d'Impβ							
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7	Cluster 8
K14	E637	---	---	---	---	E479, E534	---	E760
R17	D676	D486	E483	D824	E492	E530	---	D756
K20	E763, E767	---	E437, E479	E767	D486	E626, D627	D339, D340	D288, D292
R35	E152	---	E152	D337	D340	---	D812, E849	---
R38	E203	D756, E760	---	---	D339	---	---	E274
R39	E203	D753, D756	---	E395	D340	E152	E299	---
R41	---	---	---	E530	---	---	---	---
R42	D753	D756	---	E437	E530	---	D288, D292	E274
R43	E281	D288	D753	E437, E479	---	---	D756	---
R44	---	---	D753	E530, E534	---	E274	D753, E760	---
R46	E289, D292	D756	---	E437	E626	---	D288, E289	D341
R48	---	E437	D756	---	---	---	---	---
R50	D288	D292, E299	---	E483	E626	E203	E281	D340
R58	E437, E479	E398	E763, E767	E492	E763, E767	D288, D292	---	E626, D627
B.								
Rés. acide d'Impβ	Résidu basique de Rev							
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7	Cluster 8
E152	R35		R35			R39		
E203	R38, R39					R50		
E274						R44		R38, R42
E281	R43						R50	
D288	R50	R43				R58	R42, R46	K20
E289	R46						R46	
D292	R46	R50				R58	R42	K20
E299		R50					R39	
D337				R35				
D339					R38		K20	
D340					R35, R39		K20	R50
D341								R46
E395				R39				
E398		R58						
E437	R58	R48	K20	R43, R46				
E479	R58		K20	R43		K14		
E483			R17	R50				
D486		R17			K20			
D490					R17			
E530				R44	R42	R17		
E534				R44		K14		
E626					R46, R50	K20		R58
D627						K20		R58
E637	K14							
D676	R17							
D753	R42	R39	R43				R44	
D756		R38, R39, R42, R46	R48				R43	R17
E760		R38					R44	K14
E763	K20		R58		R58			
E767	K20		R58	K20	R58			
D812							R35	
D824				R17				
E849							R35	

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.12. UN NOMBRE LIMITÉ DE CONFIGURATIONS D'IMP β /REV

Rev est décalé de ≈ 15 Å vers l'extrémité C-terminale d'Imp β . Dans le Cluster 5, Rev occupe le même volume que dans le Cluster 4 mais, comme pour les Clusters 1 et 3, l'emplacement de ses deux hélices est inversé. Enfin, dans les Clusters 6-8, Rev est enfoncé plus profondément à l'intérieur d'Imp β que dans les clusters 1-5.

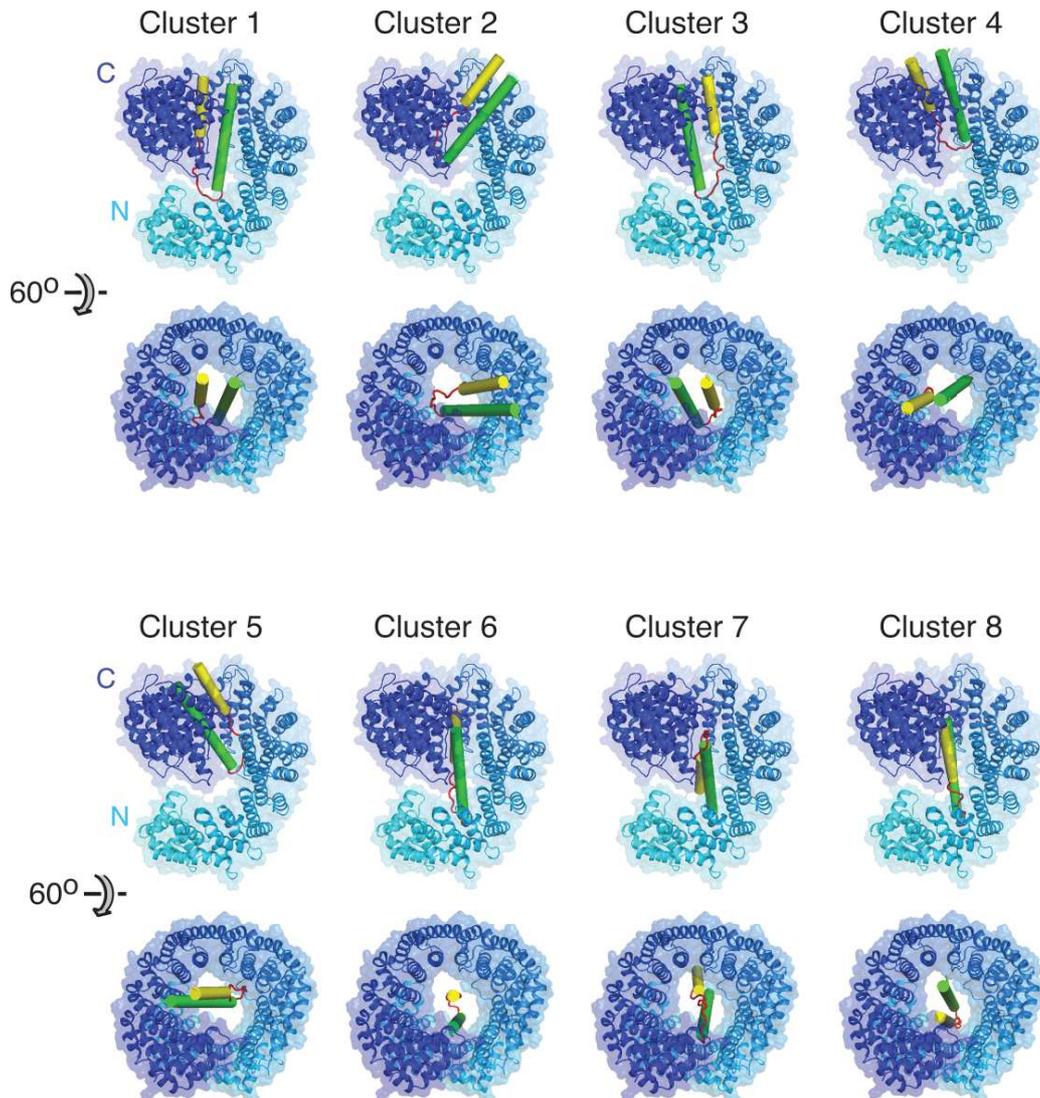


FIGURE 2.34 – Configurations du complexe Imp β /Rev identifiées par HADDOCK. Pour chaque cluster la structure avec le meilleur score HADDOCK est montrée. Les hélices N- et C-terminales de Rev sont en jaune et vert, respectivement, et la boucle interhélicale est en rouge.

De manière intéressante, dans toutes les structures les extrémités N- et C-terminales

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.12. UN NOMBRE LIMITÉ DE CONFIGURATIONS D'IMP β /REV

de Rev sont toujours du côté C-terminal d'Imp β , sauf pour le Cluster 7, où elles se retrouvent du côté N-terminal. Cette différence est montrée sur la **Figure 2.35**, où les 20 premiers résidus de la queue désordonnée C-terminale de Rev ont été modélisés dans une conformation étendue afin de mieux mettre en évidence l'orientation de cette protéine dans le complexe. Parmi toutes les configurations, celle représentée par le Cluster 7 paraît la moins probable, compte tenu du fait que la surface enterrée dans l'interface est la moins importante (2168 Å² comparé à 2500-3000 Å² pour les autres clusters; **Tableau 2.5** et **Figure 2.33 (d)**).

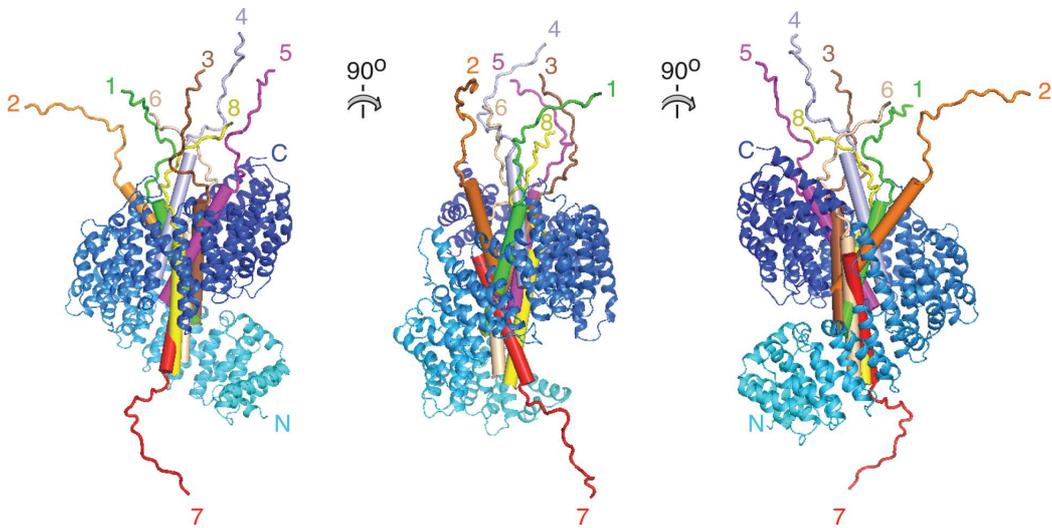


FIGURE 2.35 – Superposition des Clusters 1-8 montrant l'orientation de Rev par rapport à Imp β . Pour chaque cluster la structure avec le meilleur score est montrée. Afin de mieux mettre en évidence l'extrémité C-terminale de Rev, les 20 résidus (rés. 65-85) qui suivent l'hélice C-terminale ont été modélisés dans une conformation étendue (même conformation pour chaque cluster). Pour clarté, les résidus 1-37 (l'hélice N-terminale et la boucle interhélicale) de Rev sont omis.

Dans une expérience de pull-down avec des fusions GST-Rev, il a été montré qu'Imp β interagit avec Rev^{WT} mais pas avec le double mutant R38D/R39L (Henderson et Percipalle, 1997). Nous avons modélisés ces mutations sur les structures des différents Clusters. Dans le cas des Clusters 1, 2, 5 et 8 la double mutation est prédite déstabiliser le complexe de façon significative à cause d'une répulsion électrostatique provoquée par le positionnement du résidu D38 du Rev mutant à côté d'un résidu acide d'Imp β , ainsi qu'à une perte d'un pont salin impliquant le résidu 39 (sauf pour le Cluster 8; **Tableau 2.6**). Pour les Clusters 4, 6 et 7, l'effet des mutations serait

moins important puisqu'elles provoqueraient uniquement la perte d'un pont salin. Pour le Cluster 3 les deux résidus mutés sont loin de la surface d'Imp β , ce qui donne peu de crédit pour les modèles obtenu au sein de ce cluster.

En conclusion, l'étude d'amarrage moléculaire suggère que Rev se lie probablement à la surface concave d'Imp β de manière à ce que son axe longitudinal soit plus ou moins parallèle à l'axe superhélicoïdal des répétitions HEAT, et que ses extrémités N- et C-terminales se trouvent du côté C-terminal d'Imp β . Par contre, il y a au moins quatre configurations du complexe (les Clusters 1, 2, 5 et 8) qui permettraient à la majorité des résidus basiques de Rev d'engager des résidus acides d'Imp β et qui sont compatibles avec des données de mutagenèse publiées (Henderson and Percipalle, 1997). Par conséquent, des données expérimentales supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir mieux évaluer ces différentes hypothèses structurales.

2.13 Analyse du complexe Imp β /Rev par SAXS

2.13.1 Paramètres déterminés indépendamment d'un modèle atomique

Nous avons ensuite décidé d'étudier le complexe Imp β /Rev par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Cette technique donne des informations utiles sur la taille et la forme tridimensionnelle des macromolécules en solution, mais à une résolution bien inférieure à celle qu'on peut obtenir par la cristallographie (pour revue : Petoukhov et al., 2012; Mertens and Svergun, 2010). Avec la ligne de lumière BM29 du synchrotron de l'ESRF, il est possible de mesurer des données SAXS sur un échantillon en sortie d'une colonne de gel filtration. Cette configuration permet d'améliorer la qualité des données en réduisant le nombre d'espèces moléculaires contribuant au spectre de diffusion. Nous avons utilisé cette configuration pour collecter des données SAXS sur la protéine Imp β , seule ou en complexe avec Rev^{V16D}, Rev^{V16D/I55N}, ou Rev₄₋₆₉^{V16D/I55N}. Ces données ont été collectées avec l'aide de Marjolaine Noirelerc de notre équipe, et analysées avec l'aide d'un collègue de notre institut, Frank Gabel, expert dans l'interprétation des données SAXS. Pour chaque

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

échantillon, l'analyse des données nous a permis de calculer le rayon de giration (R_g) et la distance interatomique maximale (D_{max} ; **Tableau 2.7 (a)**) et de tracer la distribution des distances interatomiques (**Figure 2.36 (a)**). Pour comparaison, nous avons également déterminé les valeurs de ces paramètres à partir des structures cristallines connues d'Imp β (**Tableau 2.7 (b)** et **Figure 2.36 (b)**).

TABLEAU 2.7 – Dimensions moléculaires d'Imp β . A. Valeurs de rayon de giration (R_g) et distance interatomique maximale (D_{max}) déterminées par SAXS.

B. Valeurs de R_g et D_{max} calculées pour les structures cristallines connues. Seulement les structures contenant Imp β entière ont été considérées.

1 stœchiométrie attendue selon nos analyses biochimiques et biophysiques.

2 Pour les références, voir Tableau 1.3

3 Sauf indication contraire Imp β signifie la protéine humaine. Sc = *Saccharomyces cerevisiae*, Mm = *Mus musculus*.

4 Les valeurs de R_g et D_{max} ont été calculées avec le logiciel Moleman2 (<http://xray.bmc.uu.se/usf>).

A.							
Expérience	Echantillon	¹ Imp β :Rev	R_g (Å)	D_{max} (Å)	R_g (Å)	D_{max} (Å)	
1	Imp β	1:0	37.0 ± 0.3	125 ± 10			
2	Imp β + Rev ^{V16D}	1:1			42.5 ± 0.3	155 ± 10	
3	Imp β + Rev ^{V16D/155N}	1:2			40.1 ± 0.3	135 ± 10	
4	Imp β + Rev ₄₋₆₉ ^{V16D/155N}	1:2			36.7 ± 0.5	120 ± 10	
B.							
² PDB	³ Structure	⁴ Imp β (chaîne isolée)			⁴ Imp β + partenaire		
		Chaîne	R_g (Å)	D_{max} (Å)	Chaîne	R_g (Å)	D_{max} (Å)
3ND2	(Sc) Imp β	A	31.5	90			
2BKU	(Sc) Imp β + RanGTP	B	35.8	111	B + A	33.8	111
		D	35.9	109	D + C	33.8	109
3EA5	(Sc) Imp β + RanGDP	B	36.7	112	B + A	34.6	112
		D	36.4	110	D + C	34.3	110
2BPT	(Sc) Imp β + Nup1p	A	31.8	93	A + B	32.1	93
+Cargos :							
1QGK	Imp β + Imp α -IBB	A	32.1	93	A + B	31.6	93
1QGR	Imp β + Imp α -IBB	A	31.6	92	A + B	31.4	92
2P8Q	Imp β + Spn1-IBB	A	32.1	94	A + B	31.7	94
2Q5D	Imp β + Spn1-IBB	A	32.0	93	A + C	31.5	93
		B	33.6	105	B + D	33.5	105
3LWW	Imp β + Spn1-IBB	A	32.1	94	A + B	31.7	94
		C	30.6	90	C + D	30.3	90
1UKL	(Mm) Imp β + SREBP-2	A	35.0	109	A + C/D	33.9	109
		B	35.0	112	B + E/F	33.9	112
3W5K	Imp β + Snail1	A	35.7	110	A + B	34.1	110
Gamme observée:		+Cargos :	30.6 – 35.7	90-112	+Cargos :	30.3 – 34.1	90 – 112
			Tous : 30.6 – 36.7	90-112		Tous : 30.3 – 34.6	90 – 112

Pour la protéine Imp β isolée, les valeurs de R_g (37 Å) et de D_{max} (125 Å) sont plus importantes que celles calculées à partir des structures cristallines connues (R_g

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

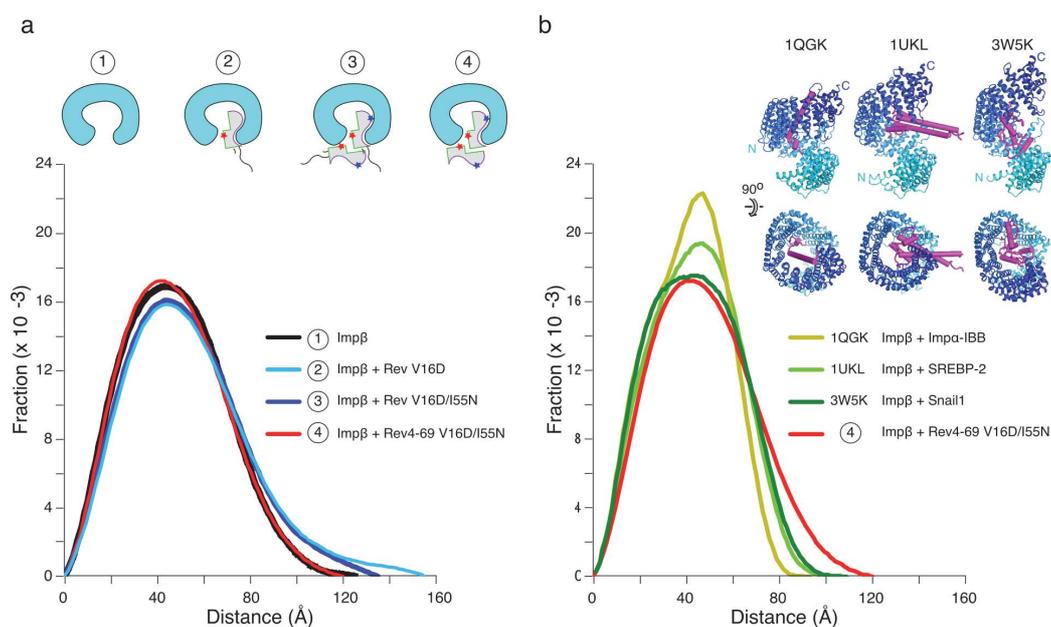


FIGURE 2.36 – **Distribution des distances interatomiques.** Les distributions ont été normalisées pour que l'aire sous la courbe soit égale à 1. (a) Distributions calculées à partir des données SAXS. (b) Distributions calculées à partir des structures cristallines d'Imp β en complexe avec trois cargos différents, Imp α -IBB (jaune), SREBP-2 (vert clair) et Snail1 (vert foncé). La courbe calculée pour le complexe Imp β /Snurportin1-IBB (PDB ID 2PBQ) n'est pas représentée, étant quasiment identique à celle du complexe Imp β /Imp α -IBB. Pour comparaison, la distribution observée pour le complexe Imp β /Rev₄₋₆₉^{V16D/I55N} est représentée en rouge.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS

2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

= 30.6 - 36.7 Å ; D_{max} = 90 - 112 Å ; **Tableau 2.7 (a) et (b)**). Cette différence est probablement due aux partenaires (Ran, cargo, Nups) présents dans la plupart des structures, ainsi qu'aux effets d'empilement cristallin, qui stabilisent une forme plus compacte des répétitions HEAT. En effet, une étude de SAXS a préalablement montré que les protéines Imp β isolées de levure et de souris adoptent des conformations assez étendues en solution (R_g de 39 et 45 Å et D_{max} de 120 et 145 Å , respectivement ; Forwood et al., 2010).

La fixation de Rev^{V16D} à Imp β augmente à la fois la valeur de R_g (jusqu'à 42.5 Å) et celle de D_{max} (jusqu'à 155 Å ; **Tableau 2.7**, Exp. 1 et 2). L'importante augmentation de D_{max} pourrait être attribuée à une stabilisation d'Imp β dans une conformation étendue, ou à la présence de la queue C-terminale de Rev, qui occupe très probablement une position périphérique dans le complexe (ex. **Figure 2.35**). De façon intéressante, le complexe Imp β /Rev^{V16D/I55N}, dont la stœchiométrie est de 1 : 2 (selon nos données biophysiques), présente des valeurs plus petites de R_g (40.1 Å) et de D_{max} (135 Å ; **Tableau 2.7 (a)**, Exp. 2 et 3). Le deuxième monomère de Rev semblerait donc stabiliser une conformation plus compacte d'Imp β et/ou empêcher la queue C-terminale de Rev d'être si étendue. Comme attendu, le complexe impliquant le mutant de Rev sans queue C-terminale, Rev₄₋₆₉^{V16D/I55N}, est plus compact que celui comprenant le mutant entier (**Tableau 2.7 (a)**, Exp. 3 et 4). Pour les trois complexes d'Imp β avec Rev que nous avons étudiés, les valeurs de R_g et de D_{max} sont nettement supérieures à celles des complexes d'Imp β dont les structures sont connues (R_g = 30.3 - 34.6 Å ; D_{max} = 90 - 112 Å ; **Tableau 2.7 (b)**). Parmi les quatre structures connues d'Imp β lié à un cargo, celle qui ressemble le plus aux complexes d'Imp β /Rev est celle qui est la plus étendue (selon la valeur de R_g), à savoir Imp β /Snail1 (Choi et al., 2014). En effet, la **Figure 2.36 (b)** montre que ce complexe présente une distribution de distances interatomiques assez proche à celle d'Imp β /Rev^{V16D/I55N}, ce qui suggère qu'Imp β liée à Rev pourrait adopter une conformation similaire à Imp β liée à Snail1, c'est-à-dire, plutôt étendue.

2.13.2 Modèles à billes calculées *ab initio*

Nous avons ensuite calculé des modèles tridimensionnels *ab initio* à partir des quatre jeux de données SAXS. Des modèles représentatifs de chaque jeu de données sont présentés dans la **Figure 2.37**. Ces modèles ne sont pas uniques, puisque plusieurs modèles sont compatibles avec la même courbe de diffusion. Néanmoins, ils présentent des caractéristiques qui confirment les tendances décrites ci-dessus. Comme le montre la **Figure 2.37**, les quatre structures présentent plus ou moins la même taille et la même forme. Cependant, en accord avec les valeurs calculées de D_{max} , nous remarquons que le volume (tel qu'indiqué par le nombre de billes) est plus grand pour le complexe Imp β /Rev^{V16D}, principalement à cause d'un lobe supplémentaire qui augmente la hauteur modèle de 30-40 Å par rapport aux autres complexes (**Tableau 2.7 (a)**). Les modèles à billes d'Imp β seule et en complexe avec Rev^{V16D/I55N} sont de taille et de forme similaires, alors que le modèle d'Imp β /Rev₄₋₆₉^{V16D/I55N} est considérablement plus petit, en accord avec la délétion des résidus 70-116 de Rev.

Pour avoir une meilleure idée de la forme tridimensionnelle de ces modèles, nous avons comparé le modèle *ab initio* d'Imp β /Rev^{V16D} avec un modèle atomique hypothétique du complexe obtenu par HADDOCK (appartenant au Cluster 1; **Figure 2.38**). Nous avons d'abord modélisé la queue C-terminale de Rev dans une conformation arbitraire ("mi-étendue", décrite plus bas). Dans ce cas, nous pouvons observer qu'une bonne partie du modèle atomique obtenu est en adéquation avec le modèle à billes, à l'exception de la queue C-terminale de Rev et de deux répétitions HEAT N-terminales d'Imp β . Comme le montre la **Figure 2.38**; flèches en cyan et magenta), une conformation plus étendue du solénoïde HEAT et une réorientation de la queue C-terminale de Rev permettrait d'obtenir une meilleure correspondance avec le modèle *ab initio*. Ce résultat nous a encouragé à analyser les données SAXS de façon plus poussée, dans le but d'identifier la configuration du complexe Imp β /Rev la plus convaincante.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
 2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

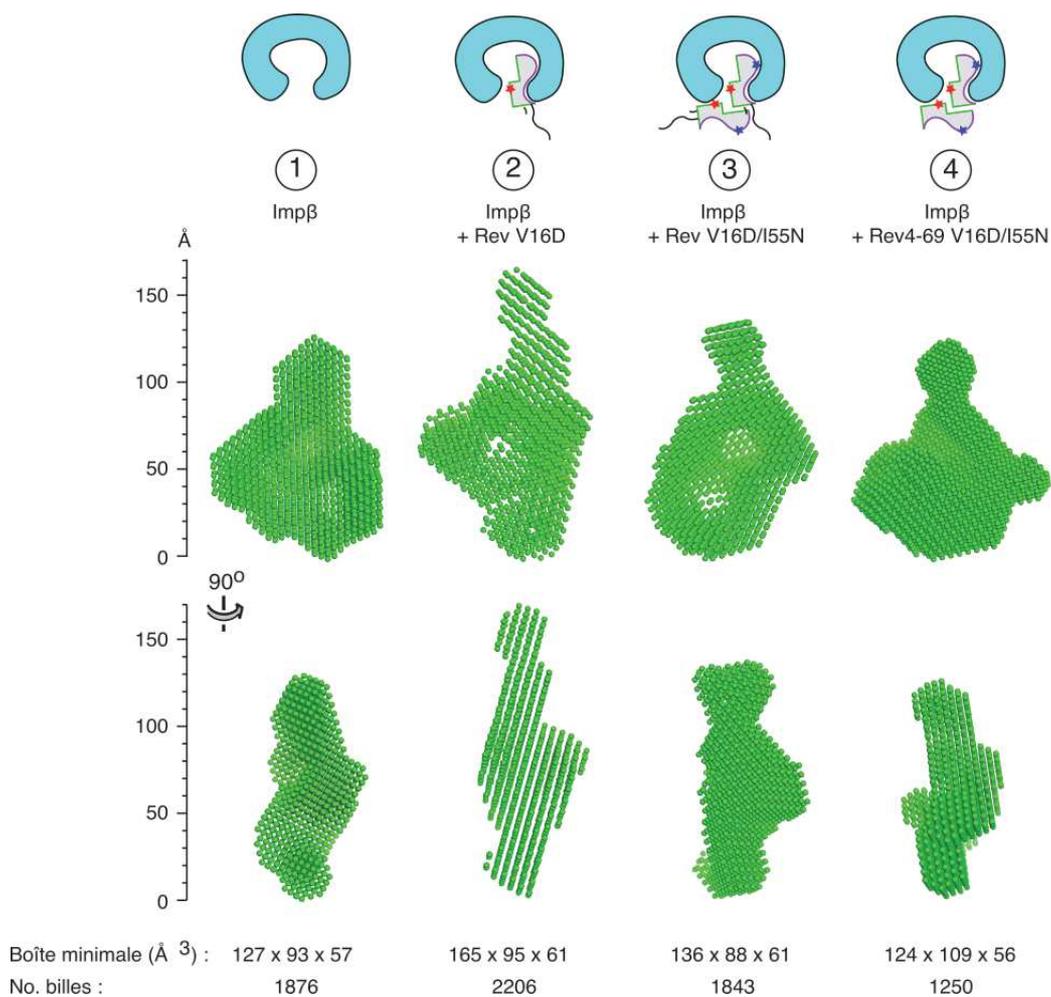


FIGURE 2.37 – Modèles des complexes Imp β /Rev calculés *ab initio* à partir des données SAXS. Les modèles ont été calculés avec DAMMIF et alignés avec SUPCOMB, du progiciel ATSAS (Petoukhov et al., 2012).

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

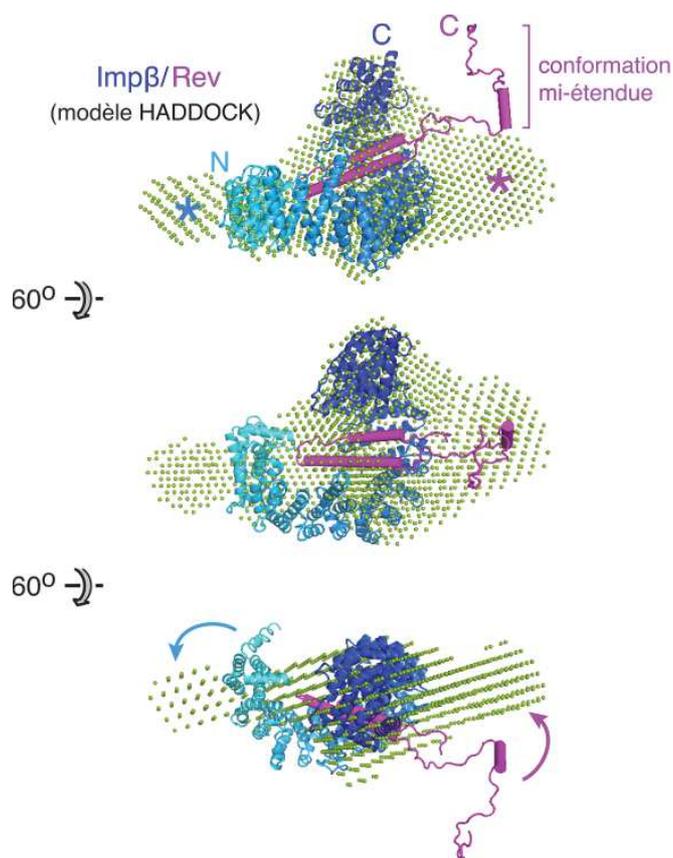


FIGURE 2.38 – Comparaison du modèle *ab initio* du complexe Imp β /Rev^{V16D} avec une structure hypothétique du complexe obtenue par amarrage moléculaire. Les coordonnées d'une des configurations calculées par HADDOCK (appartenant au Cluster 1) ont été alignées avec le modèle à billes par le logiciel Supcomb du progiciel ATSAS (Petoukhov et al., 2012). Les deux régions indiquées par les astérisques en cyan et magenta pourraient correspondre aux répétitions HEAT N-terminales d'Imp β et à la queue C-terminale de Rev, respectivement.

2.13.3 Évaluation des modèles HADDOCK : 1^{er} essai

Nous nous sommes ensuite demandés s'il était possible d'utiliser les données SAXS pour discriminer les différents modèles du complexe Imp β /Rev identifiés par amarage moléculaire. Pour cela nous nous sommes focalisés sur les données du complexe Imp β /Rev^{V16D}, le seul des trois complexes étudiés qui ne contient qu'un seul monomère de Rev. L'idée était d'évaluer l'accord entre la courbe de diffusion théorique calculée pour chaque configuration et la courbe de diffusion expérimentale. Pour chacun des 8 clusters identifiés par HADDOCK (**Tableau 2.5**, page 92), nous avons testé les quatre modèles ayant le meilleur score HADDOCK. Comme indiqué plus haut, tous les modèles HADDOCK positionneraient la queue C-terminale de Rev loin du centre de gravité d'Imp β , du côté C-terminal d'Imp β dans le cas des Clusters 1-6 et 8 et du côté N-terminal dans le cas du Cluster 7 (**Figure 2.35**, page 95). Afin de vérifier ce résultat nous avons généré deux modèles supplémentaires basés sur les Clusters 1 et 7, en tournant Rev à l'envers, de sorte que la queue C-terminale passe à travers la cavité centrale d'Imp β . Nous avons nommé ces modèles "-1" et "-7", respectivement. Ainsi, le nombre total de configurations était 34 (8 clusters x 4 structures/cluster + 2 modèles supplémentaires).

Cependant, comme tous les modèles HADDOCK précédents ont été obtenus avec le domaine N-terminal de Rev (résidus 9-65), il a été nécessaire de générer de nouveaux modèles en ajoutant les résidus 1-8 de la queue N-terminale et la queue C-terminale (résidus 66-116) présents dans l'échantillon analysé par SAXS. Ainsi, nous avons modélisé les résidus 1-8 dans une conformation étendue et la queue C-terminale dans trois conformations différentes, que nous appelons "compacte", "mi-étendue" et "étendue". Ces conformations prennent en compte le caractère hélicoïdale des résidus 84-93 observé par RMN (**Figure 2.10**, page 52), et ont été soigneusement choisies afin d'éviter tout encombrement stérique dans le contexte des 34 configurations d'Imp β /Rev testées. Les 8 conformations de Rev testées sont montrées dans la **Figure 2.39 (a)**. La combinaison de ces 8 conformations avec les 34 configurations décrites ci-dessus génère un total de 272 modèles du complexe Imp β /Rev. Nous avons ensuite utilisé le logiciel CRY SOL (Svergun et al., 1995) pour calculer l'accord entre ces modèles et les données expérimentales, indiqué par la valeur χ^2 (sachant que plus la valeur de χ^2 est grande, moins bon est le modèle; une valeur

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

de $\chi^2 = 0$ indiquerait un modèle parfait). Les résultats sont résumés dans la **Figure 2.39 (b)**.

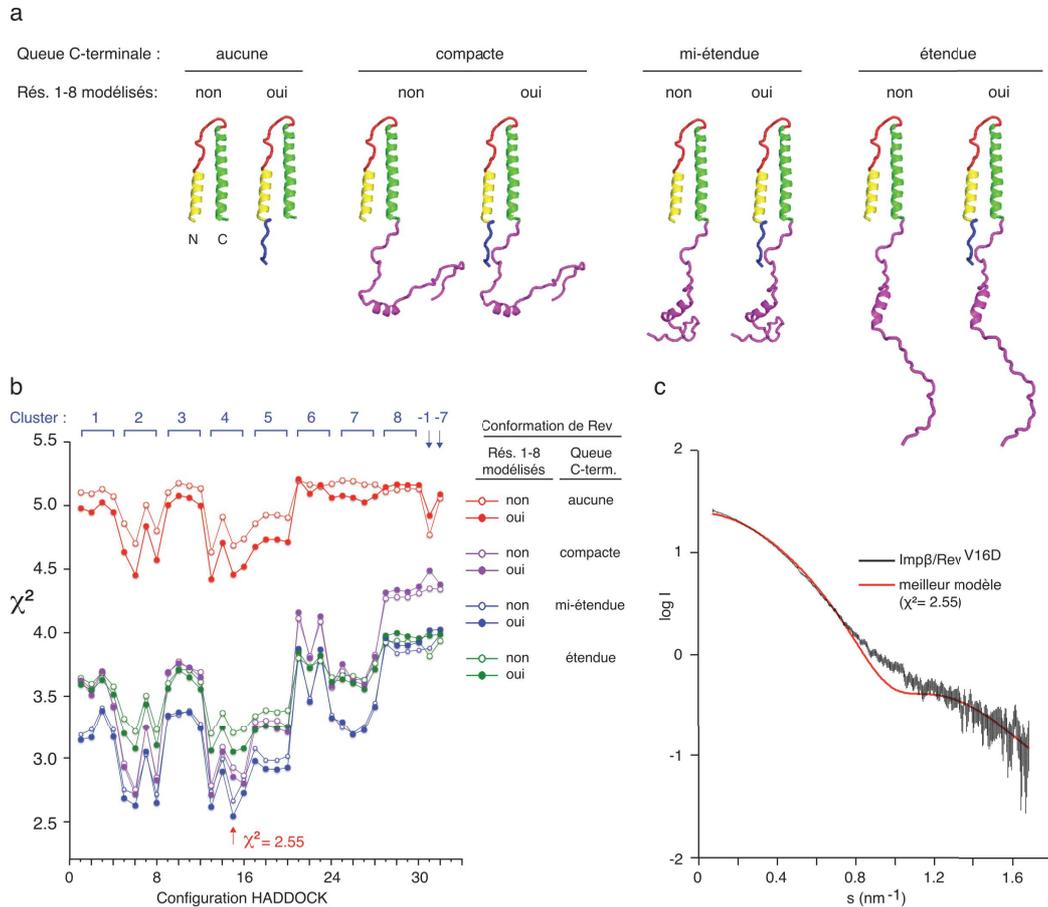


FIGURE 2.39 – Comparaison des modèles hypothétiques avec les données SAXS du complexe Imp β /RevV16D. (a) Conformations de Rev testées. (b) Accord entre la diffusion observée du complexe Imp β /Rev V^{16D} et celle calculée pour le modèle indiqué. Les valeurs de χ^2 ont été calculées avec le programme CRY SOL (Svergun et al., 1995). Les 8 courbes correspondent aux 8 conformations de Rev testées. (c) Accord entre la diffusion observée du complexe Imp β /Rev V^{16D} et celle calculée du modèle indiqué par la flèche rouge en (b).

Les résultats obtenus nous permettent de faire trois observations :

- (1) La queue C-terminale de Rev contribue de façon importante à la courbe de diffusion théorique. En effet, tous les modèles sans queue C-terminale ont des valeurs moyennes de χ^2 ($\overline{\chi^2} = 4.96 \pm 0.21$) nettement moins bonnes que celles des modèles avec une queue ($\overline{\chi^2} = 3.48 \pm 0.43$). Pour la plupart des

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

configurations, la conformation mi-étendue de la queue C-terminale donne le meilleur χ^2 .

- (2) Les résidus 1-8 de Rev n'ont qu'un très petit effet sur la courbe de diffusion. En effet, l'inclusion de ces résidus ne donne qu'une légère amélioration de χ^2 dans le cas des Clusters 1-7 ($\overline{\Delta\chi^2} = -0.049$) et qu'une légère détérioration dans le cas du Cluster 8 et des modèles -1 et -7 ($\overline{\Delta\chi^2} = 0.062$).

- (3) Les différentes configurations HADDOCK donnent des différences notables au niveau de la diffusion prédite. Excluant les modèles sans queue C-terminale, les modèles des Clusters 2 et 4 correspondent le mieux aux données expérimentales ($\overline{\Delta\chi^2} = 3.00 \pm 0.26$ et 3.03 ± 0.22 , respectivement), tandis que ceux du Cluster 8 et les modèles -1 et -7 correspondent le moins ($\overline{\Delta\chi^2} = 4.07 \pm 0.20$). En général, les quatre structures appartenant à chaque cluster donnent des résultats similaires, à l'exception de quelques variations pour les Clusters 2, 4 et 6.

Globalement, le meilleur χ^2 a été obtenu avec un modèle HADDOCK appartenant au Cluster 4, auquel les résidus 1-8 ont été rajoutés et dont la queue C-terminale de Rev a été modélisée dans une conformation mi-étendue ($\chi^2 = 2.55$). La courbe de diffusion calculée de ce modèle est comparée avec la courbe expérimentale dans la **Figure 2.39 (c)**. Cette comparaison montre qu'il existe d'importantes différences entre les deux courbes, y compris à basse (0.1 - 0.2 nm^{-1}), moyenne (0.5 - 0.6 nm^{-1}) et haute (0.8 - 1.2 nm^{-1}) résolution. Par conséquent, ce modèle ne semble pas encore être représentatif de la vraie structure du complexe en solution.

2.13.4 Évaluation des modèles HADDOCK : 2^{me} essai

Les mauvaises valeurs de χ^2 obtenues ci-dessus ont suggéré que les modèles testés nécessitaient une modification importante. Vu que le plus gros partenaire du complexe, Imp β , peut adapter différentes conformations, il semblait important d'étudier l'effet de la conformation de cette protéine sur la courbe de diffusion. Au sein du

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

laboratoire, l'analyse des modes normaux a précédemment montré son intérêt lors de l'étude structurale de l'exportine CRM1 (Dian et al., 2013). Nous avons donc essayé d'utiliser cette approche pour étudier les différentes conformations possibles d'Imp β .

L'analyse des modes normaux permet d'étudier les changements de conformation à grande échelle, tels que les mouvements des domaines et des sous-domaines d'une protéine, en les décomposant en différents modes et fréquences de vibration (Bahar et al., 2010). Chaque mode normal est défini par un vecteur propre qui décrit la coordonnée normale ("dans quel sens la protéine bouge") et par une valeur propre proportionnelle au carré de la fréquence de vibration. L'énergie nécessaire pour réaliser une déformation d'une certaine ampleur est moins importante dans un mode de basse fréquence que dans un mode de haute fréquence. En général, les modes de plus basse fréquence sont les plus importantes : typiquement, un ou deux de ces modes représentent les mouvements des domaines les plus fonctionnellement pertinents (Yang et al., 2007).

Nous avons calculé différentes conformations d'Imp β à partir des 8 premiers modes normaux de vibration, en utilisant la structure d'Imp β en complexe avec l'IBB d'Imp α (PDB ID 1QGK) comme modèle de départ. Trois conformations représentatives de chaque mode normal sont présentées dans la **Figure 2.40**. Ces conformations échantillonnent la coordonnée normale en position d'équilibre (le modèle de départ) et aux deux extrémités de la déformation. Certains modes de vibration correspondent à des mouvements qui modifient principalement la hauteur du solénoïde des répétitions HEAT (ex. les modes 1 et 5). Pour d'autres modes, les mouvements modifient principalement la largeur ou l'épaisseur du solénoïde (ex. les modes 3 et 7).

Nous avons combiné ces différentes conformations d'Imp β avec nos différentes configurations HADDOCK pour ensuite évaluer l'adéquation de ces nouveaux modèles avec les données SAXS du complexe Imp β /Rev^{V16D}. Nous avons combinés 40 conformations d'Imp β (5 conformations x 8 modes) avec 8 configurations HADDOCK et 6 conformations de Rev pour générer 1920 modèles du complexe, qui ont ensuite été utilisés pour calculer des valeurs de χ^2 . La **Figure 2.41 (a)** montre un sous-ensemble de ces résultats (200 modèles). (Les autres résultats, non montrés, présentent les

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
 2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

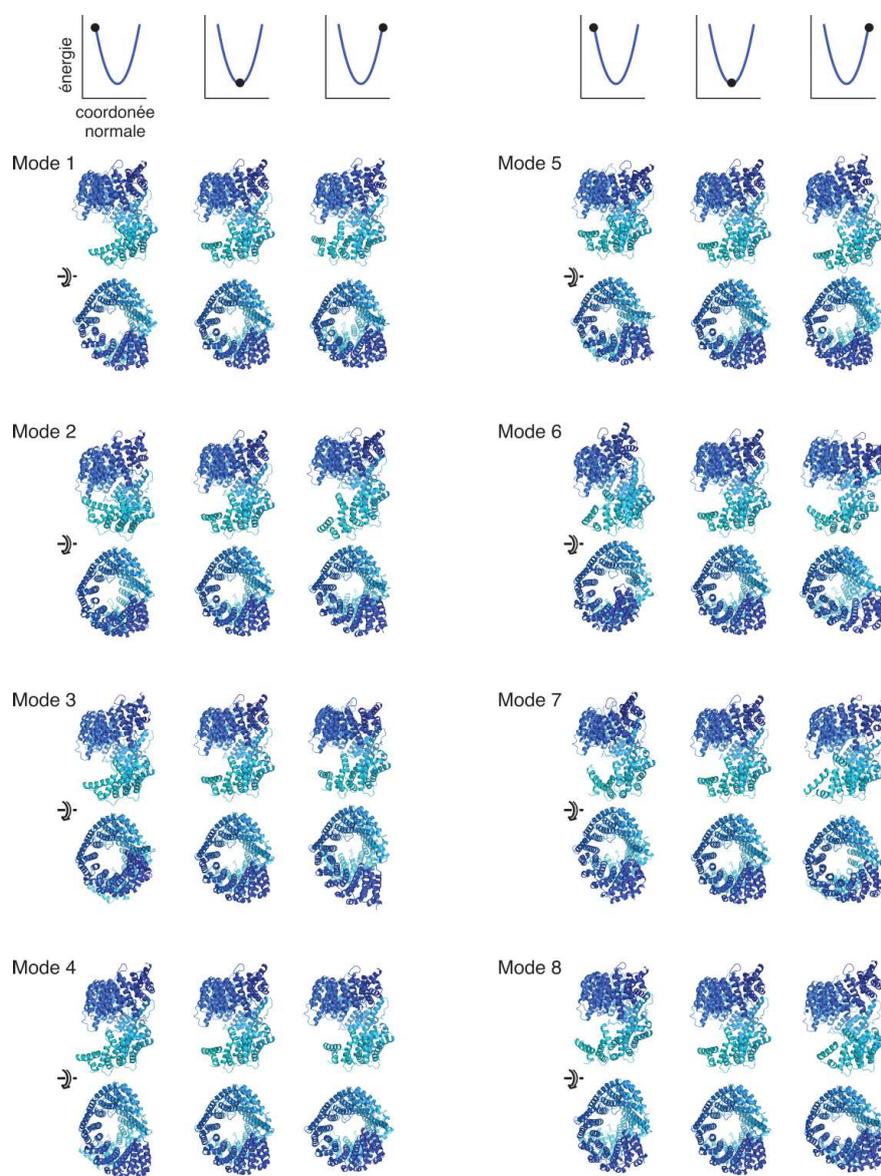


FIGURE 2.40 – **Modes normaux de vibration d'Imp β .** Trois conformations sont présentées pour chaque mode. La conformation du milieu est identique pour tous les modes et correspond à la structure cristalline d'Imp β liée à l'IBB d'Imp α (PDB ID 1QGK). La structure est ensuite déformée le long de la coordonnée normale dans le sens positif (à droite) et négatif (à gauche). Par exemple, le mode 1 décrit une déformation de la molécule qui correspond à un étirement ou une compression en direction verticale, parallèle à l'axe superhéliçoïdal. Les modes normaux ont été calculés avec NOMAD-Ref (Lindahl et al., 2006).

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

mêmes tendances).

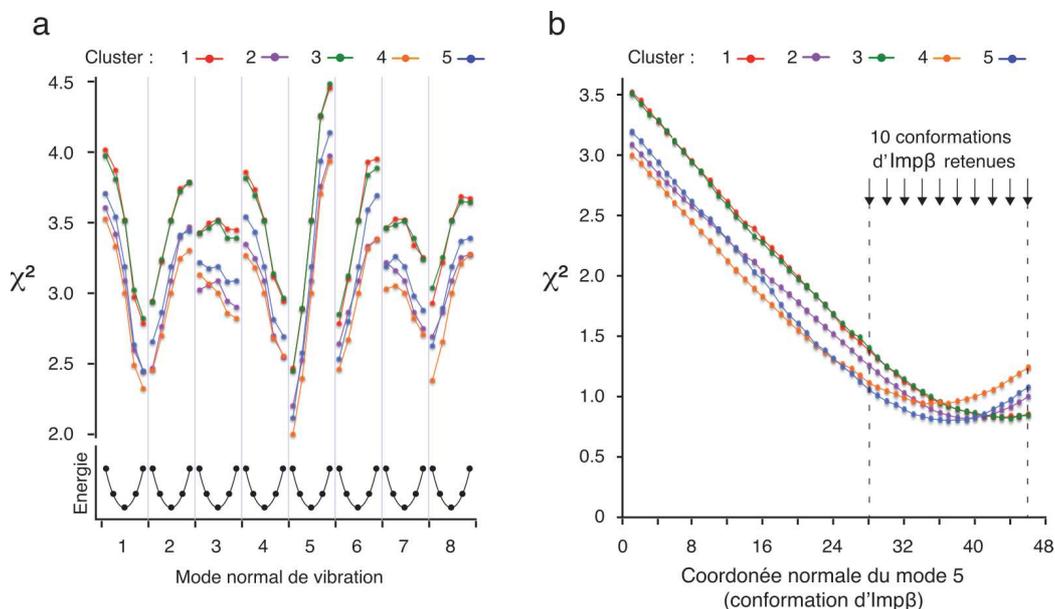


FIGURE 2.41 – **Dépendance de la valeur de χ^2 sur la conformation d'Imp β .** (a) Dépendance sur les modes normaux 1-8. La meilleure structure appartenant à chaque cluster HADDOCK a été testée. Dans un souci de clarté, 3 des 8 configurations HADDOCK testées ne sont pas représentées. Dans le cas illustré, la queue C-terminale de Rev et les résidus 1-8 ont été modélisés dans une conformation étendue. Les mêmes tendances pour les valeurs de χ^2 ont été observées pour les autres conformations testées (queue C-terminale absente, compacte ou mi-étendue; avec ou sans les résidus 1-8). (b) Dépendance sur le mode normal 5. 46 conformations ont été échantillonnées le long de la coordonnée normale. Pour toutes les configurations HADDOCK testées, la valeur minimale de χ^2 est obtenue entre les conformations 28 et 46.

Les résultats montrent qu'un changement de conformation d'Imp β a un effet important sur l'accord entre la courbe théorique et celle mesurée expérimentalement. L'effet le plus important est observé pour le mode 5 ($\overline{\Delta\chi^2} = 1.90 \pm 0.12$ entre les deux conformations extrêmes du mode), le mode présentant l'étirement vertical d'Imp β le plus important. Des effets significatifs ont également été observés pour les modes 1, 2, 4, 6 et 8 (valeurs de $\overline{\Delta\chi^2}$ entre 0.71 et 1.19). L'effet le plus petit a été observé pour les modes 3 et 7 ($\overline{\Delta\chi^2}$ de 0.17 et 0.36, respectivement). Ces modes correspondent à des mouvements transversaux à la direction de l'axe superhelicoidal. Ces résultats confirment qu'il est important d'étendre Imp β en direction verticale pour obtenir une meilleure adéquation entre le modèle du complexe et les données

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

expérimentales, en accord avec nos conclusions basées sur la valeur de D_{\max} et sur la distribution des distances interatomiques (**Figure 2.36**, page 98 et **Tableau 2.7**, page 97).

Nous avons ensuite échantillonné la coordonnée du mode 5 plus finement, générant ainsi 46 conformations d'Imp β au lieu de 5. En combinant ces conformations avec les différentes configurations HADDOCK, nous avons trouvé que, indépendamment de la configuration testée, la valeur minimale de χ^2 était toujours obtenue entre les conformations 28 et 46, c'est-à-dire, lorsqu'Imp β était presque complètement étiré (**Figure 2.41 (b)**). Ensuite, nous avons refait l'analyse illustrée par la Figure 2.39 (b), sauf que cette fois-ci au lieu d'utiliser une seule conformation d'Imp β nous avons testé les 10 conformations d'Imp β indiquées par des flèches en **Figure 2.41 (b)**. En tout nous avons comparé les données SAXS du complexe Imp β /Rev^{V16D} avec 1700 modèles du complexe (10 conformations d'Imp β x 5 conformations de Rev x 34 configurations du complexe). Les résultats sont résumés dans la **Figure 2.42**.

En comparant les résultats de la **Figure 2.42 (a)** avec celles de la **Figure 2.39 (b)** on constate que l'utilisation des conformations étendues d'Imp β a conduit à une amélioration significative des modèles. En effet, tandis que le meilleur modèle obtenu précédemment avait une valeur de χ^2 de 2.55 (**Figure 2.39 (b)**), toutes les configurations testées avec une conformation plus étendue d'Imp β arrivent à des valeurs de χ^2 en dessous de 1.4 (**Figure 2.42 (a)**). Ces valeurs améliorées de χ^2 nous permettent de tirer certaines conclusions de manière plus confiante. En particulier, l'analyse confirme les points suivants :

- (1) Il est crucial de modéliser la queue C-terminale de Rev, malgré le fait que cette région représente moins de 5% de la masse du complexe. En moyenne, l'inclusion de cette queue dans le modèle (dans n'importe quelle conformation) a amélioré la valeur de χ^2 de 0.55 (**Tableau 2.8**, ligne 2). La conformation étendue de la queue a donné les meilleurs résultats (Figure 7a, vert), puisque les valeurs correspondantes de χ^2 sont inférieures à celles obtenues avec la conformation mi-étendue (**Figure 2.42 (a)**, orange; $\overline{\Delta\chi^2} = -0.23 \pm 0.10$), qui sont elles-mêmes mieux que celles obtenues avec la conformation compacte (**Figure 2.42 (a)**, rouge; $\overline{\Delta\chi^2} = -0.22 \pm 0.13$).

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

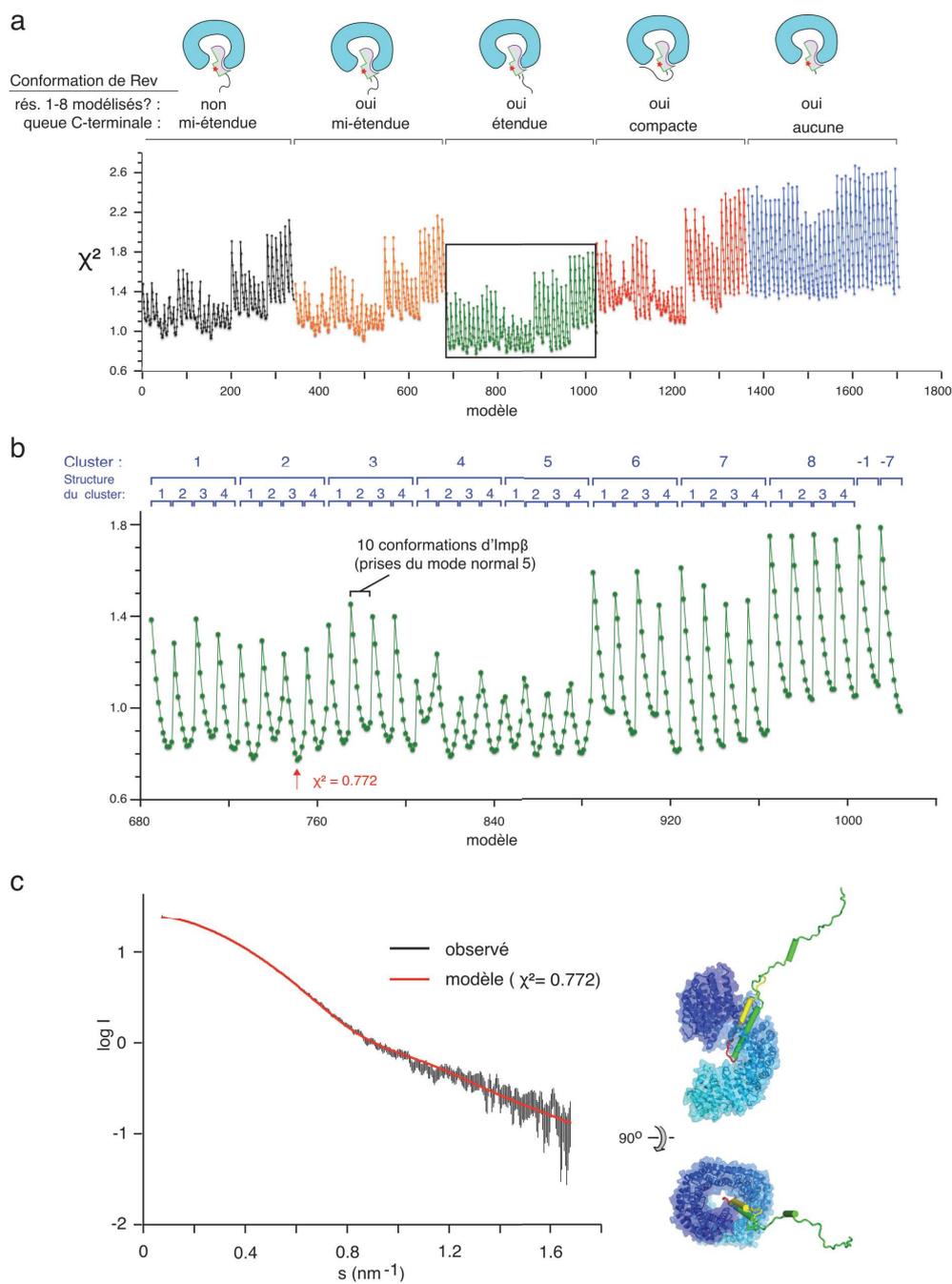


FIGURE 2.42 – Accord des modèles hypothétiques avec les données SAXS mesurées sur le complexe Imp β /Rev^{V16D}. (a) Vue d'ensemble des résultats. (b) Résultats pour les modèles ayant la queue C-terminale de Rev étendue. (c) Accord entre la diffusion observée du complexe Imp β /Rev^{V16D} et celle calculée à partir du modèle indiqué par la flèche rouge en (b) et indiqué à droite.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

- (2) La modélisation des résidus 1-8 n'a eu aucun effet significatif sur la courbe de diffusion (**Figure 2.42 (a)**, comparer les courbes en noir et orange), puisque leur inclusion n'a pratiquement pas modifié les valeurs de χ^2 ($\overline{\Delta\chi^2} = 0.01 \pm 0.03$; **Tableau 2.8**, ligne 1).

TABLEAU 2.8 – Effet des conformations des résidus N- et C-terminaux sur la valeur de χ^2 .

Condition A	Condition B	Nb. Modèles Comparés	$\Delta\chi^2 = \chi^2(B) - \chi^2(A)$				Conclusion	
			Min.	Moyenne	Max	Nb. < 0		Nb. > 0
Résidus 1 - 8 :								
Absents	Présents	340	-0.057	0.009 \pm 0.026	0.113	132	205	Effet peu significatif
Queue C-terminale :								
Aucune	Présente	1020	-1.631	-0.549 \pm 0.302	0.218	997	36	B meilleur que A
Aucune	Compacte	340	-1.631	-0.329 \pm 0.229	0.218	318	22	B meilleur que A
Compacte	Mi-étendue	340	-0.470	-0.216 \pm 0.133	1.182	331	9	B meilleur que A
Mi-étendue	Étendue	340	-0.403	-0.229 \pm 0.101	0.148	328	12	B meilleur que A

Nous observons une excellente adéquation entre des modèles appartenant aux Clusters 1-7 et les données expérimentales : la meilleure structure dans chaque cluster présente une valeur de χ^2 entre 0.77 et 0.82 (**Tableau 2.9**). Globalement le meilleur χ^2 est obtenu avec une structure du Cluster 2. Cependant, la différence entre cette valeur de χ^2 et celles des meilleures structures des autres Clusters est inférieure à la variabilité de χ^2 entre les différentes structures d'un même Cluster (**Tableau 2.9**, dernière colonne). Par contre, les valeurs de χ^2 obtenues pour le Cluster 8 et les modèles -1 et -7 sont significativement moins bonnes que celles des autres Clusters. Ces modèles sembleraient donc moins proches à la vraie structure du complexe en solution. En particulier, les mauvaises valeurs de χ^2 pour les modèles -1 et -7 confirment que la queue C-terminale de Rev occupe une position périphérique dans le complexe. Pour résumer, les données SAXS indiquent qu'Imp β adopte une conformation assez étendue dans le complexe avec Rev^{V16D}. Cependant, les données ne permettent pas d'établir une configuration unique du complexe de façon définitive. D'autres données biochimiques ou biophysiques sont donc nécessaires afin de répondre à la question de comment Imp β reconnaît Rev.

CHAPITRE 2. RÉSULTATS
2.13. ANALYSE DU COMPLEXE IMP β /REV PAR SAXS

TABLEAU 2.9 – Meilleures valeurs de χ^2 pour les 4 structures testées de chaque Cluster HADDOCK.

Cluster de HADDOCK	Valeur Minimale de χ^2		$b - a$	Δ entre (a) et meilleure de Cluster2 ($=c$)	$c / <b - a>$
	meilleure structure du Cluster ($=a$)	moin bonne structure du Cluster ($=b$)			
1	0.822	0.873	0.051	0.050	0.57
2	0.772	0.866	0.094	0.000	0.00
3	0.817	0.909	0.092	0.045	0.51
4	0.791	0.944	0.153	0.019	0.22
5	0.794	0.829	0.035	0.022	0.25
6	0.806	0.980	0.174	0.034	0.39
7	0.821	0.881	0.060	0.049	0.56
8	1.036	1.078	0.042	0.264	** 3.01
modèle -1	1.096	--	--	0.324	** 3.70
modèle -7	0.983	--	--	0.211	* 2.41
	Moyenne:		0.088		

Conclusions et perspectives

Le but de mon projet de thèse était de déterminer la structure tridimensionnelle du complexe formé par la protéine Rev du VIH-1 et le facteur de transport nucléaire humain $\text{Imp}\beta$. Après l'échec d'une stratégie de co-expression (cf. 2.1, page 38), j'ai décidé de reconstituer le complexe à partir des protéines recombinantes $\text{Imp}\beta$ et Rev purifiées séparément (cf. 2.2, page 39 et 2.3, page 43). Pour ce faire, j'ai dû d'abord résoudre le problème posé par la tendance de Rev à s'agréger en solution. En utilisant les mutations V16D et I55N, localisées sur les deux côtés du domaine N-terminal de Rev, j'ai pu purifier cette protéine dans une forme dimérique (Rev^{V16D}) et monomérique ($\text{Rev}^{\text{V16D/I55N}}$), comme l'a confirmé une analyse de SEC/MALLS. J'ai pu ainsi démontrer qu' $\text{Imp}\beta$ et Rev forment un complexe stable qui peut être isolé par gel filtration. Ce complexe a une masse moléculaire bien définie selon SEC/MALLS et présente une apparence relativement homogène selon une analyse par microscopie électronique à coloration négative (cf. 2.4.3, page 55).

J'ai ensuite essayé de cristalliser différentes formes de ce complexe en faisant varier les constructions de Rev et d' $\text{Imp}\beta$, mais je n'ai réussi à obtenir que des pseudo-cristaux non diffractants (cf. 2.5, page 57). J'ai donc recouru à toute une batterie de techniques biochimiques et biophysiques afin d'obtenir différentes informations structurales sur le complexe. Une analyse par RMN a montré qu' $\text{Imp}\beta$ reconnaît Rev par son domaine N-terminal et que sa queue désordonnée C-terminale n'est pas impliquée dans l'interaction (cf. 2.6, page 63). J'ai pu confirmer ce résultat par une

expérience de fluorimétrie différentielle à balayage, en montrant que des peptides couvrant le motif ARM de Rev augmentent la stabilité thermique d'Imp β , tandis que des peptides en dehors de cette région n'ont aucun effet. De façon intéressante, j'ai trouvé que le motif ARM isolé augmente la stabilité d'Imp β plus que la protéine Rev entière (cf. 2.7, page 68). J'ai confirmé cette observation par une expérience de polarisation de fluorescence, en montrant qu'Imp β fixe le motif ARM (le peptide Rev-NLS) avec une plus haute affinité que la protéine Rev entière (K_D de 18 nM comparé à 220 nM). Ceci suggère que Rev contient une partie en dehors de son motif ARM qui défavorise sa fixation à Imp β . De plus, j'ai montré que le peptide Rev-NLS entre en compétition avec Imp α en fixant Imp β , mais pas avec Ran (cf. 2.8, page 71). Ceci suggère un chevauchement des sites de liaison de Rev et du domaine IBB d'Imp α sur la surface d'Imp β et une implication des répétitions HEAT C-terminales dans la fixation de Rev (Figure 3.1). Étonnamment, des données biochimiques et biophysiques ont montré que Rev^{V16D/I55N}, qui est monomérique dans son état non lié, fixe Imp β avec une stœchiométrie de 2 : 1 (cf. 2.9, page 73). À l'inverse, Rev^{V16D}, qui est dimérique lorsque non lié, fixe Imp β avec une stœchiométrie de 1 : 1 (cf. 2.10, page 82). Une analyse par ITC a d'ailleurs montré qu'Imp β fixe le premier monomère de Rev^{V16D/I55N} avec une plus haute affinité ($K_D = 0.8 \mu\text{M}$) que le deuxième ($K_D = 9.1 \mu\text{M}$), et que les deux interactions sont enthalpiquement favorisées (cf. 2.11, page 83). Cette différence de stœchiométrie observée entre les deux mutants est discutée en détail plus loin.

En exploitant ces données biochimiques et biophysiques, nous avons ensuite réalisé une étude d'amarrage moléculaire. Celle-ci a généré un nombre limité de modèles hypothétiques du complexe Imp β /Rev, dont quatre en particulier sont cohérents avec des données de mutagenèse déjà publiées (2.12, page 86). Dans tous ces modèles, l'axe longitudinal de Rev est plus ou moins parallèle à l'axe superhélicoïdal d'Imp β et la queue C-terminale de Rev est positionnée du côté C-terminal d'Imp β . Cela étant, les détails précis de l'interface intermoléculaire varient entre les différents modèles. Une analyse par SAXS a révélé qu'Imp β adopte une conformation relativement étendue lorsqu'elle fixe Rev, comparable à celle qu'elle présente en complexe avec le cargo Snail1 (Choi et al., 2014; cf. 2.13, page 96).

Dans le cas idéal, nos données SAXS auraient dû nous permettre de déterminer

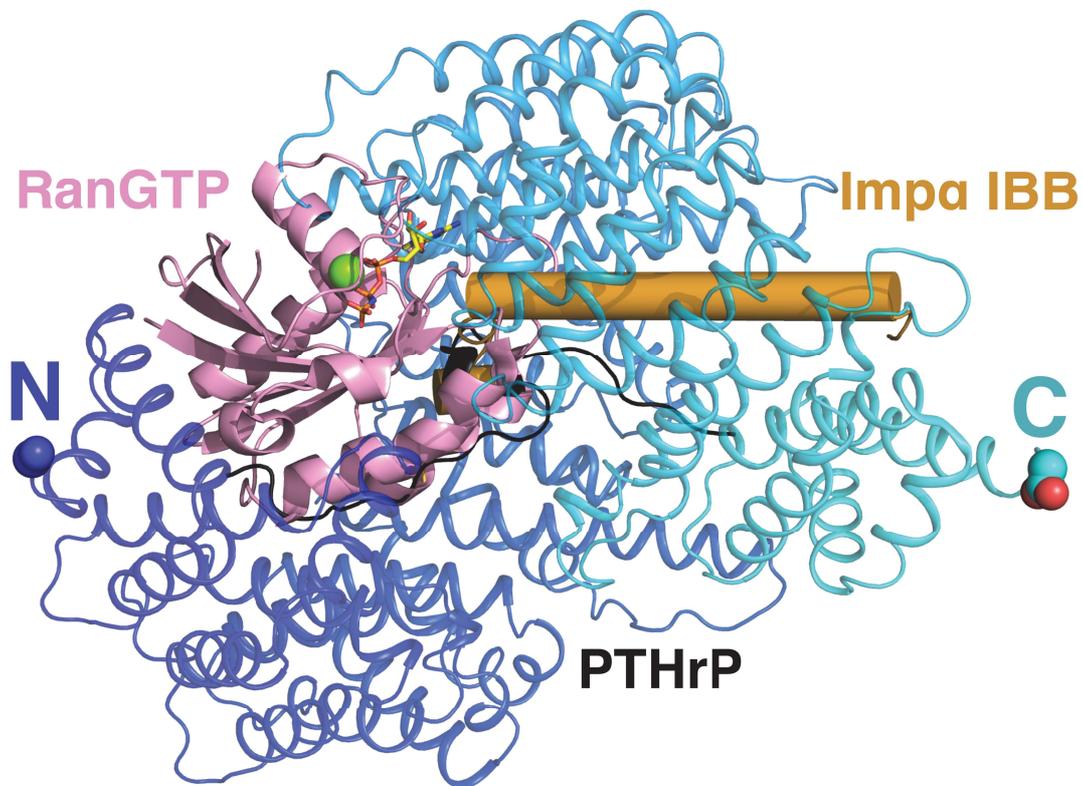


FIGURE 3.1 – **Superposition structurale de divers complexes d’Imp β .** Les structures d’Imp β en complexe avec RanGTP (PDB ID 1IBR), le NLS de la protéine PTHrP (PDB ID 1M5N) et le domaine IBB d’Imp α (PDB ID 1QGK) ont été superposées. Imp β est représentée depuis son extrémité N-terminale en bleu foncé jusqu’à son extrémité C-terminale en bleu cyan. Le domaine IBB est en orange, le NLS de PTHrP en noir, Ran en rose, le GTP en jaune et un ion Mg²⁺ en vert. L’IBB est reconnu par les répétitions HEAT C-terminales d’Imp β , tandis que Ran est reconnu par les répétitions N-terminales. Le NLS de PTHrP est un exemple d’un cargo qui interagit à la fois avec la partie N- et C-terminale d’Imp β .

l’orientation et la position de Rev par rapport à Imp β par une modélisation de corps rigide en utilisant les structures cristallines connues. En réalité, la réalisation de cet objectif a été compliquée par trois facteurs. D’abord, Imp β est très flexible et peut adopter différentes conformations (cf. 1.3.8, page 32 ; **Figure 1.19**). Le fait que la conformation d’Imp β liée à Rev n’est pas connue augmente de façon importante le nombre de paramètres à explorer. Deuxièmement, la queue C-terminale de Rev est intrinsèquement désordonnée. La contribution de cette queue à la courbe de dif-

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

3.1. PERSPECTIVE D'UN MODÈLE STRUCTURAL DU COMPLEXE

fusion est donc déterminée par l'ensemble de ses conformations, mais cet ensemble lui-même dépend de l'emplacement de Rev par rapport à Imp β . Ainsi, pour chaque configuration du complexe testé, il faudrait calculer l'ensemble des conformations adoptées par la queue, ce qui complique énormément l'analyse. Enfin, l'analyse des données obtenues sur Imp β liée à Rev^{V16D/I55N} est compliquée par le fait que la détermination de la configuration du complexe est un problème à trois corps (1 molécule d'Imp β et 2 de Rev), ce qui double l'espace des paramètres par rapport à un problème à deux corps. Néanmoins, en nous focalisant sur le complexe d'Imp β avec Rev^{V16D} en réalisant une analyse des modes normaux d'Imp β (dont la stœchiométrie est de 1 : 1) nous avons pu obtenir des modèles du complexe en bonne adéquation avec les données SAXS. Cette analyse suggère que la queue C-terminale de Rev est dans une conformation très étendue qui n'interagit pas avec Imp β , en accord avec nos données de RMN et de balayage peptidique. Malheureusement, les informations contenues dans la courbe de diffusion n'ont pas été suffisantes pour pouvoir discriminer parmi les modèles obtenus. Des données supplémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir établir la configuration du complexe Imp β /Rev de manière définitive.

3.1 Perspective d'un modèle structural du complexe

Les connaissances acquises au cours de mes travaux suggèrent comment l'on devrait procéder pour déterminer la structure du complexe Imp β /Rev. Évidemment, des tentatives supplémentaires de cristallogénèse devraient être réalisées, notamment avec des constructions de Rev^{WT} et de Rev^{V16D} couvrant les résidus 9-69, comme indiqué par nos résultats de RMN. Des constructions plus courtes d'Imp β pourraient aussi être tentées dans le but de diminuer la flexibilité conformationnelle du complexe. En particulier, des troncations N-terminales pourraient être essayées, puisque plusieurs de nos modèles HADDOCK indiquent que des répétitions HEAT N-terminales ne sont pas utiles à l'interaction avec Rev. En effet, des fragments d'Imp β ont déjà été co-cristallisés avec des cargos, notamment avec le NLS de la protéine PTHrP (Cingolani et al., 2002) et avec le domaine IBB de Snurportin1 (Wohlwend et al., 2007).

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

3.1. PERSPECTIVE D'UN MODÈLE STRUCTURAL DU COMPLEXE

Si ces tentatives échouent, l'étape suivante serait l'obtention d'un modèle structural en combinant des données SAXS avec des expériences de mutagenèse réalisées afin de définir l'interface intermoléculaire. De nouvelles données de SAXS devraient être mesurées sur Imp β en complexe avec une construction de Rev^{V16D} ou de Rev^{WT} dont la queue C-terminale a été délétée. Cela simplifierait considérablement l'analyse en réduisant les paramètres à explorer à ceux définissant la conformation d'Imp β et son emplacement par rapport à Rev. La conformation d'Imp β en meilleure adéquation avec les données SAXS devrait d'abord être déterminée en utilisant l'approche des modes normaux décrite précédemment (cf. 2.13, page 96). Ensuite, cette conformation pourrait être utilisée dans une étude d'amarrage avec HADDOCK pour identifier les configurations du complexe les plus probables. Cette étude exploiterait également les données de mutagenèse décrites plus bas. Le modèle hypothétique qui correspond le mieux aux données SAXS serait ensuite retenu et pourrait être ultérieurement validé par d'autres mutants ponctuels. Enfin, en nous servant de ce modèle, nous pourrions exploiter les données déjà mesurées sur Imp β en complexe avec Rev^{V16D} (forme entière) pour essayer de modéliser la queue C-terminale de Rev.

Quant à la définition de l'interface intermoléculaire par mutagenèse, nous pourrions commencer par l'observation que l'interaction entre Imp β et Rev est abolie par la double mutation R38D/R39L de Rev (Henderson and Percipalle, 1997). Cette perte d'affinité est probablement due au fait que l'inversion de charge sur le résidu 38 entraîne une répulsion électrostatique avec un résidu acide en proximité sur Imp β , et/ou à une perte d'un pont salin impliquant le résidu R39. L'affinité des simples mutants R38D, R39D et du double mutant R38D/R39D pour Imp β pourrait être testé dans un essai de gel natif ou de type "pull-down" afin de voir lequel de ces résidus est important pour l'interaction. Ensuite, des mutants ponctuels d'Imp β pourraient être construits en remplaçant des résidus acides par des résidus basiques et leur affinité pour Rev mesurée. Un mutant basique d'Imp β fixant un mutant acide de Rev avec une meilleure affinité que la forme sauvage indiquerait une interaction entre le résidu muté d'Imp β et celui muté de Rev. (Par exemple, selon la structure représentée par le Cluster 1 de HADDOCK, le résidu E203 d'Imp β devrait interagir avec les résidus R38 et R39. On s'attendrait alors qu'une mutation E203R diminue l'affinité d'Imp β pour Rev^{WT} et augmente son affinité pour les mutants R38D et R39D). L'utilisation de ces informations par HADDOCK devrait ensuite améliorer la qualité des modèles

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

3.1. PERSPECTIVE D'UN MODÈLE STRUCTURAL DU COMPLEXE

proposés par ce logiciel. De façon plus générale, on pourrait cribler un panel de mutants d'inversion de charge afin d'identifier des mutants compensatoires d'Imp β et de Rev. Cette stratégie est illustrée dans la **Figure 3.2**.

Nos résultats d'amarrage moléculaire suggèrent un nombre limité de résidus acides d'Imp β susceptibles d'interagir avec Rev. En effet, sur les 124 résidus acides d'Imp β , seuls 33 sont impliqués dans des pont salins avec Rev dans les différents modèles obtenus par HADDOCK (**Tableau 2.6**, page 93). Ces résidus, ainsi que des résidus acides à proximité, sont indiqués dans la **Figure 3.3**). Certains de ces résidus interagissent avec Rev dans plus d'un modèle HADDOCK et seraient donc à privilégier lors du choix des mutants à construire (ex. les résidus E152, D288, D292, E437, E479, D753, D756 et E767 qui sont impliqués dans des ponts salins dans au moins 3 clusters différents). Comme la montre la **Figure 3.3**, certains résidus acides sont groupés ensemble sur la surface d'Imp β . C'est le cas par exemple, des résidus E281, D288, D289 et D292, qui sont impliqués dans l'interaction avec trois résidus basiques de Rev selon les configurations HADDOCK de Cluster 1. Dans un premier temps, nous pourrions imaginer réaliser un mutant d'Imp β comportant tous ces résidus acides afin d'augmenter la probabilité d'identifier un épitope de liaison. La boucle acide des résidus 338 à 341 serait également intéressante à déleter. En effet, cette déletion servirait à valider les modèles de trois clusters (5, 7 et 8).

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
 3.1. PERSPECTIVE D'UN MODÈLE STRUCTURAL DU COMPLEXE

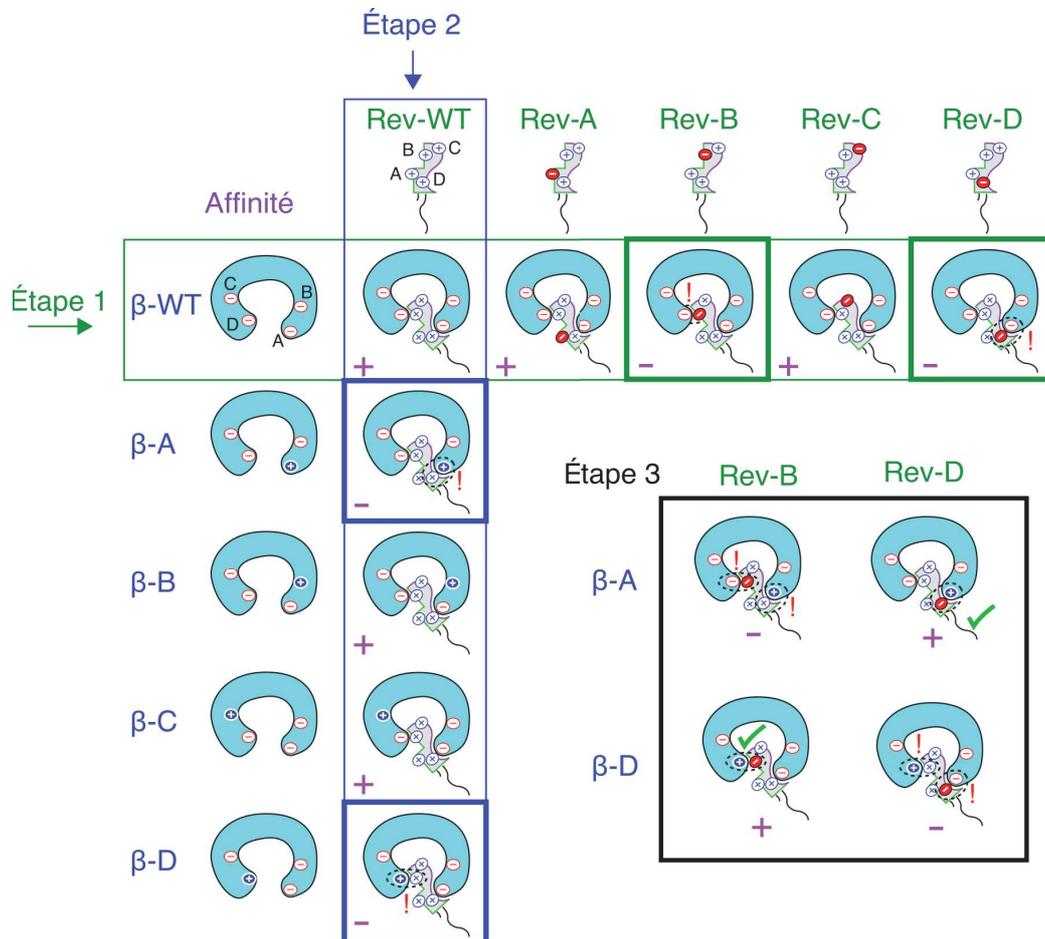


FIGURE 3.2 – **Stratégie de mutagenèse.** Dans une première série d'expériences (Étape 1), des mutations de Rev sont réalisées en remplaçant des résidus basiques par des résidus acides (mutants Rev-A à Rev-D). Ces mutants sont ensuite testés dans un essai d'interaction (ex. gel natif ou "pull-down") afin d'identifier ceux ayant une baisse d'affinité pour Impβ (ex. Rev-B et Rev-D). Dans une deuxième série d'expériences (Étape 2), des mutations d'Impβ sont réalisées en remplaçant des résidus acides par des résidus basiques (mutants β-A à β-D). Ces mutants sont ensuite testés pour identifier ceux ayant une baisse d'affinité pour Rev^{WT} (ex. β-A et β-D). Finalement, les mutants de Rev et d'Impβ identifiés dans les deux premières étapes sont testés en combinaison (Étape 3). Une paire de mutations qui restitue l'affinité des protéines sauvages indiquerait une interaction entre les résidus impliqués (ex. les résidus A et D d'Impβ avec les résidus D et B de Rev, respectivement).

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
 3.1. PERSPECTIVE D'UN MODÈLE STRUCTURAL DU COMPLEXE

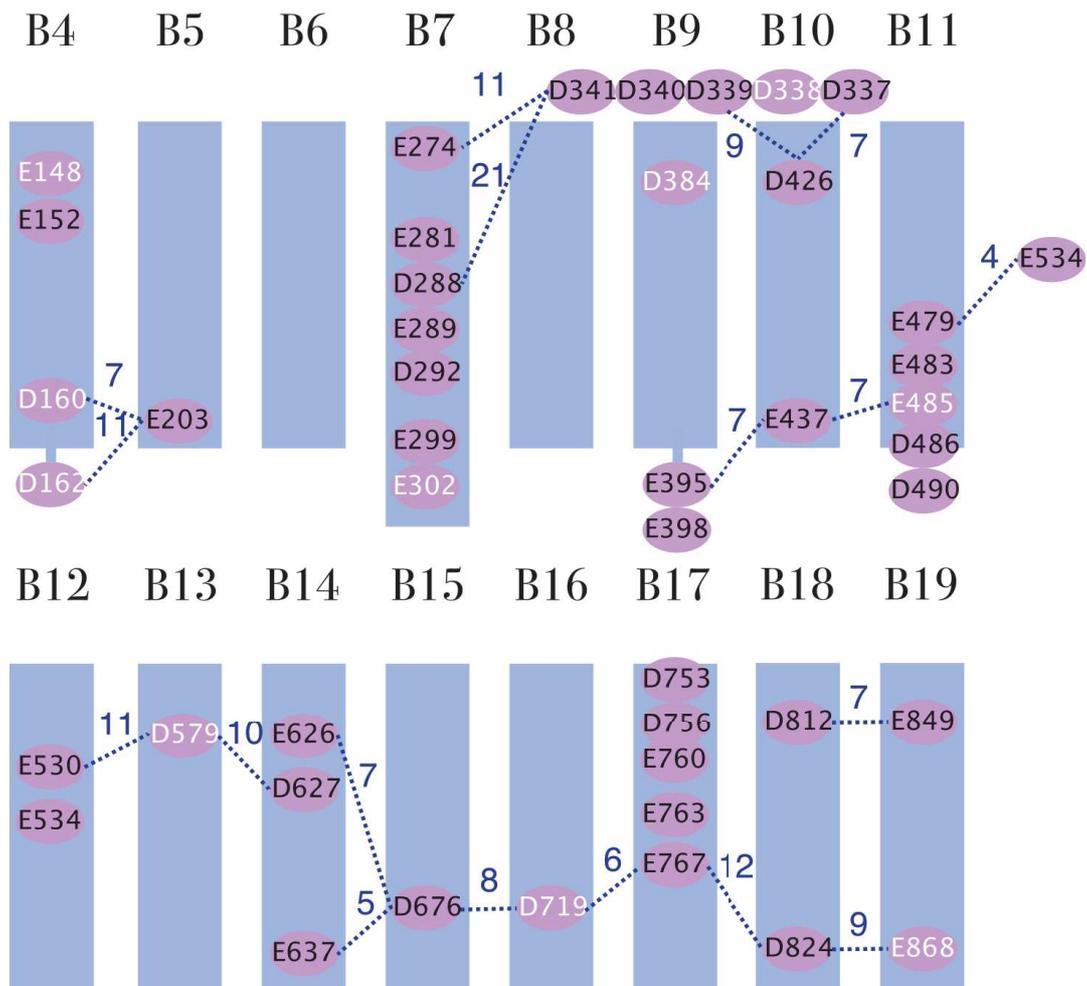


FIGURE 3.3 – Schéma des résidus acides d'Imp β susceptibles d'interagir avec Rev. Sont mises en évidence les hélices B d'Imp β en bleu, ainsi que les distances (en Å) entre les atomes C α des différents résidus acides de la structure 1QGK. Les résidus acides impliqués dans un pont salin avec Rev dans nos modèles HADDOCK sont indiqués en noir, tandis que les résidus acides en proximité sont indiqués en blanc.

3.2 À propos de la stœchiométrie $\text{Imp}\beta$: Rev

Nos données biophysiques et biochimiques indiquent qu' $\text{Imp}\beta$ fixe deux monomères de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ tandis qu'il ne fixe qu'un seul monomère de Rev^{V16D} . Ce résultat semble paradoxal puisque Rev^{V16D} forme un dimère en solution, tandis que $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ est monomérique. Autrement dit, $\text{Imp}\beta$ favorise la dissociation du dimère formé par Rev^{V16D} tout en favorisant la fixation de deux monomères de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$. Comment cela est-il possible? Nos modèles HADDOCK offre une explication de comment $\text{Imp}\beta$ pourrait favoriser la dissociation de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ dimérique. $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ se dimérise par des interactions de type queue-à-queue, comme observées dans la structure de Daugherty et al., 2010b. L'alignement de cette structure avec un modèle du complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$, obtenu par HADDOCK et appartenant au Cluster 1, montre que la deuxième copie de Rev dans le dimère chevauche la structure d' $\text{Imp}\beta$. Le modèle est donc incompatible avec la structure du dimère. En répétant cet exercice pour les 8 Clusters nous pouvons observer qu'aucun n'est compatible avec la structure du dimère (**Tableau 3.1**). Le chevauchement entre le dimère de Rev et $\text{Imp}\beta$ est montré pour le Cluster 2 dans la **Figure 3.4 (a)**. L'interface queue-à-queue alternative observée dans la structure de Rev lié à l'ARN (Jayaraman et al., 2014) est également incompatible avec tous les modèles HADDOCK à l'exception, peut-être, du Cluster 7, qui serait compatible si $\text{Imp}\beta$ était légèrement plus étendue (**Tableau 3.1**). Il en est autrement lorsqu'il s'agit de l'interface tête-à-tête. En effet, une vérification de nos modèles HADDOCK montre que le Cluster 2 est parfaitement compatible avec ce type de dimère, comme le montre la **Figure 3.4 (b)**, et que les Clusters 1 et 4 seraient compatibles dans le cas d'une conformation d' $\text{Imp}\beta$ plus étendue.

Pourquoi cette différence entre les deux types de dimère? Dans le cas du dimère tête-à-tête, les résidus impliqués dans l'interface se trouvent près du bas de l'épingle hélicoïdale de Rev. Cette region est loin d' $\text{Imp}\beta$ dans le cas des Clusters 1, 2, et 4, permettant ainsi à un deuxième monomère de Rev de se fixer sans encombrement stérique (ou presque) de la part d' $\text{Imp}\beta$. Par contre, dans le dimère de type queue-à-queue, les résidus basiques R48 et R58 de Rev se localisent dans l'interface de dimérisation, tandis que le résidu R44 est à forte proximité. Or, au moins un de ces

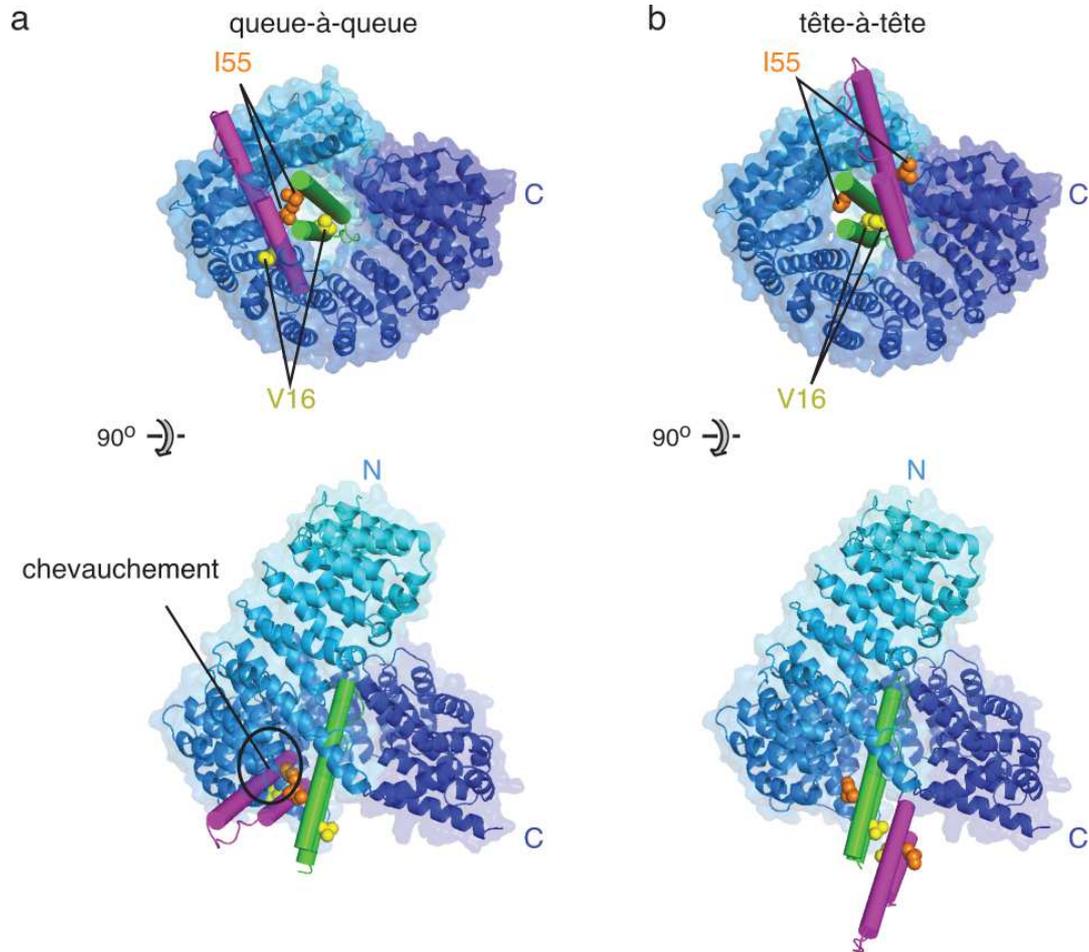


FIGURE 3.4 – **Superposition d'un modèle HADDOCK du complexe $\text{Imp}\beta$ /Rev avec Rev dimérique.** Le modèle du complexe $\text{Imp}\beta$ /Rev appartient au Cluster 2. Ce modèle a été aligné avec un dimère de Rev possédant une interface de type (a) queue-à-queue, comme observée dans la structure de (Daugherty et al., 2010b; PDB ID 3LPH) ou (b) tête-à-tête, comme observée dans la structure de (DiMattia et al., 2010; PDB ID 2X7L). Un chevauchement entre $\text{Imp}\beta$ et le monomère de Rev en magenta est évident dans (a), mais pas dans (b).

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
3.2. À PROPOS DE LA STÉCHIOMÉTRIE $\text{Imp}\beta$: REV

TABLEAU 3.1 – **Compatibilité des modèles HADDOCK avec un dimère de Rev.**

- 1 Dimère observé dans $\text{Rev}^{L12S/L60}$ isolé (Daugherty et al., 2010b ; PDB ID 4PMI).
2 Dimère observé dans le complexe de $\text{Rev}^{L12S/E47A/L60R}$ avec l'ARN (Jayaraman et al., 2014 ; PDB ID 4PMI)
3 Dimère observé dans le complexe de Rev avec un fragment F_{ab} (DiMattia et al., 2010 ; PDB ID 2X7L).
4 Cette configuration serait compatible avec un dimère de Rev si $\text{Imp}\beta$ était plus étendue.

Cluster:	1	2	3	4	5	6	7	8
Interface déstabilisée par R38D/R39L	++	++	-	±	++	±	±	++
Compatible avec un dimère de Rev?								
¹ Dimère queue-à-queue	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
² Dimère queue-à-queue (alternatif)	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
³ Dimère tête-à-tête	Non ⁴ (Oui)	Oui	Non	Non ⁴ (Oui)	Non	Non	Non	Non
Accessible à un autre monomère de Rev?								
V16D	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
I55N	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non

trois résidus interagit avec $\text{Imp}\beta$ dans chacune des configurations spécifiées par les 8 Clusters (**Tableau 2.6**). La coexistence de l'interface entre Rev et $\text{Imp}\beta$ et de celle entre les deux monomères de Rev est donc stériquement interdite. Il est donc facile de comprendre pourquoi $\text{Imp}\beta$ fixe la forme monomérique de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ plutôt que la forme dimérique.

Par contre, il est plus difficile d'envisager pourquoi et comment $\text{Imp}\beta$ fixe deux monomères de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$. Supposons, par exemple, qu' $\text{Imp}\beta$ reconnaît le premier monomère de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ de la même façon (c'est-à-dire dans la même conformation et orientation) que Rev^{V16D} . Dans ce cas, est-il possible qu'un deuxième monomère de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ s'associe par l'interface de type tête-à-tête illustrée dans la **Figure 3.4 (b)** ? La réponse est, de toute évidence, non. Puisque la mutation I55N se trouve du côté "queue" (**Figure 3.5 (a)**), la surface "tête" est identique à celle du simple mutant Rev^{V16D} . De ce fait, si $\text{Imp}\beta$ peut fixer un deuxième monomère de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ par l'interface tête-à-tête, il devrait également pouvoir fixer un deuxième monomère de Rev^{V16D} . Or, cela n'est pas le cas (**Figure 3.5 (b)**). D'ailleurs, est-il possible qu'un deuxième monomère de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ s'associe par l'interaction de type queue-à-queue illustrée dans la **Figure 3.4 (a)** ? Encore une

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
 3.2. À PROPOS DE LA STÉCHIOMÉTRIE $\text{Imp}\beta$: REV

fois, la réponse est non, puisque dans ce cas $\text{Imp}\beta$ devrait également pouvoir fixer un deuxième monomère de Rev^{V16D} , surtout que les interactions de type queue-à-queue sont plus fortes pour ce mutant que pour $\text{Rev}^{V16D/I55N}$. Nous sommes donc obligés d'imaginer un scénario plus complexe. Trois hypothèses, résumées dans la **Figure 3.5 (c)**, viennent à l'esprit :

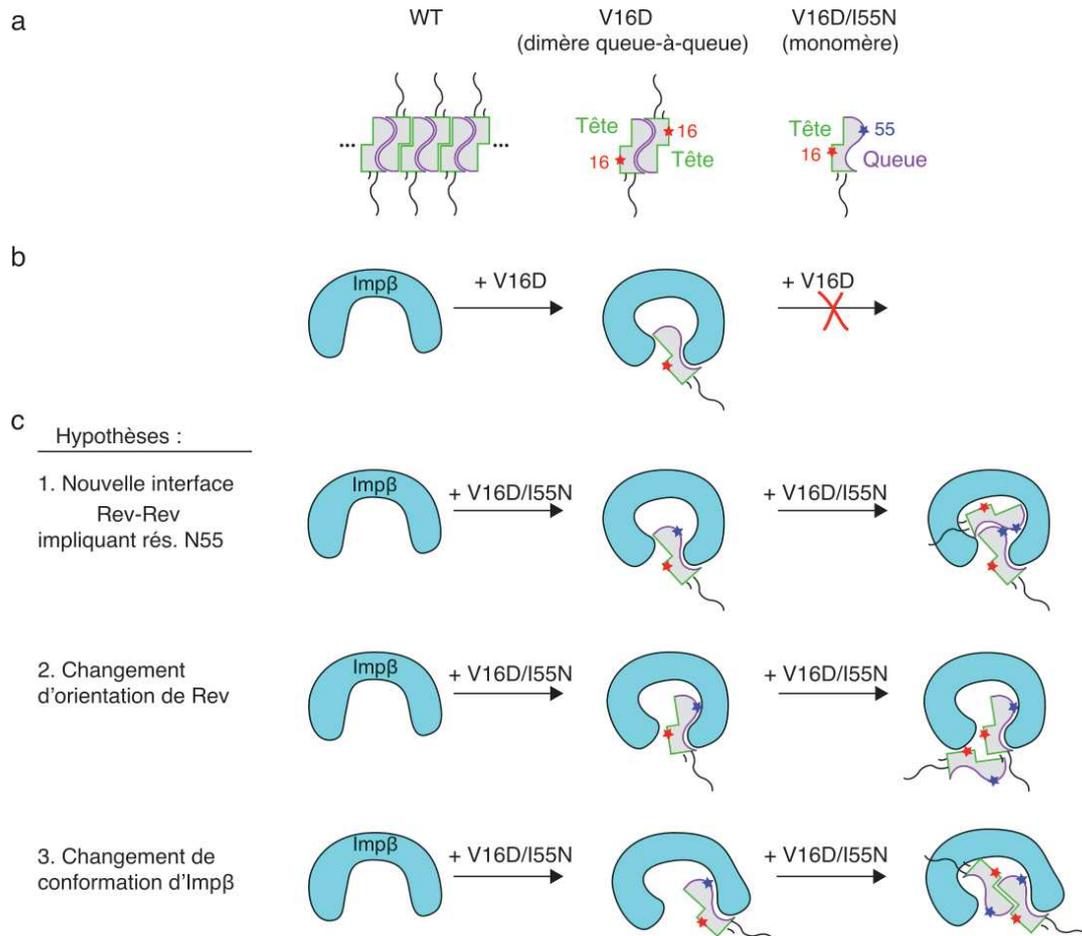


FIGURE 3.5 – Fixation d'un dimère de Rev sur $\text{Imp}\beta$. (a) Résumé de l'état oligomérique des différentes constructions de Rev en absence d' $\text{Imp}\beta$. (b) $\text{Imp}\beta$ fixe Rev^{V16D} principalement dans une forme monomérique. (c) Hypothèses concernant la fixation des deux monomères de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ à $\text{Imp}\beta$.

- (1) Un nouveau type d'interaction entre le premier et deuxième monomère de Rev est créée par la mutation I55N. Puisque $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ est monomérique en solution, l'interface impliquant le deuxième monomère de Rev doit forcément

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
3.2. À PROPOS DE LA STÉCHIOMÉTRIE $\text{Imp}\beta$: REV

impliquer des résidus d' $\text{Imp}\beta$ aussi.

- (2) $\text{Imp}\beta$ reconnaît Rev^{V16D} et le premier monomère de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ dans des orientations différentes. Cela engendrerait une surface de liaison unique au complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}^{V16D/I55N}$ qui pourrait fixer une deuxième copie de Rev.
- (3) $\text{Imp}\beta$ adopte une conformation différente lorsqu'il fixe les deux mutants. Comme dans le cas ci-dessus, cela créerait une surface de liaison unique au complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}^{V16D/I55N}$ pouvant fixer un deuxième monomère de Rev.

Selon les modèles HADDOCK les plus cohérents avec l'observation que la mutation R38D/R39L diminue l'affinité de Rev pour $\text{Imp}\beta$ (les Clusters 1, 2, 5 et 8), le résidu I55 n'est pas stériquement accessible pour pouvoir interagir avec un deuxième monomère de Rev (**Tableau 3.1**). Cette observation semble donc privilégier les hypothèses 2 et 3. Ces dernières hypothèses sont aussi cohérentes avec nos données SAXS qui indiquent une structure plus compacte pour le complexe d' $\text{Imp}\beta$ avec $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ qu'avec Rev^{V16D} .

Tout cela a-t-il une pertinence biologique ? Il est fort possible que la fixation du deuxième monomère de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ ne soit qu'un simple artefact, compte tenu du fait qu' $\text{Imp}\beta$ ne fixe qu'un seul monomère de Rev^{V16D} . Cependant, nous avons des données préliminaires de spectrométrie de masse native qui suggèrent qu' $\text{Imp}\beta$ pourrait fixer un deuxième monomère de Rev^{WT} avec une faible affinité. Ces données sont à vérifier par d'autres expériences, notamment par ITC. En tout cas, vu la tendance de Rev à se multimériser même à faible concentration, nous sommes tentés de penser qu'un deuxième site de liaison de Rev sur $\text{Imp}\beta$ pourrait avoir une certaine pertinence. L'affinité de ce site pour Rev, ordinairement faible, serait augmentée par la mutation I55N.

L'observation qu' $\text{Imp}\beta$ liée à deux copies de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ est considérablement plus compacte qu'elle lorsqu'il est liée à une seule copie de Rev^{V16D} est intrigant. Plus précisément, il est connu que la conformation d' $\text{Imp}\beta$ peut moduler son affinité pour certains Nups. Par exemple, la fixation de RanGTP verrouille $\text{Imp}\beta$ dans une confor-

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

3.3. CONCLUSION

mation plus rigide qui empêche sa liaison à des FG-Nups (Bayliss et al., 2000b ; Lee et al., 2005). Il n'est pas inconcevable qu'un deuxième monomère de Rev se fixant à $\text{Imp}\beta$ ait un effet similaire. Cela pourrait représenter un mécanisme allostérique de régulation négative : une fois que la concentration cytoplasmique de Rev dépasse un certain seuil, il fixe le deuxième site d' $\text{Imp}\beta$ et l'empêche d'interagir avec le pore nucléaire, inhibant ainsi l'import nucléaire de Rev. Une autre possibilité, également très hypothétique, serait qu'une fois que Rev dépasse un seuil de concentration dans le cytoplasme, il est importé dans le noyau deux molécules à la fois, augmentant ainsi le taux d'export des ARN non épissés. Une dernière hypothèse : Rev est exporté du noyau en tant que multimère lié au RRE avec une haute affinité. Or, Rev doit se dissocier du RRE pour être recyclé au noyau. Comment la dissociation du complexe Rev/RRE est réalisée est peu connu mais il n'est pas impossible qu' $\text{Imp}\beta$ joue un rôle. Cependant, le motif ARM, l'épitope principal reconnu par $\text{Imp}\beta$, est stériquement inaccessible lorsque Rev interagit avec l'ARN. Nous pourrions spéculer qu' $\text{Imp}\beta$ est initialement recrutée au complexe Rev/RRE par le biais de son deuxième site d'interaction avec Rev à basse affinité. Une fois associée au complexe, $\text{Imp}\beta$ pourrait ensuite plus facilement arracher un monomère de Rev par son premier site d'interaction à haute affinité. En conclusion, plusieurs scénarios sont envisageables et peuvent donner une signification à la stoechiométrie observée pour le complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}^{V16D/I55N}$.

3.3 Conclusion

L'objectif de ce projet était de résoudre la structure tridimensionnelle du complexe $\text{Imp}\beta/\text{Rev}$. Grâce aux travaux réalisés au cours de ma thèse, d'importantes données biochimiques et biophysiques ont été obtenues. Ces données ont permis de proposer un certain nombre de modèles structuraux, qui pourront être validés par des expériences de mutagenèse à l'avenir. Mes résultats éclaircissent aussi la démarche à suivre pour obtenir une résolution de la structure du complexe. Finalement, mes travaux ont soulevé une nouvelle question concernant le nombre de molécules de Rev liées par $\text{Imp}\beta$, éventuellement pertinente pour le cycle d'infection du VIH. Pour conclure, il reste encore beaucoup à apprendre sur l'import nucléaire de Rev :

CHAPITRE 3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
3.3. CONCLUSION

ce travail de thèse devrait faciliter les futurs efforts tendant à élucider la structure et la fonction de cette protéine cruciale pour la réplication du virus.

Chapitre 4

Matériels et méthodes

4.1 Stratégies globales utilisées pour le clonage

4.1.1 Importin β incorporant une étiquette histidine

Afin de faciliter la purification d'Imp β , j'ai décidé d'ajouter une étiquette poly-histidine en partie N-terminale d'Imp β . L'ajout de cette étiquette a été effectué à l'aide de la stratégie de clonage *Fragment exchange* (FX) qui fut développé afin de permettre un clonage haut débit (Geertsma and Dutzler, 2011). La technique FX (**Figure 4.1**) est basée sur l'amplification du cadre de lecture codant pour la protéine d'intérêt tout en ajoutant aux extrémités un site de restriction pour une enzyme de type IIS. À la différence des enzymes de restriction les plus utilisés, les types IIS ont un site de reconnaissance en amont du site de clivage. Cette stratégie permet ainsi le clivage de n'importe quelle séquence nucléotidique. La bibliographie sur cette technique décrit l'utilisation de SapI ou d'une autre isoschizomère (BspQI, LguI, PciSI). Le fait que le clivage se fait en aval du site de reconnaissance sur un site contenant une séquence arbitraire de trois nucléotides (**Figure 4.1 (a)**) permet à la fois l'orientation du cadre de lecture et également de ne pas ajouter d'acides aminés supplémentaires dans la séquence d'intérêt. Le produit PCR du gène d'intérêt ayant ses extrémités cohésives est directement mélangé à un vecteur contenant aussi ses

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1. STRATÉGIES GLOBALES UTILISÉES POUR LE CLONAGE

sites de reconnaissances et de clivage. L'avantage est de pouvoir effectuer directement la digestion enzymatique du plasmide et du produit PCR en même temps et de directement poursuivre par une étape de ligation (**Figure 4.1 (b)**). Deux cas de figures peuvent se produire après transformation. Soit le plasmide originel ayant les deux gènes codant pour les protéines létales *ccdB* et *sacB* est introduit dans les bactéries et il n'y a pas de croissance microbienne, soit l'insert d'intérêt a remplacé le gène codant pour la protéine *ccdB* et dans ce cas les bactéries peuvent se diviser.

Le plasmide pMMIP2 utilisé est un dérivé du plasmide pETM11. Ce dernier contient deux marqueurs de sélection négative, c'est-à-dire les deux gènes codant pour la protéine *ccdB* et *sacB*. Le vecteur possède aussi une étiquette de 6 histidines en partie N et C terminale et deux sites de restrictions *SapI* aux extrémités de la protéine *ccdB*. Ce vecteur a été créé par Florent Bernaudat, lorsqu'il effectuait un postdoctorat au sein de notre laboratoire. Ce plasmide doit être amplifié à l'aide de la souche bactérienne *Escherichia coli* DB3.1 qui contient un marqueur de résistance pour *ccdB* dans son chromosome. Il existe différents pMMIP au sein du laboratoire, permettant de cloner très facilement diverses constructions en y ajoutant à notre guise une étiquette poly-histidine, un site de clivage à la protéase TEV ainsi qu'entre les deux soit une *Maltose Binding Protein* (pMMIP3), soit une *Green Florescent Protein* (pMMIP4), soit rien (pMMIP2; cf. Annexe H, page 200).

Importin β était originalement dans un plasmide pQE60 et contenait un site de restriction *BsqI* dans la séquence nucléotidique. Pour retirer le site de restriction dans la séquence nucléotidique, une mutagenèse a été réalisée (cf. 4.1.2, page 131). Les amorces utilisées étaient ImpBBsqIIMutF et ImpBBsqIIMutR (cf. Annexe I, page 202).

Les amorces FXImpBF et FXImpBR ont été utilisées pour réaliser l'amplification de l'insert en suivant le protocole commercial (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs®). Les séquences des amorces sont les suivantes :

FXImpBF 5'-atatatGCTCTTCtATGGAGCTGATCACCATTCTCG-3'

FXImpBR 5'-atatatGCTCTTCaTGCTCAAGCTTGGTTCTTCAGTTTCC-3'

En vert est représenté le site de reconnaissance de *SapI*, en rouge la séquence de

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
 4.1. STRATÉGIES GLOBALES UTILISÉES POUR LE CLONAGE

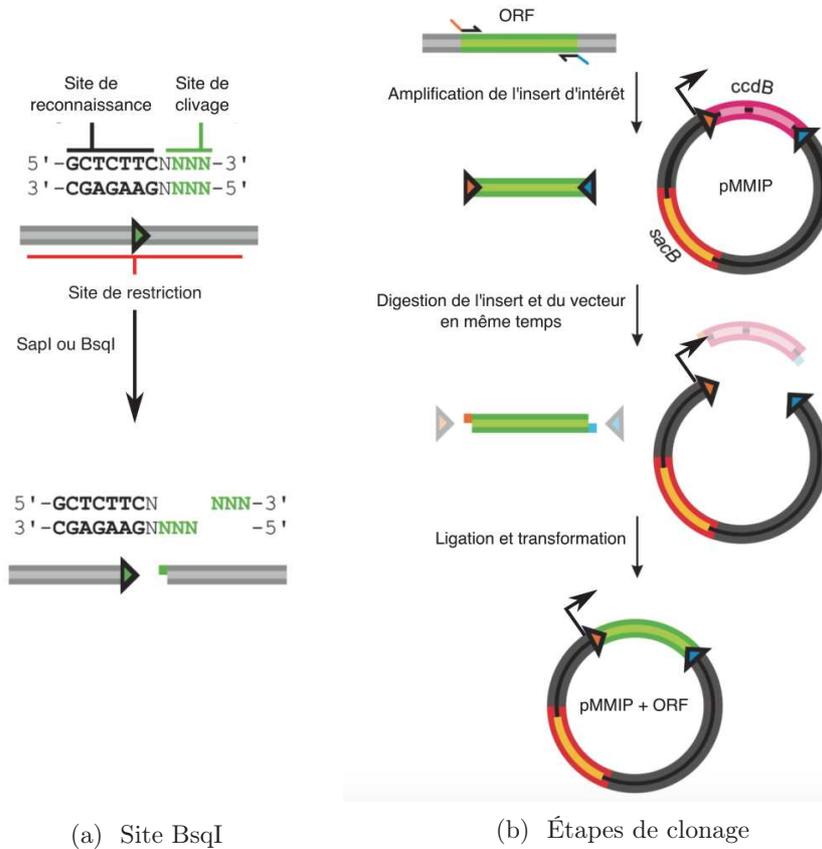


FIGURE 4.1 – Schéma représentant le clonage par technologie FX. (a) Caractéristiques des sites de restrictions IIS en prenant comme exemple le site BspI. Le site de reconnaissance de BspI est en gras. Les trois nucléotides qui seront dans le site de clivage et fournissent les extrémités cohésives sont en vert. N décrit n'importe lequel des quatre nucléotides naturels. Une vue schématique du clivage est montrée, les flèches indiquent la direction du site de reconnaissance par rapport au site de clivage (orientation 5' à 3') au niveau des sites de restrictions. (b) Le fragment amplifié contenant le cadre de lecture ouvert d'intérêt est montré en vert. La direction des sites de restrictions IIS est indiquée par des flèches colorées afin de correspondre à leurs respectives complémentarités après clivage enzymatique. Les gènes codant pour les marqueurs de sélections *ccdB* et *sacB* dans le plasmide pMMIP original sont colorés respectivement en magenta et orange. Schéma adapté (Geertsma and Dutzler, 2011).

Importin β et enfin en orange et bleu les trois nucléotides correspondant au site de clivage avec l'orientation schématique identique à la **Figure 4.1**.

Un gel d'agarose associé à une digestion à l'aide de l'enzyme BspI a été réalisé

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1. STRATÉGIES GLOBALES UTILISÉES POUR LE CLONAGE

pour vérifier que l'insert ne contenait pas ce site. Ensuite 100 ng de pMMIP2 ont été mélangés avec 500 ng d'insert amplifiés, puis le tampon Tango a été ajouté à une concentration finale de 1X ainsi que 1 μl d'enzyme BspI (Fermentas) à 5U/ μl . L'incubation enzymatique a été réalisée pendant 1 h à 37°C. L'enzyme a été inactivée en plaçant le milieu réactionnel pendant 20 min à 60°C. La ligation a été effectuée en ajoutant 1.5 μl d'ATP à 10 mM et 2.5 μl d'ADN ligase T4 (Fermentas) au milieu réactionnel. L'incubation a été réalisée pendant 1 h à température ambiante suivie de 10 min à 65°C. Finalement des cellules DH5 α (New England Biolabs®) ont été transformées avec 5 μl de mélange réactionnel. Une étape de séquençage a déterminé le succès de l'obtention du clone d'intérêt.

4.1.2 Mutagenèse dirigée

Le protocole de mutagenèse de Marjolaine Noirclerc-Savoie a été employé pour réaliser diverses constructions. Il a été utilisé par exemple pour réaliser les mutants de Rev et d'Imp β . Une séquence nucléotidique complémentaire avec le plasmide en amont et en aval de ces mutations a été ajouté aux amorces. La température de fusion théorique (T_m) était entre 55 et 60°C, le pourcentage en guanine et cytosine entre 40 et 60% et préférentiellement les amorces possédaient à leurs extrémités une guanine ou une cytosine.

Pour réaliser l'amplification des plasmides le kit de l'enzyme Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs®) a été utilisé. Brièvement, le milieu réactionnel contenait le tampon GC% du kit à une concentration finale de 1X. Ensuite ont été ajoutés : 1 μl d'un mélange équimolaire des quatre nucléotides à une concentration de 10 mM; 2.5 μl de chacune des deux amorces à une concentration de 2 μM ; 10 ng de vecteur à modifier et 2.5 μl de DMSO. De l'eau distillée et stérilisée a été ajoutée afin d'atteindre un volume de 49.5 μl . Finalement, 0,5 μl d'ADN polymérase a été ajouté. Dans le cas de la réalisation de deux mutations, soit ces dernières étaient suffisamment proches pour être placées sur la même paire d'amorces (par exemple l'incorporation de la double mutation de Rev^{L12S/L18Q}), soit il fallait incorporer deux mutations distantes en même temps (par exemple Rev^{V16D/I55N}). Dans ce cas, les deux paires d'amorces ont été placées dans le milieu réactionnel en

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

divisant par deux le volume ou la concentration de ces dernières.

Ensuite une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'un thermo-cycleur a été réalisée. Le protocole comprenait une première étape de dénaturation (98°C pendant 30 secondes), suivie de 18 cycles de polymérisation (98°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 1 min, 72°C pendant 1 min par kilobase de plasmide). Afin de terminer la polymérisation de tous les fragments dans le milieu réactionnel une extension à 72°C pendant 10 min a été réalisée à la fin.

Afin de digérer le vecteur initial présent en solution le produit de PCR a été traité par DpnI (Fermentas). 18 µl de produit PCR a été mélangé avec 2 µl de tampon Tango 10X et 2 µl de DpnI (10U/µl). L'incubation à 37°C a duré pendant 1 h, puis le milieu a été chauffé pendant 20 min à 80°C pour inactiver l'enzyme. Enfin des cellules DH5α (New England Biolabs®) ont été transformées par le produit réactionnel et pour s'assurer du succès de la mutagenèse un séquençage a été effectué sur le plasmide purifié.

4.2 Production et purification des protéines

4.2.1 Purification de la protéase TEV

La protéase TEV est une enzyme issue du virus de la gravure du tabac (*Tobacco Etch Virus*). Cette enzyme reconnaît une séquence précise d'acides aminés et permet de couper à cet endroit spécifiquement. Le motif de clivage et de reconnaissance optimal est le suivant : ENLYFQ/S. La sérine en position C terminale peut être remplacée par une glycine. Toutes les constructions ayant un site de clivage à la protéase TEV employée lors de cette thèse contiennent ce motif. Cela confère aux protéines de fusion après clivage une glycine supplémentaire en partie N terminale. J'ai choisi la glycine au lieu de la sérine, car c'est l'acide aminé qui me semble le plus simple pour éviter de changer les propriétés physicochimiques de l'échantillon.

Les cellules bactériennes (BL21(DE3)) ayant un plasmide codant pour l'expression de cette enzyme ont été données par Cyril Dian, un ancien postdoctorant de notre

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

équipe, lui-même ayant reçu le plasmide de l'EMBL à Heidelberg. Cette enzyme incorpore une étiquette poly-histidine dans sa partie N-terminale. 12 litres de cultures ont été préparés. La culture a été incubée à 37°C jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0,9. Ensuite, l'ajout de 1 mM d'IPTG a provoqué l'induction de l'expression de la protéine de fusion d'intérêt et la culture a été incubée pendant 3 h supplémentaires à 27°C.

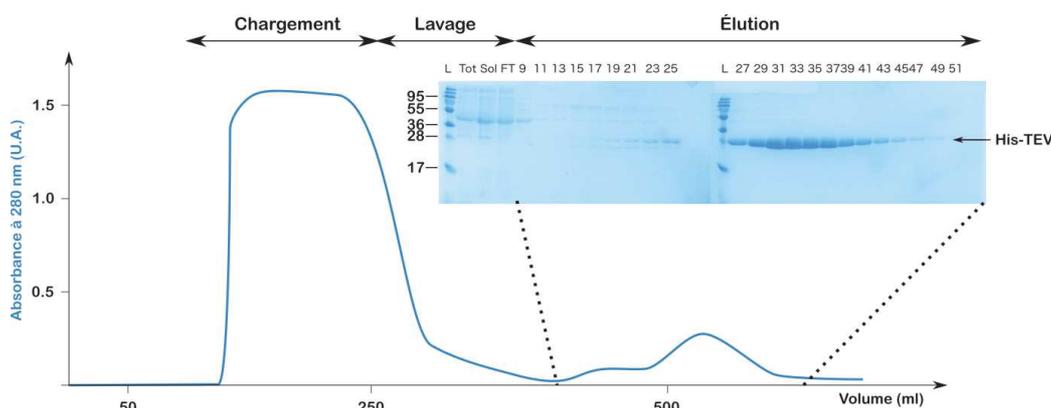


FIGURE 4.2 – **Purification de la protéase par chromatographie d'affinité Ni-NTA.** La courbe représente l'absorbance lue à 280 nm en fonction du volume d'éluion (en bleu). Les pointillés indiquent les fractions prélevées (tubes 9 à 51). Le lysat total (Tot), le lysat soluble après centrifugation (Sol), le filtrat ("Flow-Through", FT), les diverses fractions d'éluion et un marqueur de poids moléculaire (L, unité en kDa) sont analysés sur gel dénaturant (12% acrylamide).

Les bactéries ont été ensuite centrifugées pendant 10 min à 7550 g et resuspendues dans 75 ml de tampon de lyse (50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM β -mercaptoéthanol, 25 mM imidazole pH 8.0, 10% glycérol, deux tablettes d'anti-protéases (Roche)). Une sonication a été réalisée pour détruire les cellules et le lysat a été centrifugé à 40000 g pendant 30 min à 4°C pour précipiter les agrégats insolubles. Le surnageant a ensuite été chargé à travers 5 colonnes en série de 5 ml déjà conditionnées contenant une résine Ni-NTA (MACHEREY-NAGEL) équilibrée dans du tampon de lyse. Les colonnes ont été ensuite lavées avec 75 ml de tampon de lavage (tampon de lyse + 4% de tampon d'éluion). Enfin un gradient de 200 ml de 4% à 100% de tampon d'éluion (50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, 300 mM imidazole pH 8.0, 10% glycérol) a été réalisé, et des fractions de 5 ml ont été collectées.

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

Cette seule étape permet d'obtenir une protéine pure à plus de 99% (Figure 4.2).

Les fractions contenant de la protéase TEV ont été rassemblées puis du glycérol a été ajouté (concentration finale à 30%). La concentration de protéine était de l'ordre de 1 mg/ml. Ensuite la solution protéique a été divisée en aliquotes qui ont été congelées rapidement à l'aide d'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80°C et utilisés en fonction des besoins.

4.2.2 Purification d'Importin α et préparation de la colonne d'affinité

Afin de préparer la résine de Sepharose réticulée avec Imp α , il fallait d'abord purifier cette protéine. La construction exprimant Imp α disponible au laboratoire contient une étiquette histidine et sa purification s'effectue en réalisant trois étapes de chromatographies différentes (**Figure 4.3**).

12 litres de cultures ont été préparés. L'incubation à 37° des cellules a été effectuée jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm atteigne 0.5, ensuite l'induction de l'expression protéique a été réalisée en ajoutant 0.5 mM d'IPTG. La culture a continué à 20°C sur la nuit. Enfin, les cellules ont été centrifugées à 7550 g pendant 10 min.

Le culot bactérien a été resuspendu dans 125 ml de tampon de lyse (20 mM HEPES pH 7.5, 600 mM NaCl, 10% glycérol, 10 mM imidazole pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM β -mercaptoéthanol, une tablette d'anti-protéases (Roche)). Une étape de sonication a été réalisée pour lyser les cellules et l'échantillon a été clarifié par centrifugation (40000 g pendant 30 min à 4°C). Le lysat soluble a été ensuite injecté à travers 5 colonnes en série de 5 ml contenant une résine Ni-NTA (MACHEREY-NAGEL) équilibrée dans le tampon de lyse. Ce dernier ne contenait pas de tablettes d'anti-protéases.

Ensuite 75 ml de tampon de lavage (50 mM HEPES pH 7.5, 1 M KCl, 500 mM MgCl₂, 25 mM imidazole pH 8.0, 5 mM β -mercaptoéthanol; **Figure 4.3 (a)**) suivi de 50 ml de tampon de lyse ont été injectés. Finalement, un gradient de 0% à 70% de tampon d'éluion (50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycérol, 300

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

mM imidazole pH 8.0, 5 mM β -mercaptoéthanol) a été réalisé sur 8 volumes de colonne (200 ml) suivi de 75 ml de tampon d'éluion et des fractions de 5 ml ont été collectées.

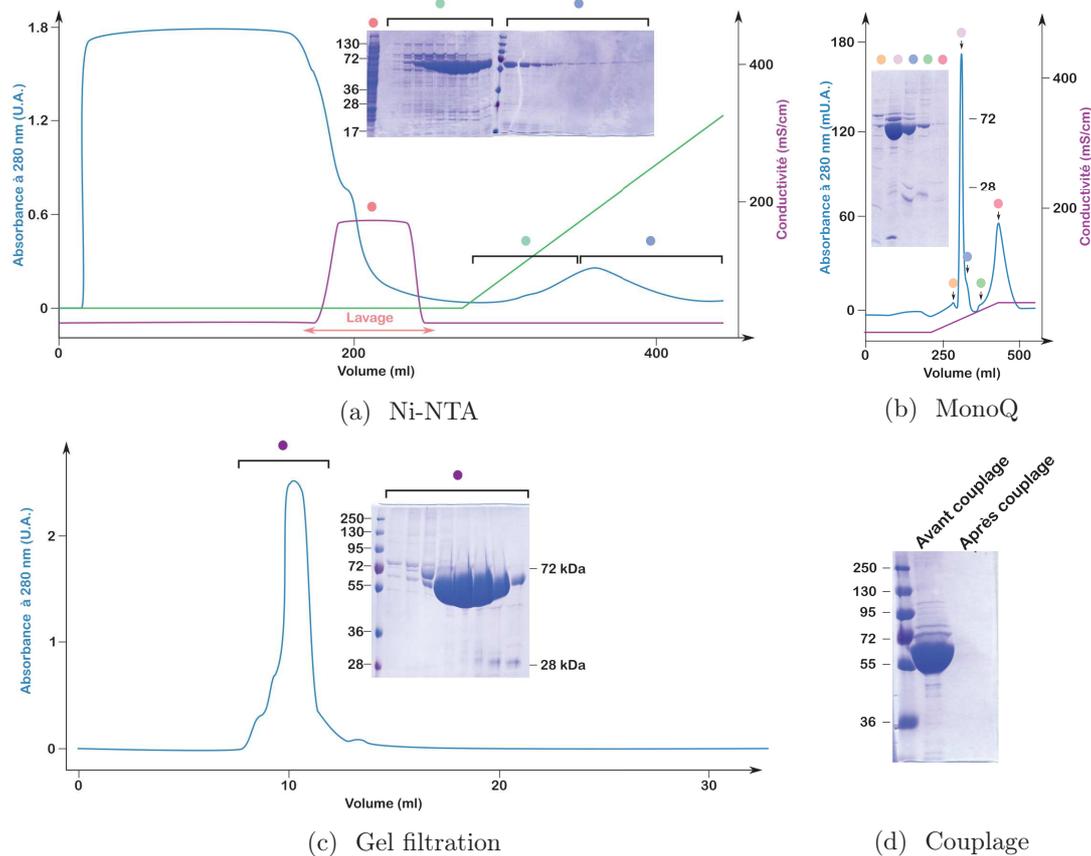


FIGURE 4.3 – **Purification d'Imp α et couplage sur la résine de Sepharose.** Sur les chromatogrammes, les courbes de l'absorbance détectée à 280 nm sont représentées en bleu, les courbes de conductivité en rose et le gradient du tampon d'éluion est indiqué en vert. Les fractions analysées sur gel dénaturant (12% acrylamide) sont indiquées par des cercles colorés. (a) Imp α purifiée par chromatographie d'affinité Ni-NTA. Chromatogramme et gel dénaturant (12% acrylamide). (b) Imp α purifiée par une étape d'échangeuse d'anion (MonoQ) après Ni-NTA. (c) Gel filtration (Superdex S75 10/300) d'Imp α . (d) Efficacité du couplage d'Imp α sur la résine de sepharose visualisée par gel dénaturant.

Les fractions contenant Importin α ont été mises ensemble et une dialyse contre 4 litres de tampon (20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol) a été réalisée pendant la nuit à 4°C . La solution a été ensuite passée dans 3 colonnes

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

contenant de la résine échangeuse d'anion (HiTrap MonoQ HP de 5 ml, GE Healthcare Life Science, **Figure 4.3 (b)**) équilibrée avec du tampon de dialyse. Afin de nettoyer la résine, 45 ml de tampon de dialyse ont été ajoutés. Enfin l'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient de 0% à 100% de tampon d'élution (20 mM HEPES pH 7.5, 600 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol) sur 15 volumes de colonne (225 ml). Ensuite il a été ajouté 60 ml de tampon d'élution. Le débit a été de 5 ml/min et des fractions de 5 ml ont été collectées.

Les fractions contenant Importin α ont été concentrées jusqu'à un volume approximatif de 500 μ l. Enfin une étape de gel filtration (Superdex S75 10/300 GL, GE Healthcare Life Science, **Figure 4.3 (c)**) a été réalisée à l'aide de deux injections de 250 μ l.

Une résine de Sepharose activée par du bromure de cyanogène a été utilisée pour immobiliser Imp α (CNBr-activated Sepharose 4B, GE Healthcare Life Science). Les solutions contenant Imp α avant et après réaction ont été analysées à l'aide d'un gel dénaturant (**Figure 4.3 (d)**). Après couplage il ne reste plus de protéine en solution, suggérant que le couplage a été efficace et que la totalité d'Imp α a été réticulée sur la matrice.

4.2.3 Purification d'Importin β

Historiquement, Importin β était purifiée au sein du laboratoire à l'aide d'une colonne d'affinité contenant une résine de sepharose où Importin α était immobilisée. Le processus de purification étant inefficace, j'ai choisi de rajouter une étiquette poly-histidine qui peut être ôtée en ajoutant également un site de clivage à la protéase TEV (cf. 4.1.1, page 128).

Protocole 1 :

Purification historique à l'aide d'Importin α

Deux litres de milieu LB/Ampicilline ont étéensemencés par une préculture de cellules BL21(DE3) contenant le plasmide pQE60 ayant comme insert la protéine

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

humaine Importin β . La culture a été réalisée à 37°C. La production de protéine a été induite en ajoutant 0.5 mM d'IPTG lorsque la densité optique à 600 nm était de 0.5. La culture a été poursuivie pendant 5 h à 30°C puis les cellules ont été centrifugées 10 min à 7550 g. Lors des tests d'expression une incubation après induction de 18h à 16°C et une autre de 3h30 à 37°C ont été testées.

35 ml de tampon de lyse (20 mM HEPES pH 7.5, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM β -mercaptoéthanol, une tablette d'anti-protéases [Roche]) ont été utilisés afin de resuspendre le culot bactérien, puis une étape de sonication a été réalisée pour lyser les cellules. Pour obtenir les protéines solubles, le lysat a été centrifugé à 40000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a subi une étape de précipitation au sulfate d'ammonium (45% de saturation puis centrifugation à 3500 g pendant 30 min à 4°C). Le culot a été resolubilisé dans 50 ml de tampon de resolubilisation (20 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM β -mercaptoéthanol) et chargé dans une colonne par gravité contenant 3.5 ml de résine couplée à Importin α équilibrée à l'aide du tampon de lavage (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, une tablette d'anti-protéases (Roche)).

Ensuite, 5 ml de tampon de lavage ont été appliqués et finalement l'élution a été réalisée en rajoutant 2 fois 3.5 ml de tampon d'élution (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 500 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, une tablette d'anti-protéases (Roche)). L'interaction étant électrostatique, le chlorure de magnésium est responsable de cette élution. 10 cycles ont été effectués afin de récupérer le maximum de protéines (équilibration, passage d'Imp β , élution). Les fractions ainsi éluées ont été mélangées et dialysées sur la nuit à 4°C contre 5 litres de tampon A (20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF). Le lendemain, le boudin de dialyse a été placé encore 3 h à 4°C dans 5 litres de tampon A frais.

Les protéines ont été concentrées jusqu'à un volume de 5 ml en utilisant un Centricon ayant un seuil de coupure de 50 kDa. Ensuite l'échantillon a été appliqué à 5 ml de résine échangeuse d'anions (HiTrap MonoQ HP, GE Healthcare Life Science) équilibrée avec le tampon A. Un nettoyage utilisant 6 ml de tampon A a été effectué et ensuite l'élution a été réalisée par un gradient sur 20 ml de 0% à 100% de tampon

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

B (même tampon que A avec 1 M NaCl). Ensuite 6 ml de tampon B ont été injectés. Des fractions de 500 μ l ont été collectées lors de cette étape de purification et le débit était de 5 ml/min, ce qui correspond au débit maximal recommandé.

Les fractions contenant Importin β ont été concentrées jusqu'à un volume approximatif de 1 ml et l'échantillon a été passé sur une colonne de gel filtration (HiLoad Superdex S200 10/300, GE Healthcare Life Science) équilibrée dans le tampon de cristallogénèse (20 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT). La concentration protéique a été déterminée par densité optique à 280 nm (DO_{280}) et à l'aide du coefficient d'extinction molaire déterminé par comparaison entre le lien de cette densité optique et la quantification des acides aminés (cf. 4.6, page 144).

Protocole 2 :

Purification d'Imp β contenant une étiquette histidine

Les cellules BL21(DE3) qui ont été utilisées possèdent un plasmide pMMIP2 (dérivé de pETM11, cf. 4.1.1, page 128). Ce dernier possède entre autres un gène de résistance à la kanamycine et un gène codant pour une protéine de fusion contenant une étiquette histidine, un site de clivage à la TEV et la protéine humaine Importin β . Ces cellules ont été cultivées sous forme de préculture à 37°C dans un milieu LB/Kanamycine et ont été utilisées le lendemain afin d'ensemencer 12 litres de milieu frais. La culture a été réalisée à 37°C jusqu'au moment où la valeur de la DO_{600} était de 0.6. Ensuite, l'induction de l'expression de la protéine de fusion d'intérêt a été réalisée par l'ajout de 0,5 mM d'IPTG et la culture a été poursuivie pendant 5 h supplémentaires à 30°C.

Les bactéries après culture ont été centrifugées pendant 10 min à 7550 g et resuspendues dans 100 ml de tampon de lyse (50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 5 mM β -mercaptoéthanol, 25 mM imidazole pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10% glycérol, une tablette d'anti-protéases (Roche)). Les cellules ont été lysées par sonication et les agrégats insolubles du lysat ont été clarifiés en centrifugeant l'échantillon à 40000 g pendant 30 min à 4°C. Le lysat ainsi clarifié a été ensuite injecté à travers 5 colonnes de 5 ml mises en série contenant une résine Ni-NTA (MACHEREY-NAGEL) équilibrée dans du tampon de lyse. 75 ml de tampon de

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

lavage (50 mM HEPES pH 7.5, 1 M KCl, 500 mM MgCl₂, 25 mM imidazole pH 8.0, 5 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF) ont été ensuite injectés. Finalement un gradient de 250 ml de 0% à 70% de tampon d'éluion (50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 5 mM β -mercaptoéthanol, 300 mM imidazole pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10% glycérol) a été réalisé, et des fractions de 5 ml ont été collectées.

Les fractions contenant Importin β ont été rassemblées, incubées avec 22,5 ml de protéase TEV de pureté supérieure à 99% (cf. 4.2.1, page 132). La solution protéique a été insérée dans un boudin de dialyse (12-14 kDa de seuil de coupure) et dialysée sur la nuit à 4°C contre le tampon de dialyse (50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol). La solution de protéines a à nouveau été passée sur les mêmes colonnes contenant de la résine Ni-NTA pré-équilibrées dans le tampon de dialyse et 50 ml de tampon de dialyse ont été rajoutés afin d'obtenir la fraction filtrat ("*Flow-through*").

Ensuite le filtrat contenant Importin β sans étiquette histidine a été concentré (50 kDa Amicon, Millipore) jusqu'à atteindre un volume de 5 ml. L'échantillon a été séparé en deux fois 2.5 ml, centrifugé à 16000 g pendant 10 min et injecté sur une colonne de gel filtration (HiLoad Superdex S200 16/60 Prep grad, GE Healthcare Life Science) équilibrée dans un tampon de stockage (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT). Le volume de la boucle était d'une capacité de 5 ml.

4.2.4 Rev

La protéine Rev et ses différents mutants et troncations ont été produits en fusion avec le domaine B1 de la protéine G de *Streptococcus pneumoniae* à l'aide d'un plasmide pET28a. En amont des diverses constructions de Rev la séquence nucléotidique code une étiquette histidine, le domaine protéique GB1 et un site de clivage à la TEV. Ces plasmides ont été transformés dans des cellules d'expression BL21(DE3) et à partir d'une préculture sur la nuit à 37°C de LB contenant de la kanamycine, deux litres frais ont étéensemencés. Toute la culture a été réalisée à 37°C et lorsque la densité optique à 600 nm a atteint 0.6 l'induction de l'expression protéique a été réalisée en ajoutant 1 mM d'IPTG dans le milieu de culture.

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

Après 3h30 les cellules ont été centrifugées (10 min à 7550 g) et remises en suspension dans 50 ml de tampon de lyse (25 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1% Tween20, 2 mM β -mercaptoéthanol, 2 mM PMSF, 100 mM Na₂SO₄, 5 mM MgCl₂, une tablette d'anti-protéases (Roche)). Ensuite 50 μ l de DnaseI (Euromedex) à 10 mg/ml et 50 μ l de Rnase A (Roche) à 10 mg/ml ont été ajoutés. Les cellules ont été lysées par sonication et le lysat a été centrifugé (40000 g pendant 30 min à 4°C).

La concentration en NaCl a été ramenée à 2 M, et 20 μ l de Rnase T1 à 100 U/ml et 250 μ l de Rnase A à 10 mg/ml ont été ajoutés. Cette réaction enzymatique a été réalisée pendant 1 h à température ambiante et a permis d'éliminer l'ARN contaminant. Après réaction, le lysat a été injecté à 3 ml/min à travers 2 colonnes de 5 ml contenant une résine Ni-NTA (Hi-Trap, GE Healthcare Life Science) équilibrée dans un tampon chargé en sel (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2M NaCl, 10 mM imidazole pH 8.0, 0.1% Tween20, 2 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM PMSF). Du tampon chargé en sel a été injecté pour nettoyer les colonnes jusqu'à ce que DO_{280} devienne stable, permettant de s'assurer de l'élimination des contaminants. Ensuite un nettoyage avec un tampon faiblement chargé en sel a été réalisé jusqu'à ce que la conductivité soit stable (250 mM NaCl). 60 ml de tampon d'élution (40 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl, 250 mM imidazole pH 8.0, 2 mM β -mercaptoéthanol) ont été ajoutés afin d'éluer les protéines de fusion.

7.2 ml de protéase TEV produite dans le laboratoire a été rajouté (99.9% pure, concentration \approx 1 mg/ml, cf. 4.2.1, page 132). Les protéines ont été placées dans un boudin de dialyse ayant un seuil de coupure de 3.5 kDa contre 5 litres de tampon (40 mM HEPES pH 7.5, 100 mM Na₂SO₄, 400 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoéthanol). L'incubation a été poursuivie sur la nuit à 4°C.

L'échantillon contenant les protéines d'intérêts a été réintroduit dans les colonnes contenant la résine Ni-NTA équilibrées dans le tampon de dialyse, et ce même tampon a été rajouté jusqu'à ce que la DO_{280} soit stable afin de récupérer la protéine clivée. Ensuite le même volume de tampon d'élution (40 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl, 250 mM imidazole pH 8.0, 2 mM β -mercaptoéthanol) a été ajouté. Les deux étapes de chromatographie d'affinité pour le Ni-NTA ont été réalisées à 4°C. Le contrôle de la température était critique afin d'empêcher la protéolyse de Rev.

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.2. PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

L'échantillon a été concentré à l'aide d'un Amicon (seuil de coupure de 10 kDa, Millipore) jusqu'à un volume final de 5 ml. L'échantillon a été séparé en deux fois 2.5 ml, centrifugé à 16000 g pendant 10 min et injecté sur une colonne de gel filtration (usuellement HiLoad Superdex S75 16/60 Prep grad, GE Healthcare Life Science) équilibrée dans un tampon de stockage (50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT).

D'autres colonnes ont été également utilisées dans un but analytique. C'est par exemple le cas pour les protéines Rev et Imp β qui ont été purifiées séparément ou en complexe à l'aide d'une colonne de gel filtration (GF) Superdex S200 15/150 GL équilibrée dans le même tampon (50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT).

La concentration protéique a été déterminée par la DO_{280} en utilisant des valeurs de coefficients d'extinction molaires (ϵ) déterminés par analyse des acides aminés. Dans le cas de Rev^{V16D/I55N} couplée à la fluorescéine (cf. 4.8.2, page 4.8.2), la concentration a été déterminée par la méthode de Bradford.

Dans le cas de la production de Rev avec des isotopes lourds, le protocole a été légèrement adapté (il nécessite la production des cellules en milieu minimum.; cf. 4.12, page 160).

4.2.5 RanQ69L

Des cellules BL21(DE3) contenant un plasmide pROEX ayant comme insert RanQ69L ont été précultivées à 37°C durant la nuit en milieu LB contenant de l'ampicilline. 2 l de milieu LB avec ampicilline frais ont étéensemencés avec cette culture. L'incubation à 37° des cellules a été effectuée jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm atteigne 0.5, ensuite l'induction de l'expression protéique a été réalisée en ajoutant 1 mM d'IPTG. La culture a continué à 37°C pendant 4 heures supplémentaires. Enfin, les cellules ont été centrifugées à 7550 g pendant 10 min.

Le culot bactérien a été resuspendu dans 30 ml de tampon de lyse (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 180 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.3. GELS NATIFS

β -mercaptoéthanol, 0.1 UI DnaseI, 1 mg/ml lysozyme, une tablette d'anti-protéases (Roche)). Une étape de sonication a été réalisée pour lyser les cellules et l'échantillon a été clarifié par centrifugation (40000 g pendant 30 min à 4°C). Le lysat soluble a été ensuite injecté à travers une colonne de 5 ml contenant une résine Ni-NTA (MACHEREY-NAGEL) équilibrée dans le tampon de lyse.

Ensuite, 30 ml de tampon de lavage (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoéthanol) suivi de 50 ml de tampon d'élution (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 180 mM NaCl, 300 mM Imidazole, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM β -mercaptoéthanol) ont été injectés. L'élution a été dialysée pendant la nuit à 4°C contre 4 litres de tampon (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 180 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoéthanol) après avoir ajouté 12 ml de la protéase TEV. Ensuite la solution a été insérée dans la même résine Ni-NTA. La concentration de Ran a été déterminée, et un excès de 300 fois de GTP (resolubilisé dans 1 M Tris-HCl pH 8.0) en présence de 10 mM d'EDTA a été rajouté. L'incubation a duré 2h à 4°C. L'EDTA chélate les ions divalents, dont le chlorure de magnésium qui permet de stabiliser les nucléotides qui interagissent avec Ran. L'échange de nucléotide a été stoppé en ajoutant 15 mM de MgCl₂. Enfin, une étape de gel filtration (Superdex S75 16/60, GE Healthcare Life Science) a été réalisée. La colonne était équilibrée dans du tampon de stockage (10 mM HEPES pH 7.5, 75 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT). La solution protéique a été concentrée puis divisée en aliquotes qui ont été congelées rapidement à l'aide d'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80°C et utilisés en fonction des besoins. La fonctionnalité de RanGTP a été réalisée à l'aide d'une expérience de fluorescence de polarisation simple (cf. 4.8.5, page 154).

4.3 Gels natifs

Les gels natifs utilisés ont été des *Stain-Free FastCast Acrylamid kit 10%* (Biorad, Cat. 1610183). Les expériences ont été réalisées en chambre froide à 4°C et le tampon de migration était du TBE 0.5X (44.5 mM Tris-HCl, 44.5 mM d'acide borique, 1 mM Na₂EDTA pH 8.0). Dans la majorité des cas, 0.05 nmoles d'Imp β ont été mélangées avec un excès de Rev (0.250 nmoles). Les conditions ont été légèrement différentes

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.4. RÉTICULATION PROTÉIQUE AU GLUTARALDÉHYDE

dans le cas des expériences de réticulation au glutaraldéhyde (cf. 4.4, page 143). La migration a été effectuée à voltage constant (100V) pendant 2 h. Après migration les protéines ont été analysées soit par visualisation des tryptophanes en utilisant la technologie *Stain-Free*¹ intrinsèque des gels, soit après une étape de coloration au bleu de Coomassie qui donne une meilleure sensibilité. Dans ces conditions, les constructions de Rev testées ne permettaient pas la migration de la protéine seule dans le gel natif du fait de leurs points isoélectriques trop élevés.

4.4 Réticulation protéique au glutaraldéhyde

À partir d'une solution stock de glutaraldéhyde à 50% sous azote, deux dilutions successives dans l'eau pour avoir une solution de travail à 2.3% puis 0.1% ont été réalisées avant l'expérience. Les protéines ont été diluées dans du tampon de gel filtration (50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT). La concentration de protéine utilisée fut entre 0 et 20 μ M. Pour le ratio Imp β : Rev de 1 : 1, j'ai choisi de mettre les deux protéines à 5 μ M. Du glutaraldéhyde à une concentration finale de 0,004% a été ajouté et l'incubation se déroula à température ambiante pendant 5 min. Le glutaraldéhyde interagit avec des amines primaires, la réaction chimique a donc été arrêtée en ajoutant un excès de Tris-HCl contenant des fonctions chimiques amines libres (5 μ l pH 8.0 à 1M). Un gel natif TGX 10% (cf. 4.3, page 142), et des gels dénaturants (7% et 15% d'acrylamide) ont été effectués pour analyse. La migration des protéines dans les gels dénaturants s'est effectuée à 250 V et a duré 30 min dans le cas des gels 7% et 45 min dans le cas des gels 15%. Enfin, l'analyse des produits obtenus a été réalisée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, cf. 4.10, page 155).

1. un agent intercalant inconnu interagit avec les tryptophanes des protéines contenus dans les gels électrophorétiques. Ils sont détectés par excitation à une longueur d'onde également inconnue à l'aune des références bibliographiques fournie par Biorad sur cette technologie.

4.5 Quantification sur gel dénaturant

Afin de déterminer la stoechiométrie du complexe Imp β /Rev, Imp β a été placée en présence d'un excès de Rev^{V16D/I55N} (15 μ l d'Imp β à 574 μ M et 45 μ l de Rev à 1038 μ M). Le complexe Imp β /Rev a été purifié par gel filtration en utilisant une colonne S200 5/150 GL équilibrée avec 50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT.

Diverses quantités de Rev et Imp β connues (7.5 à 120 pmoles) ont été ajoutées dans le gel dénaturant (TGX 12% acrylamide). Diverses quantités du complexe obtenu en gel filtration ont été également déposées sur le gel électrophorétique. La concentration maximale étant celle de la fraction obtenue en gel filtration, les 3 autres conditions testées provenant d'une dilution de 2 en 2 de ce même échantillon. À l'aide du logiciel ImageLab, l'intensité des bandes en fonction de la concentration protéique a été mesurée. La corrélation entre la concentration des protéines seules en solution et l'intensité des bandes a permis de quantifier la stoechiométrie du complexe.

4.6 Détermination de la composition en acides aminés

La détermination de la composition en acide aminé a été réalisée par Jean-Pierre Andrieu à l'IBS. La technique permet à la fois de déterminer le coefficient d'extinction molaire d'Imp β et Rev, mais également d'analyser la stoechiométrie du complexe. Très brièvement, la quantité volumique d'échantillons initiaux a été mesurée par sa masse (considérant la densité du tampon ayant une valeur de 1). Ensuite, il est ajouté de la même façon un acide aminé non naturel (Norleucine) qui constitue l'étalon interne de l'expérience. Les liaisons peptidiques des protéines sont hydrolysées en conditions acides (6 M HCl, 24 h à 110°C). L'échantillon passe alors par une chromatographie échangeuse de cations. Quatre tampons d'élutions permettent l'élution successive des acides aminés. Les volumes d'élution sont comparés à ceux obtenus par un lot d'acide aminé qui sert de standard (Sigma). L'intégration de la surface

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.6. DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

des pics d'élution permet de déterminer les quantités relatives des différents acides aminés. Des quantités absolues obtenues, les acides aminés les moins fiables ont été retirés de l'analyse. En effet, parfois, le tampon rajoute des molécules pouvant avoir le même volume d'élution que certains acides aminés, ou des dipeptides peuvent rester en solution (liaison Ile-Leu, Ile-Val, ...). Dans tous les cas, les résultats sur les tryptophanes et les cystéines sont automatiquement retirés car ces acides aminés sont toujours dégradés du fait des conditions expérimentales drastiques.

Le coefficient d'extinction molaire a été déterminé en réalisant la corrélation entre absorbance et la concentration absolue, déterminée par l'expérience. Approximativement 0.5 nmol de Rev^{V16D/I55N} et 4 nmol d'Imp β ont été utilisées.

Pour déterminer la stœchiométrie du complexe, une gel filtration (S200 5/150 GL équilibré avec 50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT) d'Imp β en présence d'un excès six fois supérieur de Rev^{V16D/I55N} a été réalisée. La saturation d'Imp β par Rev a été observée par la présence d'un excès de Rev seule sur le chromatogramme et l'analyse sur gel dénaturant. La fréquence observée expérimentalement pour différents acides aminés a été comparée aux fréquences théoriques prédites par différents modèles (différentes stœchiométries) de complexe entre Rev et Imp β .

Finalement, une fonction de score fut utilisée pour valider le modèle avec la simple équation suivante :

$$Score = \sum_i^{AminoAcide} |Freq_{Obs_i} - Freq_{Model_i}| \quad (4.1)$$

Avec :

- *AminoAcide* : Représentant les différents acides aminés fiables
- *Freq_{Obs_i}* : La fréquence observée expérimentalement de l'acide aminé *i*
- *Freq_{Model_i}* : La fréquence théorique du modèle de l'acide aminé *i*

4.7 Fluorimétrie différentielle à balayage

Une expérience de fluorimétrie différentielle à balayage aussi appelé *Thermal Shift Assay* (TSA) ou *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF) consiste à utiliser une dénaturation thermique de protéines en présence d'une molécule fluorescente dont la fluorescence est faible dans l'eau et dont les propriétés de fluorescence augmentent dans un environnement hydrophobe. C'est par exemple le cas avec le SYPRO orange. La dénaturation des protéines augmente avec la température, rendant de ce fait le cœur hydrophobe plus accessible à la molécule fluorescente. Cette dernière interagit avec les résidus hydrophobes provoquant ainsi une augmentation de l'intensité de la fluorescence. Dans la plupart des cas, cela donne un profil de dénaturation thermique caractéristique et la température située à mi-chemin entre la fluorescence minimum et la fluorescence maximum correspond à la température de fusion (T_m) de la protéine. Pour les protéines globulaires à un seul domaine, la dénaturation est assez claire et les courbes ont un aspect typique (**Figure 4.4**). Le TSA est souvent utilisé en haut débit afin de déterminer les tampons idéaux pour la stabilité thermique des protéines à des buts de cristallogénèse ou pour des études d'interactions (Niesen et al., 2007; Ericsson et al., 2006; Zhang and Monsma, 2010; Boivin et al., 2013; Rogez-Florent et al., 2014).

Les expériences ont été effectuées dans des tubes PCR avec des couvercles plats (Bio-rad TBS0201 et TCS0803). Un thermocycleur associé à un lecteur de fluorescence a permis de collecter les données expérimentales (3 différents équipements en fonction des expériences). Chaque puits contenait 25 μ l de solution contenant 2 à 10 μ M de protéines. Pour les études d'interactions protéiques, soit les complexes Imp β /Rev étaient isolés par gel filtration, soit le partenaire ou les partenaires d'Imp β ont été ajoutés avec un excès molaire (de 3 à 5 fois en fonction des expériences). Les peptides de Rev utilisés proviennent du NIH^{2,3} excepté pour Rev-NLS qui fut commandé à un plus haut niveau de pureté (Smartox Biotechnology, Grenoble, France, pureté > 97%). Le composé fluorescent utilisé a été du SYPRO Orange (Sigma-Aldrich, 5000X) et sa concentration finale d'utilisation était de 5X afin d'obtenir un meilleur

2. <https://www.aidsreagent.org/reagentdetail.cf.m?t=proteinsid=62>

3. The following reagent was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH : HIV-1 Consensus B Rev Peptide Set.

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.7. FLUORIMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE À BALAYAGE

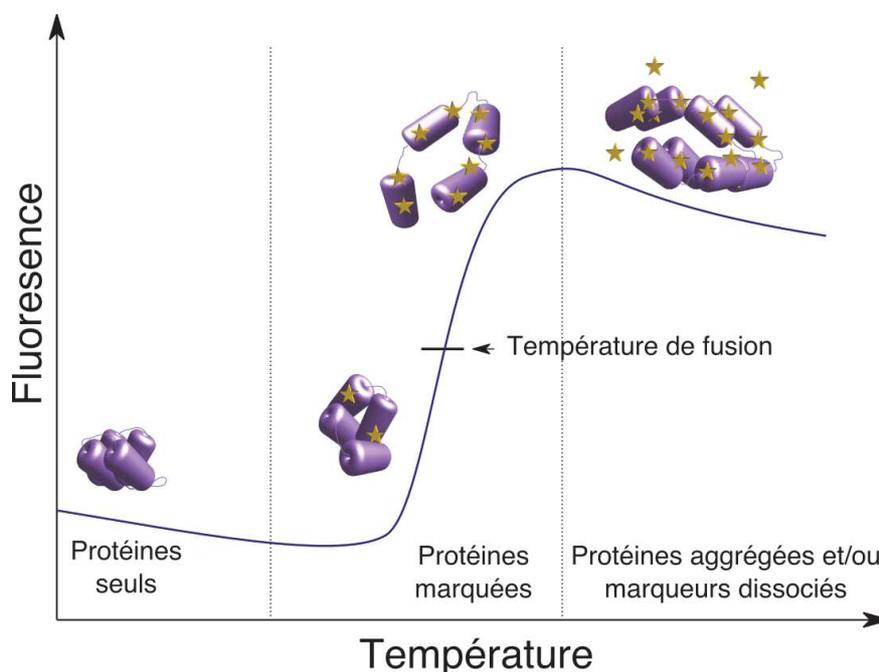


FIGURE 4.4 – **Courbe caractéristique de fluorimétrie différentielle à balayage.** En violet est représentée une protéine globulaire. Les étoiles orangées représentent le fluorophore (SYPRO-orange) utilisé dans les expériences de TSA.

signal (Boivin et al., 2013). Ce fluorophore est excité à 483 nm et l'intensité de la fluorescence détectée à 568 nm. Le tampon utilisé est 50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT. Le gradient de température va de 20°C à 99°C avec une incrémentation de 0.5°C. Enfin les courbes sont normalisées entre 0 et 1 de signal avec la formule suivante :

$$Fluorescence\ relative = \frac{Fluo_{obs} - Fluo_{min}}{Fluo_{max} - Fluo_{min}} \quad (4.2)$$

Où $Fluo_{obs}$ correspond à la fluorescence détecté expérimentalement pour une température donné, $Fluo_{max}$ à la fluorescence maximale et $Fluo_{mini}$ à la fluorescence minimale.

Les T_m sont définis comme la température où le signal de fluorescence normalisé vaut 0,5.

4.8 Polarisation de Fluorescence

4.8.1 Généralités sur la technique

L'anisotropie ou polarisation de fluorescence (FP) est une technique de détermination de la constante d'affinité entre deux molécules (K_D). Elle peut aussi être utilisée pour réaliser des expériences de compétition. La technique est basée sur la faculté d'une molécule marquée à l'aide d'un fluorophore de maintenir plus ou moins la polarisation d'un faisceau lumineux (**Figure 4.5**). En effet une petite molécule fluorescente qui est en rotation rapide en solution dépoliarise rapidement la lumière polarisée. Lorsque cette dernière s'associe à une plus grosse molécule, le complexe et ainsi le fluorophore sont moins mobile en solution et dépoliarise moins la lumière polarisée. C'est cette différence de propriété à maintenir ou non la polarisation de la lumière qui est détectée et qui permet d'analyser l'interaction entre les deux molécules.

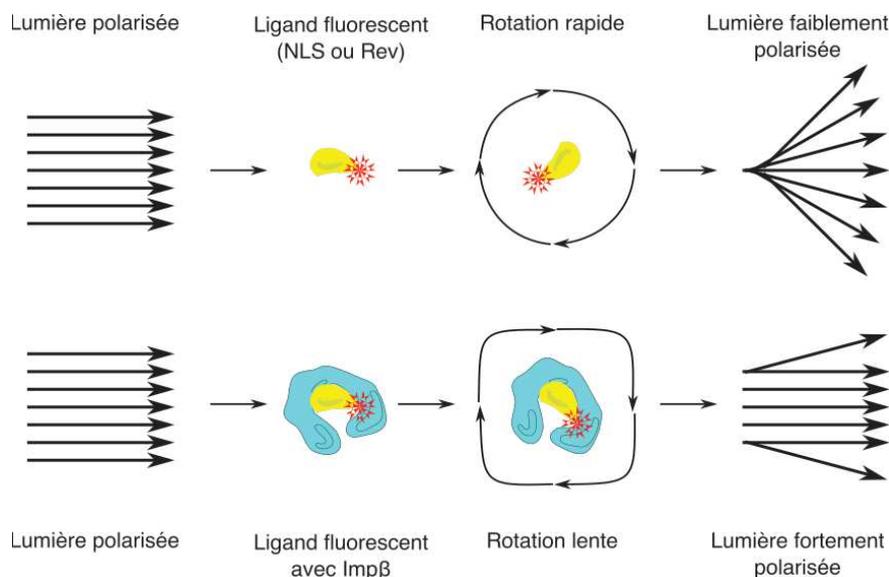


FIGURE 4.5 – **Principe de la polarisation de fluorescence.** Lorsque de la lumière polarisée est soumise à un échantillon contenant une petite molécule fluorescente (en jaune), du fait de la rotation rapide de cette molécule, la lumière se dépoliarise fortement. Lorsque cette molécule fluorescente est mise en présence d'un partenaire plus gros (en bleu), la lumière franchissant l'échantillon se dépoliarise moins.

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.8. POLARISATION DE FLUORESCENCE

L'expression de la polarisation de la fluorescence est déterminée par cette équation :

$$FP = \frac{(P_{\text{parallèle}} - P_{\text{perpendiculaire}})}{(P_{\text{parallèle}} + P_{\text{perpendiculaire}})}$$

Avec :

- FP représentant la valeur de polarisation de fluorescence
- $P_{\text{parallèle}}$ représentant l'intensité de fluorescence sur le plan parallèle
- $P_{\text{perpendiculaire}}$ l'intensité de fluorescence sur le plan perpendiculaire

4.8.2 Courbes d'associations entre Rev et Imp β

La polarisation de fluorescence a été utilisée pour déterminer si les différentes constructions d'Imp β ont la même capacité à lier Rev. Les ligands utilisés ont été soit le peptide de Rev contenant le motif ARM/NLS et correspondant au signal de localisation nucléaire (Rev-NLS, résidus 68-84), soit la protéine Rev^{V16D/I55N}.

Le peptide Rev-NLS a été couplé en N-terminal à un dérivé de rhodamine (TAMRA) lors de sa synthèse par une entreprise commerciale. Ce peptide a été solubilisé entre 1 et 5 mM avec de l'eau et la concentration a été déterminée en réalisant diverses dilutions et en se basant sur l'absorbance et le coefficient d'absorption molaire de TAMRA à 543 nm. Rev^{V16D/I55N} a été obtenu par le protocole standard de purification (cf. 4.2.4, page 139) et ensuite a été marqué à la fluorescéine. Cette étape a été réalisée en incubant Rev^{V16D/I55N} avec une molécule de fluorescéine couplée à un groupe réactif et activé N-hydroxysuccinimide lié une liaison ester en suivant le protocole du fournisseur (Thermo Scientific). La protéine marquée et l'excès de fluorescéine libre ont ensuite été séparés par une gel filtration.

Pour les essais de polarisation de fluorescence, le peptide Rev-NLS fluorescent a été utilisé à une concentration finale de 10 nM tandis que Rev^{V16D/I55N} marqué à la fluorescéine a été utilisé à une concentration de 500 nM. Rev a été marqué à l'aide d'un réactif NHS-Fluorescéine⁴. Ainsi les molécules de fluorescéines se sont fixées de

4. NHS-Fluorescein (Thermo Scientific Pierce)

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.8. POLARISATION DE FLUORESCENCE

façon covalente, mais potentiellement que de façon partielle sur les amines primaires disponibles de Rev, c'est-à-dire que l'ensemble des molécules de Rev ne sont pas forcément marquées par la fluorescéine. De plus, Rev ne contient pas beaucoup de lysines primaires disponibles pour un couplage puisqu'il n'existe que deux lysines au sein de la protéine. Cela pourrait expliquer à la fois qu'il doit être mis 500 nM de Rev fluorescents au lieu de 10 nM de sonde fluorescente pour toutes les expériences de polarisation de fluorescence que j'ai pu réaliser. Et cela pourrait expliquer également le fait que la différence de polarisation de fluorescence soit si faible lorsque Rev est marqué entre sa forme libre en solution ou liée à Imp β . En effet, si par exemple la partie N- ou C-terminale (où est justement localisé une lysine) de Rev n'est pas engagé dans l'interaction avec Imp β , cette ou ces parties potentiellement marquées par la fluorescéine pourrait alors agir comme si elles étaient libres en solution et donc ne pas provoquer une forte augmentation de la fluorescence.

Les constructions d'Imp β ont été préparées à une concentration maximale de 5 μ M et des dilutions en séries ont été effectuées dans le tampon de FP (10 nM/500 nM de peptide/protéine fluorescentes, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.05% de tween-20 à partir d'une solution 5X). Chaque condition fut réalisée dans un volume réactionnel de 30 μ l dont 25 μ l ont été déposés dans un puits de plaque (Greiner bio-one, 784076). L'anisotropie a été détectée avec les filtres appropriés utilisant un CLARIOstar (BMG Labtech).

Les courbes ont été modélisées par un modèle avec un ratio équimolaire de Rev et Imp β . Pour ce faire l'équation suivante a été utilisée :

$$FP_{exp} = FP_{min} + (FP_{max} - FP_{min}) \times \frac{[Rev_{total}] + K_D + [ImpB_{tot}] - \sqrt{(-[Rev_{total}] - K_D - [ImpB])^2 - 4 \times [Rev_{total}] \times [ImpB_{tot}]}}{2 \times [Rev_{total}]} \quad (4.3)$$

Les correspondances entre les différentes variables et significations sont les suivantes :

- FP_{exp} : Polarisation de fluorescence expérimentale
- FP_{min} : Polarisation de fluorescence minimale
- FP_{max} : Polarisation de fluorescence maximale
- $[Rev_{tot}]$: Concentration de Rev

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.8. POLARISATION DE FLUORESCENCE

- K_D : Constante de dissociation (4.4)
- $[ImpB_{tot}]$: Concentration d'Imp β

Cette dernière équation (4.3) est une simplification de l'équation décrivant l'équilibre de la constante de dissociation (4.4). L'avantage est qu'elle permet de modéliser l'interaction entre Rev et Imp β en n'ayant comme simple inconnu que la constante d'affinité K_D , tous les autres paramètres étant des paramètres expérimentaux.

$$\frac{[Rev_{libre}][ImpB_{libre}]}{[Complexe]} = K_D \quad (4.4)$$

Avec :

- $[Rev_{libre}]$: Concentration de Rev non lié à Imp β (quantité inconnue)
- $[ImpB_{libre}]$: Concentration d'Imp β non liée à Rev (quantité inconnue)
- $[Complexe]$: Concentration du complexe

Pour arriver à l'équation (4.3), voici les simplifications réalisés :

Sachant que la concentration en $[ImpB_{libre}] = [ImpB_{tot} - Complexe]$, l'équation peut s'écrire :

$$\frac{[Rev_{libre}][ImpB_{tot} - Complexe]}{[Complexe]} = K_D$$

Cette équation peut être réarrangée de la façon suivante :

$$\frac{[Complexe]}{[ImpB_{tot}]} = \frac{[Rev_{libre}]}{K_D + [Rev_{libre}]}$$

Avec $[Rev_{libre}] = [Rev_{tot}] - [Complexe]$ on obtient :

$$[Complexe] = \frac{[ImpB_{tot}] \times ([Rev_{tot}] - [Complexe])}{K_D + ([Rev_{tot}] - [Complexe])}$$

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.8. POLARISATION DE FLUORESCENCE

Résoudre cette équation quadratique ne donne qu'une solution dans les nombres réels :

$$[Complexe] = \frac{[Rev_{tot}] + K_D + [ImpB_{tot}]}{2} - \frac{\sqrt{(-[Rev_{tot}] - K_D - [ImpB])^2 - 4 \times [Rev_{tot}] \times [ImpB_{tot}]}}{2} \quad (4.5)$$

Nous pouvons aussi exprimer la concentration du complexe ou celle de Rev sous forme de complexe en terme de polarisation de fluorescence :

$$[Rev_{complex}] = [Rev_{tot}] \times \frac{FP_{exp} - FP_{min}}{FP_{max} - FP_{min}} = [Complexe] \quad (4.6)$$

En remplaçant dans l'équation (4.5) le terme de $[Complexe]$ par celui de la polarisation de fluorescence obtenu dans l'équation (2.6), on obtient l'équation (4.3).

C'est par cette équation (4.3) que nous pouvons déterminer les constantes d'affinités (K_D) en utilisant uniquement les concentrations des interactants et les valeurs expérimentales de polarisation de fluorescence. À l'aide d'un logiciel ayant un algorithme de régression non linéaire et en rentrant une approximation du K_D , de FP_{min} et FP_{max} nous avons pu ainsi traiter les données et obtenir la valeur des constantes d'affinités.

Enfin les données furent normalisées entre 0 et 1 avec la formule suivante et représentent la fraction liée de Rev sur $Imp\beta$:

$$Fraction\ liée = \frac{FP_{exp} - FP_{min}}{FP_{max} - FP_{min}}$$

4.8.3 Compétition avec Rev-NLS ou Rev^{V16D/I55N}

Une première expérience consista à étudier la polarisation de fluorescence en point final en utilisant Rev-NLS fluorescent (100 nM) et en ajoutant $Imp\beta$ (25 nM). Pour les autres expériences, ces conditions furent conservées et il fallut rajouter un excès de Rev-NLS ou Rev^{V16D/I55N} non marqué (200 nM). Enfin des contrôles sans $Imp\beta$

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.8. POLARISATION DE FLUORESCENCE

furent aussi testés, c'est à dire Rev-NLS ou Rev^{V16D/I55N} non marqué en présence de Rev-NLS fluorescent aux mêmes concentrations. Les données ont été ensuite normalisées. 0 correspondant à la moyenne de la polarisation de fluorescence obtenue avec Rev-NLS fluorescent seul et 1 correspondant à la polarisation de fluorescence obtenu sans compétiteur, c'est à dire avec Rev-NLS fluorescent en présence d'Imp β .

La deuxième expérience fut de mettre Rev^{V16D/I55N} couplé à la fluorescéine (500 nM) en présence d'une concentration constante d'Imp β (3 μ M). Ensuite une dilution en cascade de 2 en 2 de Rev-NLS non marqué a été réalisé en commençant par une concentration à 300 μ M.

4.8.4 Compétition avec Imp α

Rev-NLS-TAMRA a été mise en présence d'Imp β à des concentrations respectives de 10 nM et 1 μ M. Imp α a été placé à une concentration maximale de 5 μ M et une dilution en cascade de 2 en 2 a été réalisée. L'expérience a été effectuée en duplicata excepté pour les points où la concentration d'Imp α étaient à une concentration de 97.65 à 6.10 nM (l'écart type pour ces points a été estimé par la moyenne des écart types des points mesurés en duplicata). Le tampon de dilution était identique aux autres expériences de polarisation de fluorescence (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.05% de tween-20 à partir d'une solution 5X). Enfin les données furent modélisés en utilisées à l'aide de l'équation suivante dans un logiciel utilisant un algorithme de régression non linéaire et en rentrant une approximation des paramètres de FP_{min}, FP_{max} et IC₅₀ :

$$FP = FP_{min} + \frac{FP_{max} - FP_{min}}{1 + \frac{[ImpA]}{IC_{50}}} \quad (4.7)$$

Avec :

- FP : Polarisation de fluorescence
- FP_{max} : Polarisation de fluorescence lorsque le complexe est saturé
- FP_{min} : Polarisation de fluorescence sans compétiteur
- $[ImpA]$: Concentration d'Imp α

— IC_{50} : Concentration inhibitrice de 50%

4.8.5 Expériences réalisés avec RanGTP

Les expériences de polarisation utilisant RanGTP sur le complexe constitué d'Imp β ont été réalisées dans les mêmes conditions que celle avec Imp α comme compétiteur (cf. 4.8.4, page 153). Il a été employé également une dilution en série de 2 en 2, mais la concentration finale maximale de RanGTP testée était de 100 μ M.

Pour vérifier la fonctionnalité de RanGTP produit de façon recombinante, une expérience de polarisation de fluorescence a été réalisée entre un peptide NES-PKI fluorescent et Crm1, une protéine réalisant l'export nucléaire de diverses espèces biochimique dont les ARN du VIH-1. Le peptide NES-PKI fixe Crm1 avec une affinité de l'ordre de 87 μ M, et en présence de RanGTP, l'affinité de Crm1 pour le NES-PKI est augmentée de 580 fois (Données non publiées issue de notre laboratoire). Une expérience de polarisation de fluorescence similaire à été publié, cette équipe de recherche a trouvé une constante d'affinité de Crm1 pour le NES-PKI de \simeq 10 μ M en absence de RanGTP et de \simeq 7 nM en présence de la petite GTPase (Güttler et al., 2010). J'ai également réalisé une expérience de polarisation de fluorescence. Un contrôle positif a été ajouté en utilisant les protéines fonctionnelles RanGTP et Crm1 provenant de Cyril Dian et Florent Bernaudat, deux postdoctorants de mon équipe de recherche. Le tampon utilisé fut le même que celui disponible dans la littérature (Dian et al., 2013). J'ai décidé que la concentration finale de Crm1 soit de 2 μ M, et il a été ajouté 20 μ M de RanGTP ou du tampon.

4.9 SEC/MALLS à l'aide de la plateforme PAOL

Les échantillons ont été préparés aux concentrations suivantes :

- Imp β (80 μ M)
- Imp β + Rev^{V16D/I55N} en excès (40 μ M + 80 μ M)
- Imp β en excès + Rev^{V16D/I55N} (80 μ M + 40 μ M)

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.10. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La plateforme PAOL (*Protein Analysis On-Line*) de l'IBS a ensuite réalisé les expériences. Les échantillons ont été centrifugés 10 min à 125 000g juste avant l'expérience. Le tampon d'élution (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.02% NaN₃) a été filtré à 0.1 µm. Les expériences de SEC-MALLS ont été effectuées sur une chaîne HPLC (Schimadzu, Kyoto, Japan), composée d'un dégazeur DGU-20AD, d'une pompe LC-20AD, d'un passeur d'échantillon SIL20A, d'un four à colonne XL-Therm (WynSep, Sainte Foy d'Aigrefeuille, France), d'une interface de communication CBM-20A, d'un détecteur UV-Visible SPD-M20A, d'un détecteur de diffusion statique de la lumière MiniDAWN Treos (Wyatt, Santa-Barbara, USA), d'un détecteur de diffusion dynamique de la lumière DynaPro Nanostar, d'un détecteur d'indice de réfraction Optilab rEX. Les échantillons ont été stockés à 4°C, et un volume de 80 µl a été injecté sur une colonne Superdex 200 10/300 GL, équilibrée à 4°C avec le tampon d'élution à un débit de 0.5 ml/min.

4.10 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique basée sur la mesure du poids d'atomes ou de molécules se déplaçant dans un environnement proche du vide sous forme de particules chargées (ions) le tout soumis à un champ électromagnétique. L'analyseur utilisé étant "à temps de vol" (*Time Of Flight (TOF)*) dans lequel les molécules chargées (ions positifs ou négatifs) sont séparées en fonction de leurs masses et de leurs charges. La mesure très précise du temps mis par les ions pour traverser l'analyseur peut être corrélée avec leurs masses. Ce type d'analyseur est utilisé avec tous les types d'ionisations (ex. ESI, MALDI, ...) et permet d'étudier des masses très élevées comme c'est le cas pour les macromolécules biologiques.

Les échantillons testés en spectrométrie de masse provenaient de Marjolaine Noirclerc-Savoie et moi-même. Pour calculer la différence entre la masse observée et la masse théorique, ces deux équations peuvent être utilisées :

$$ppm = \frac{Masse_{exp} - Masse_{theo}}{Masse_{theo}} \times 10^6 \quad (4.8)$$

$$\Delta Masse = |Masse_{exp} - Masse_{theo}| \quad (4.9)$$

Avec :

- $Masse_{exp}$ la masse atomique observée expérimentalement (Da)
- $Masse_{theo}$ la masse atomique théorique de l'échantillon (Da)

4.10.1 Spéctrométrie de masse LC/ESI-MS

L'électronébulisation (*Electrospray Ionization (ESI)*) est une technique d'ionisation à pression atmosphérique qui est particulièrement bien adaptée à l'analyse des macromolécules comme les protéines. Le couplage avec la chromatographie en phase liquide (LC-ESI) est devenu une technique de routine. L'ESI est une technique d'ionisation douce et très peu de fragmentation des analytes est observée. En ESI la solution à analyser est vaporisée en un fin aérosol de gouttelettes chargées à l'aide de l'application d'un important champ électrique (3-6 kV). Par évaporation du solvant, les composés vont se désolvater et former des ions positifs ou négatifs. À l'aide du champ électrique, seuls les ions vont pénétrer par un orifice dans le spectromètre de masse qui est placé à un haut niveau de vide. On obtient ainsi des ions moléculaires sans fragmentation $(M + H)^+$ ou $(M + H)^-$. Dans le cas des protéines, on peut aussi obtenir des ions multi chargées. En effet, les protéines peuvent avoir plusieurs sites de protonation en solution ce qui résulte en un spectre de masse en condition dénaturante contenant des ions multi-chargés allant de 600 à 3000 m/z.

Les expériences ESI-TOF ont été conduites par Luca Signor, ingénieur de notre groupe de recherche. 20 pmoles de protéine (4 μ l à 5 μ M) ont été injectées dans un spectromètre de masse 6210 TOF couplé à un système de chromatographie liquide à haute performance (*High-performance liquid chromatography (HPLC)*, 1100 series, Agilent Technologies). Deux tampons ont été utilisés pour la phase mobile de l'HPLC (A : 0.03% et 5% ACN ; B : 0.03% TFA). Le tampon de dilution contenait 0,03% TFA et 5% ACN. Les solutions protéiques ont été dessalées en ligne sur une microcolonne en phase inverse C8 (Zorbax 300SB-C8, 5 μ m, 5x0.3 mm, Agilent Technologies) pendant 3 min à 100 μ l.min⁻¹ avec 100% de tampon A. Ensuite, l'élution a été réalisée

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.10. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

en utilisant 70% de tampon B à 50 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Seuls les ions chargés positivement dans la gamme des 300-3000 m/z ont été détectés, et l'analyse des données a été réalisé grâce au logiciel MassHunter (v. B.02.00, Agilent Technologies). Le spectromètre de masse a été calibré à l'aide du mix tuning (ESI-L, Agilent Technologies) et les paramètres utilisés ont été :

- température de la phase gazeuse (azote) : 300°C
- débit de gaz sec (azote) : 7 litres/min
- gaz de nébulisation (azote) : 10 Ψg
- potentiel électrique du cone : 4 kV
- potentiel électrique du fragmenteur : 250 V
- potentiel électrique de l'écumoire : 60 V
- potentiel électrique du V_{pp} (octopole RF) : 250 V

4.10.2 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'ionisation par désorption laser assistée par une matrice (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)*) est une technique d'ionisation douce qui est très utilisée pour analyser les peptides, les protéines et les polymères. Avec cette technologie, on mélange l'analyte d'intérêt avec un large excès d'une matrice organique (généralement une petite molécule qui absorbe dans les UV (comme l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque). Après évaporation du solvant, on obtient un mélange plus ou moins homogène de cristaux composés d'analyte et de matrice. À l'aide d'un laser UV on irradie l'échantillon de manière pulsé pendant une très courte durée. L'accumulation d'énergie dans les cristaux de matière créer une sublimation de la matrice dans la phase gazeuse entraînant la ou les molécules à analyser (désorption). Dans le spectre de masse, on observe généralement des ions moléculaires mono-chargés ($M + H$)⁺ même avec les entités chimiques ayant des poids moléculaires élevés (500 kDa). Il existe plusieurs hypothèses pour décrire le mécanisme d'ionisation, mais on admet que le transfert d'un proton de la matrice vers l'analyte est un des mécanismes prédominants.

Ces expériences ont été également conduites en collaboration avec Luca Signor. 5

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.10. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

pmoles de protéines ont été déposées sur la plaque MALDI. Pour pouvoir détecter Importin β , le tampon a du être changé. Un Vivaspinn, dispositif de filtration et de concentration ayant un seuil de coupure de 30 kDa a été utilisé afin d'échanger le tampon de l'échantillon par 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM NaCl.

Les spectres MALDI ont été enregistrés sur un spectromètre de masse MALDI-TOF AutoFlex (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) préalablement calibré avec un kit standardisé pour les détections entre 4000 et 20000 m/z (Bruker Daltonics) ou avec de la BSA pour détecter les pics entre 20000 et 140000 m/z . Les échantillons protéiques ont été appliqués sur la cible matricielle à l'aide de la méthode de la gouttelette séchée. Il a été appliqué 5 pmoles de protéine et la matrice utilisée dans les expériences a été de l'acide sinapique (10 mg/ml dans 50% d'acétonitrile). Après acquisition des spectres de masse, les données ont été analysées à l'aide des logiciels Flexcontrol et Flexanalysis (v. 3.0., Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

4.10.3 Spectrométrie de masse en conditions natives

Les échantillons ont été passés dans sur une colonne de gel filtration. (Superdex S75 ou S200 5/150 GL Increase, GE Healthcare Life Science équilibré dans 150 à 400 mM d'ammonium acétate pH 7.0). Les expériences sur le spectromètre de masse et l'analyse des résultats ont été réalisées en étroite collaboration avec Elisabetta Boeri-Erba et Marjolaine Noirclerc-Savoie, chercheuses de notre groupe. Très brièvement les échantillons ont été préparés comme décrit dans la littérature scientifique (Boeri Erba and Petosa, 2015 ; Sharon and Horovitz, 2015 ; Sinz et al., 2015 ; Chen et al., 2015 ; Rajabi et al., 2015).

Les protéines ionisées ont été générées en utilisant un électrospray ayant un faible débit ("*nanoflow*"). Les capillaires utilisés sont composés de borosilicate recouvert de platine. Ils proviennent de la compagnie commerciale Thermo Electron SAS (Courtaboeuf, France). Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées sur spectromètre possédant un générateur de temps de vol quadripole (Q-TOF Ultima, Waters corporation, Manchester, Royaume-Uni). L'instrument a été modifié et adapté pour pouvoir détecter les molécules ayant un haut poids moléculaire comme décrit dans la littérature (Sobott et al., 2002 ; van den Heuvel et al., 2006). Les

paramètres suivant ont été utilisés :

- tension du capillaire : 1.2-1.3 V
- potentiel électrique du cône : 40 V
- potentiel électrique de la radiofréquence de la lentille 1 : 40 V
- potentiel électrique de la radiofréquence de la lentille 2 : 1 V
- énergie de collision : 30-140 V
- tension de la plaque multi-canaux : 1900 V

Tous les spectres de masse obtenus ont été calibrés en utilisant une solution d'iodure de césium (CsI, 6 mg/ml dans 50% isopropanol). À cette concentration l'iodure de césium peut réaliser différents états de polymérisation et permet d'atteindre des masses sur charges pouvant aller jusqu'à 8000 m/z. Les spectres de masse ont ensuite été analysés à l'aide des logiciels Masslynx 4.0 (Waters Corporation, Manchester, Royaume-Uni) et Massign (Morgner and Robinson, 2012).

4.11 Titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry (*ITC*)) est une technique d'analyse de l'interaction entre deux ou plusieurs molécules. C'est une technique de choix pour l'accès aux paramètres thermodynamiques (enthalpie, enthalpie libre et entropie), mais aussi par déduction à la constante d'affinité de l'interaction (voir équation 4.10).

$$\Delta G = RT \ln K_D = \Delta H - T \Delta S \quad (4.10)$$

Avec G représentant l'enthalpie libre, H l'enthalpie, S l'entropie, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue et K_D la constante de dissociation du complexe.

Le fait que cette technique donne accès aux paramètres thermodynamiques permet aussi de déterminer le type d'interaction mises en jeu entre les molécules. Ainsi l'ana-

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.12. RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

lyse de la variation de l'enthalpie donne des indications sur la possibilité que des liaisons hydrogènes ou des ponts salins interviennent dans l'interaction. De même, l'observation de l'entropie du système permet d'étudier des changements conformationnels importants ou une interaction plutôt hydrophobe.

Cette technique permet aussi de déterminer le nombre de sites de liaison et la stœchiométrie de l'interaction. De plus, l'ITC permet d'étudier les molécules libres en solution (sans immobilisation ou marquage). L'ITC peut être utilisée, quelles que soient les propriétés optiques de l'échantillon.

Le principe consiste à mesurer la différence de chaleur entre une chambre de référence qui contient de l'eau et une chambre de mesure. La capacité calorifique du tampon des protéines est considérée identique à celle de l'eau. Une des deux molécules à analyser est placée dans la chambre de mesure l'autre molécule est injectée progressivement dans ce même compartiment. L'instrument mesure la différence de chaleur (endothermique ou exothermique) pour permettre au système de revenir à l'équilibre entre les deux chambres.

Lors des expériences effectuées en collaboration avec Andrès Palencia de l'EMBL Grenoble Outstation, les échantillons de Rev et Imp β sont issus de gel filtrations équilibrées dans exactement le même tampon (50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl) et la même colonne de gel filtration a été utilisée (Superdex S200 10/300, GE Healthcare Life Science). Le calorimètre utilisé était un iTC200 Microcalorimeter, MinCal. Rev^{V16D/I55N} a été placé dans la chambre de mesure à une concentration de 50 μ M (350 μ l). Importin β a été dans la seringue à une concentration de 150 μ M (préparé 55 μ l) et 1.5 μ l a été injecté toutes les 180 secondes. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel fourni par le fournisseur du calorimètre.

4.12 Résonance Magnétique Nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) réside dans l'utilisation des propriétés magnétiques des noyaux des atomes placés dans un champ magnétique très intense. En solution l'aimantation des noyaux des atomes est aléatoire, on utilise alors des

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.12. RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

bobines supraconductrices plongés dans de l'hélium liquide à 4K pour y appliquer un champ magnétique. En présence de ce champ magnétique très intense, l'aimantation des noyaux des atomes s'aligne avec le champ externe. Une majorité des spins s'orientent de manière parallèle mais il reste des spins orientés en antiparallèle et il en résulte une aimantation macroscopique nette de l'échantillon.

L'échantillon est placé dans un champ magnétique statique, et au moyen d'un second champ magnétique perpendiculaire de courte durée on peut basculer l'aimantation des spins des noyaux des atomes. Le retour à l'équilibre (précession) est mesuré via le courant électrique qu'il induit dans une bobine placée dans le plan perpendiculaire. Au moyen d'un détecteur on peut suivre le signal électromagnétique émis par les spins en rotations.

Le signal reçu est traité par une transformation de Fourier, ce qui permet d'obtenir les fréquences de résonance des différents noyaux. Celles-ci dépendent du champ magnétique, c'est ce que l'on appelle le déplacement chimique (exprimé en ppm). Ce dernier est très sensible à l'environnement, ce qui permet d'avoir un spectre caractéristique de l'échantillon. Dans le cas des macromolécules biologiques, le spectre RMN est de base très complexe. Et pour diminuer les ambiguïtés résultantes des superpositions spectrales issues des atomes d'hydrogène, on utilise la fréquence d'un ou plusieurs noyau(x) supplémentaire(s) en introduisant des isotopes lourds visible en RMN (^{15}N et/ou ^{13}C).

Une des limites de la méthode est qu'elle ne permet d'étudier que des molécules de relativement petite taille (100 acides aminés sans marquage, 150 acides aminés avec ^{15}N , 200 acides aminés avec $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ et 300 acides aminés avec $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$).

Dans notre cas, Imp β (98 kDa) est trop grosse pour pouvoir étudier le complexe par RMN. Il a donc été choisi de marquer Rev $^{V16D/I55N}$. Cela a nécessité d'apporter des modifications dans le protocole de purification standard de Rev (cf. 4.2.4, page 139). Une pré-culture de bactéries exprimants Rev a étéensemencée en milieu LB avec de la kanamycine sur la journée à 37°C. Ensuite les cellules ont été centrifugées à 7750g pendant 10 min et ont été remises en suspension dans 1 ml de milieu M9 (Tableau 4.1). Ce milieu est composé de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ avec ou sans ^{13}C -glucose. Une préculture de ce milieu minimum a ensuite étéensemencée sur la nuit à 37°C.

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.12. RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

TABLEAU 4.1 – **Composition du milieu minimum M9 complétementé.** La composition suivante permet la réalisation d'un litre de milieu minimum M9 complétementé en vitamines et minéraux. Les différents composants à ajouter (masse, volumes et concentration des solutions stocks) sont présentés. Pour marquer les protéines produites avec de l'azote (^{15}N), du chlorure d'ammonium a été utilisé. Le carbone lourd (^{13}C) fut apporté par le glucose. La solution est stérilisée par filtration à $0,2\ \mu\text{m}$.

Quantités		Composés
masse (en g)	10	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	3	KH_2PO_4
	0,5	NaCl
	1	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
	2	$(^{13}\text{C-})\text{Glucose}$
Volume(en ml)	1/1	MgSO_4
	1/0,1	CaCl_2
/ Concentration	0,1/0,1	MnCl_2
Initiale (M)	1/0,05	ZnSO_4
	10/-	100X MEM (mix de vitamines)

La culture de la protéine $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ et le début de la purification ont été identiques au protocole standard. L'étape de gel filtration utilisait le tampon d'analyse par RMN (25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 150 mM KCl , 1 mM DTT , 1 mM EDTA , 5 mM β -mercaptoéthanol, 0,02% NaN_3). $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ marqué a ensuite été mis dans le tampon de gel filtration avec 10% d'eau deutérée (D_2O). 150 μl avec une concentration de Rev finale de 90 μM ont été préparés. Dans le cas du complexe avec $\text{Imp}\beta$, la protéine humaine a été ajoutée à un ratio équimolaire.

L'acquisition des spectres RMN a été effectuée par Robert Schneider, Guillaume Bouvignies et Malene Ringkjøbing Jensen de l'IBS. Les spectres ont été enregistrés à 10°C sur un spectromètre Bruker 600 MHz équipé d'une cryo-sonde. Très brièvement, il a été utilisé une séquence BEST-TROSY qui a permis l'attribution des spectres comme c'est reporté dans la bibliographie (Lescop et al., 2007 ; Marion, 2010 ; Solyom et al., 2013).

L'attribution des spectres RMN de $\text{Rev}^{V16D/I55N}$ seul ou en présence d' $\text{Imp}\beta$ a été

effectuée par Elise Delaforge avec le support et l'expertise de son groupe de recherche. Elle a aussi réalisé l'analyse des structures secondaires en utilisant le logiciel *SSP* (*Secondary Structure Prediction*). Cette méthode probabiliste se sert des différences entre les déplacements chimiques de différents atomes ($^{13}C^\alpha$, $^{13}C^\beta$, $^{13}C'$, $^1H^N$ et ^{15}N) lorsque ces derniers sont engagés ou non dans des structures secondaires (Wang and Jardetzky, 2002).

4.13 Microscopie électronique

Les échantillons de Rev, Imp β ou du complexe provenant de gel filtration ont été analysés par microscopie électronique en coloration négative. Les protéines utilisées furent ceux de gel filtrations ramenées à une concentration finale de 0.05 mg/ml. Les expériences ont été conduites par Francesca Coscia, une étudiante en thèse dans notre équipe. Très brièvement, les molécules d'intérêts furent fixé sur des grilles de microscopie électronique (entre du carbone et du mica), puis le tampon original a été remplacé par un tampon contenant des atomes lourd vis-à-vis de la quantité d'électrons (Acétate d'uranyle 2% masse/volume pH 4.5). Ces derniers sont des agents de contraste. Le micrographe obtenu est dit en coloration négative car le fond de l'image où il ne réside que le tampon est fortement coloré par le faisceau d'électrons et donne une couleur foncée, tandis que l'analyte apparait plus clair. Cette méthode permet de décrire une empreinte de la molécule ou du complexe étudié dans le tampon riche en atomes lourds.

Cette technique permet de visualiser des molécules relativement petites (≤ 100 kDa) de façon rapide et à faible concentration (≈ 0.05 mg/ml). Les analyses de microscopie électronique ont été réalisées à température ambiante à de relativement bas voltages (60 à 120 kV). Les micrographies de coloration négatives furent obtenus avec un microscope Philips CM12. Le taux de grossissement était de 22000X ou 45000X, avec une défocalisation entre -3 et -1.5 μm . Dans ce travail de thèse, la microscopie électronique en coloration négative fut utilisé pour apprécier l'état d'agrégation de Rev116 *WT*.

4.14 Cristallogénèse

Les tentatives de cristallogenèse ont été effectuées à l'aide de techniques utilisant des gouttes assises ou suspendues ("*sitting*" et "*hanging*" drops) de divers complexes entre Imp β et Rev. Les complexes ont été concentrés entre 2 et 20 mg/ml et 90 μ l ont été envoyés au laboratoire HTXlab de l'EMBL Grenoble. Ce laboratoire est spécialisé dans le criblage haut débit de conditions de cristallogenèse. J'ai fait le choix d'utiliser les 6 plaques 96 puits permettant de tester le plus de conditions différentes. Les plaques de criblages ont été les suivantes :

- PEGs I (Qiagen)
- JCSC (Qiagen)
- PACT (Qiagen)
- Wizard I et II (Rigaku)
- Salt grid (Hampton)
- Index Screening (Hampton)

Pour les gouttes réalisées manuellement de façon "suspendue", il a été mélangé 1 μ l de solution protéique avec 1 μ l de solution de cristallogenèse testée. Les diverses conditions testées furent déposées sur une lame et scellées à l'aide de graisse. Les plaques utilisées étaient des plaques de 24 puits (Hampton). Le réservoir était constitué de 1 ml de solution testé. Les tentatives de cristallogenèse ont toutes été réalisées à 4°C.

4.15 Amarrage moléculaire (Docking)

N'ayant pas obtenu de structure à résolution atomique du complexe Imp β /Rev, nous avons réalisé une étude d'amarrage moléculaire de Rev sur Imp β en utilisant les coordonnées atomiques d'Imp β obtenues par Cingolani et al., 1999 en complexe avec IBB (PDB ID 1QGK) et celles de l'épingle hélicale (résidus 9-65) de Rev extraites par DiMattia et al., 2010 en complexe avec un fragment F_{ab} monoclonal (PDB ID 2X7L, chaîne M). L'amarrage moléculaire a été réalisé avec le programme HADDOCK, en

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.15. AMARRAGE MOLÉCULAIRE (DOCKING)

utilisant les valeurs de paramètres par défaut (de Vries et al., 2010)⁵.

Le protocole d'amarrage utilisé par HADDOCK se décompose en trois étapes (Dominguez et al., 2003) : (i) une étape d'orientation aléatoire et de minimisation de l'énergie de corps rigide, (ii) un recuit simulé (*simulated annealing*) semi-rigide dans l'espace d'angle de torsion, et (iii) un raffinement final dans l'espace cartésien avec un solvant explicitement défini. Dans la première étape, les deux molécules sont positionnées à 150 Å l'une de l'autre et chacune est soumise à une rotation aléatoire autour de son centre de gravité. Une minimisation de l'énergie de corps rigide est ensuite effectuée : d'abord, quatre cycles d'optimisation des orientations sont effectués où chaque protéine peut tourner sur elle-même afin de minimiser la fonction d'énergie intermoléculaire ; ensuite, des cycles d'optimisation sont réalisés où des rotations et des translations sont autorisées. Par défaut, 1000 configurations du complexe sont calculées à ce stade. Les 200 meilleures solutions en terme d'énergie intermoléculaire sont ensuite retenues pour l'étape suivante qui se compose de trois raffinements de recuit simulé. Au cours du premier raffinement, les deux protéines sont considérées comme des corps rigides et leurs orientations sont optimisées. Au cours du second, les chaînes latérales à l'interface peuvent changer de conformation. Au cours du troisième, les chaînes latérales et principales des résidus à l'interface sont libres de bouger afin de permettre quelques réarrangements conformationnels. La troisième étape du protocole d'amarrage consiste à un raffinement "doux" dans une couche de molécules d'eau de 8 Å : le système est chauffé à 300 K, puis refroidi progressivement jusqu'à 100 K, en effectuant des étapes de dynamique moléculaire avec des restrictions positionnelles sur tous les atomes, sauf sur les chaînes latérales à l'interface.

Un des terme énergétique minimisés au cours des différentes étapes du protocole d'amarrage dérive des "restrictions d'interactions ambiguës" (*Ambiguous Interaction Restraints* (AIRs)), que HADDOCK utilise pour guider le processus d'amarrage. Les résidus ayant une forte probabilité d'être impliqués dans l'interaction sont définis comme "actifs", tandis que ceux qui sont potentiellement, mais avec une plus faible probabilité, impliqués dans l'interaction sont définis comme "passifs". Chaque AIR est défini comme une distance intermoléculaire ambiguë entre un résidu actif

5. <http://haddock.chem.uu.nl/services/HADDOCK/haddockserver-guru.html>

d'une molécule et des résidus spécifiques actifs ou passifs de l'autre. Une première analyse de la structure d'Imp β nous a permis d'identifier 68 résidus acides d'Imp β susceptibles d'interagir avec Rev dans une configuration où Rev empêcherait la fixation du domaine IBB d'Imp α à Imp β par encombrement stérique (cf. **Figure 2.31, page 87**). Ces 68 résidus et tous les résidus basiques de l'épingle hélicale de Rev ont été définis comme "actifs" (cf. **Tableau 2.4, page 89**). Les résidus passifs d'Imp β et de Rev ont été définis automatiquement par HADDOCK comme tous les résidus exposés en surface situés à moins de 12 Å d'un résidu actif. Dans la première étape du protocole d'amarrage, pour chacune des 1000 configurations testées, nous avons exclu 50% des AIRs du calcul de façon arbitraire, pour essayer de réduire les effets de biais éventuellement introduits par notre choix de résidus actifs.

À la fin du protocole d'amarrage, les structures finales du complexe Imp β /Rev sont regroupées en utilisant l'iRMSD ("interface-RMSD"), l'écart quadratique moyen (RMSD) de la chaîne principale des résidus à l'interface, calculé par paires. Un "cluster" est défini comme un ensemble d'au moins quatre configurations du complexe affichant un iRMSD inférieur à 1.0 Å. Les clusters qui en résultent sont analysés et classés en fonction de la surface enterrée dans l'interface et des énergies d'interactions (somme des termes énergiques c'est-à-dire électrostatiques, van der Waals, etc.), en calculant la moyenne de ces valeurs pour les quatre meilleures structures de chaque cluster.

4.16 Diffraction des rayons X aux petits angles

La diffraction des rayons X aux petits angles aussi appelée *Small Angle X-Ray Scattering* (SAXS), est une technique permettant d'obtenir des informations structurales d'une macromolécule ou d'un complexe. Les échantillons analysés ont préalablement été isolés par gel filtration (cf 4.2, page 132), sur une colonne S200 5/150 équilibrée dans 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl. Il a été préparé 30 μ l de solution d'Imp β à 50 μ M. 30 μ l de tampon ou 30 μ l de construction de Rev 5 fois plus concentrée (250 μ M) ont été ajoutés. Les échantillons ont été centrifugés à 21000 g pendant 10 min, puis 50 μ l ont été injectés sur une colonne de gel filtration. Le débit a été de 0.35 ml.min⁻¹. L'élution de la chromatographie passait à travers un

CHAPITRE 4. MATÉRIELS ET MÉTHODES
4.16. DIFFRACTION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES

capillaire qui était directement reliée aux faisceaux de rayons X. Les données ont été collectées sur la ligne de lumière spécialisée pour le SAXS des macromolécules à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, BM29, Grenoble, France) à raison de 60 clichés/min. Les données ont été traitées à l'aide de la suite logiciel "*All Thats Small Angle Scattering*" (ATSAS) fournie par l'EMBL⁶, et finalement visualisées à l'aide du logiciel PyMOL. Une vue d'ensemble du processus qui a permis de traiter les données est présentée **Figure 4.6**. Très brièvement, cette série de logiciels est utilisée pour déterminer la qualité des données, générer les graphiques de Guinier et de Kratky, générer la fonction de distribution de paires et ainsi obtenir le rayon de giration (R_g), le D_{max} , le volume de l'entité analysée et une estimation de la masse moléculaire. De plus, cette série de logiciels permet également de générer une enveloppe de l'espèce biochimique analysée ainsi que la création d'un modèle *ab-initio*.

6. www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html

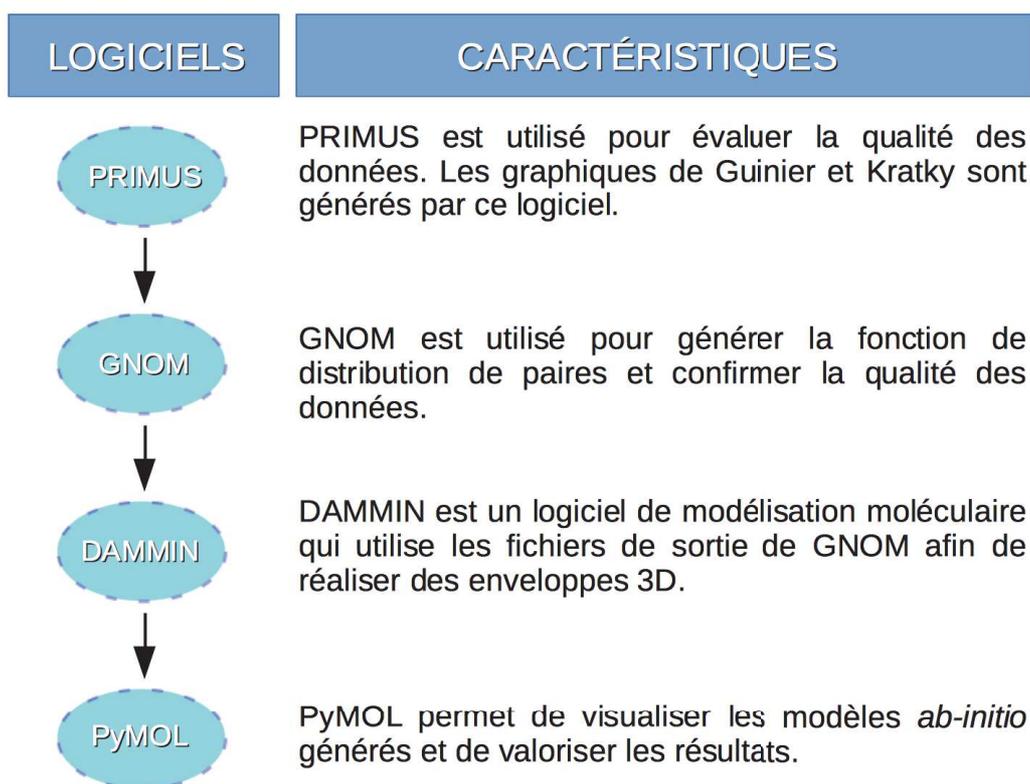


FIGURE 4.6 – Vue d'ensemble du traitement des données obtenues par SAXS à l'aide de la suite de logiciels ATSAS. Cette figure représente un organigramme des différents logiciels utilisés dans l'analyse des données obtenues en SAXS ainsi que leurs caractéristiques.

Bibliographie

- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T., Sali, A., and Rout, M. P. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*, 450(7170) :695–701.
- Alter, G. and Barouch, D. H. (2015). Natural evolution of broadly neutralizing antibodies. *Cell*, 161(3) :427–428.
- Alvisi, G. and Jans, D. A. (2015). Basis of cargo recognition by importin α : the power of structure. *Structure (London, England : 1993)*, 23(2) :251–252.
- Andrade, M. A. and Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington’s disease protein. *Nature Genetics*, 11(2) :115–116.
- Andrews, C. D., Spreen, W. R., Mohri, H., Moss, L., Ford, S., Gettie, A., Russell-Lodrigue, K., Bohm, R. P., Cheng-Mayer, C., Hong, Z., Markowitz, M., and Ho, D. D. (2014). Long-acting integrase inhibitor protects macaques from intrarectal simian/human immunodeficiency virus. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6175) :1151–1154.
- Andrews, C. D., Yueh, Y. L., Spreen, W. R., St Bernard, L., Boente-Carrera, M., Rodriguez, K., Gettie, A., Russell-Lodrigue, K., Blanchard, J., Ford, S., Mohri, H., Cheng-Mayer, C., Hong, Z., Ho, D. D., and Markowitz, M. (2015). A long-acting integrase inhibitor protects female macaques from repeated high-dose intravaginal SHIV challenge. *Science Translational Medicine*, 7(270) :270ra4.
- Ao, Z., Danappa Jayappa, K., Wang, B., Zheng, Y., Kung, S., Rassart, E., Depping, R., Kohler, M., Cohen, E. A., and Yao, X. (2010). Importin α 3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication. *Journal of Virology*, 84(17) :8650–8663.
- Arnold, M., Nath, A., Hauber, J., and Kehlenbach, R. H. (2006). Multiple importins function as nuclear transport receptors for the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(30) :20883–20890.
- Autran, B., Descours, B., Avettand-Fenoel, V., and Rouzioux, C. (2011). Elite controllers as a model of functional cure. *Current opinion in HIV and AIDS*, 6(3) :181–187.

-
- Auvert, B., Taljaard, D., Lagarde, E., Sobngwi-Tambekou, J., Sitta, R., and Puren, A. (2005). Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk : the ANRS 1265 Trial. *PLoS medicine*, 2(11) :e298.
- Azuma, Y. and Dasso, M. (2000). The role of Ran in nuclear function. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(3) :302–307.
- Baake, M., Bäuerle, M., Doenecke, D., and Albig, W. (2001). Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. *European Journal of Cell Biology*, 80(11) :669–677.
- Bahar, I., Lezon, T. R., Bakan, A., and Shrivastava, I. H. (2010). Normal mode analysis of biomolecular structures : functional mechanisms of membrane proteins. *Chemical Reviews*, 110(3) :1463–1497.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*, 220(4599) :868–871.
- Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L., and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future : 30 years of HIV research. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(12) :877–883.
- Battiste, J. L., Mao, H., Rao, N. S., Tan, R., Muhandiram, D. R., Kay, L. E., Frankel, A. D., and Williamson, J. R. (1996). Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5281) :1547–1551.
- Battistini, A. and Sgarbanti, M. (2014). HIV-1 latency : an update of molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Viruses*, 6(4) :1715–1758.
- Bäuerle, M., Doenecke, D., and Albig, W. (2002). The requirement of H1 histones for a heterodimeric nuclear import receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(36) :32480–32489.
- Bayliss, R., Kent, H. M., Corbett, A. H., and Stewart, M. (2000a). Crystallization and initial X-ray diffraction characterization of complexes of FxFG nucleoporin repeats with nuclear transport factors. *Journal of Structural Biology*, 131(3) :240–247.
- Bayliss, R., Leung, S. W., Baker, R. P., Quimby, B. B., Corbett, A. H., and Stewart, M. (2002a). Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *The EMBO journal*, 21(12) :2843–2853.
- Bayliss, R., Littlewood, T., and Stewart, M. (2000b). Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell*, 102(1) :99–108.
- Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L. A., Wentz, S. R., and Stewart, M. (2002b). GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(52) :50597–50606.
- Bestembayeva, A., Kramer, A., Labokha, A. A., Osmanović, D., Liashkovich, I., Orlova, E. V., Ford, I. J., Charras, G., Fassati, A., and Hoogenboom, B. W. (2015). Nanoscale stiffness topography

-
- reveals structure and mechanics of the transport barrier in intact nuclear pore complexes. *Nature Nanotechnology*, 10(1) :60–64.
- Bhardwaj, A. and Cingolani, G. (2010). Conformational selection in the recognition of the snurportin importin beta binding domain by importin beta. *Biochemistry*, 49(24) :5042–5047.
- Bischoff, F. R. and Görlich, D. (1997). RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS letters*, 419(2-3) :249–254.
- Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A., and Ponstingl, H. (1994). RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(7) :2587–2591.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., and Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *The EMBO journal*, 14(4) :705–715.
- Bischoff, F. R. and Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*, 354(6348) :80–82.
- Boeri Erba, E. and Petosa, C. (2015). The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*.
- Boivin, S., Cusack, S., Ruigrok, R. W. H., and Hart, D. J. (2010). Influenza A virus polymerase : structural insights into replication and host adaptation mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(37) :28411–28417.
- Boivin, S., Kozak, S., and Meijers, R. (2013). Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expression and Purification*, 91(2) :192–206.
- Broder, S. (2010). The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Research*, 85(1) :1–18.
- Brohawn, S. G., Leksa, N. C., Spear, E. D., Rajashankar, K. R., and Schwartz, T. U. (2008). Structural evidence for common ancestry of the nuclear pore complex and vesicle coats. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5906) :1369–1373.
- Brown, D. and Mattapallil, J. J. (2014). Gastrointestinal tract and the mucosal macrophage reservoir in HIV infection. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 21(11) :1469–1473.
- Budhu, A. S. and Wang, X. W. (2005). Loading and unloading : orchestrating centrosome duplication and spindle assembly by Ran/Crm1. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(11) :1510–1514.
- Bui, K. H., von Appen, A., DiGuilio, A. L., Ori, A., Sparks, L., Mackmull, M.-T., Bock, T., Hagen, W., Andrés-Pons, A., Glavy, J. S., and Beck, M. (2013). Integrated Structural Analysis of the Human Nuclear Pore Complex Scaffold. *Cell*, 155(6) :1233–1243.
- Carazo-Salas, R. E., Guarguaglini, G., Gruss, O. J., Segref, A., Karsenti, E., and Mattaj, I. W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature*, 400(6740) :178–181.

-
- Carrieri, P., Spire, B., Duran, S., Katlama, C., Peyramond, D., François, C., Chêne, G., Lang, J.-M., Moatti, J.-P., Leport, C., and APROCO Study Group (2003). Health-related quality of life after 1 year of highly active antiretroviral therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 32(1) :38–47.
- Casu, F., Duggan, B. M., and Hennig, M. (2013). The arginine-rich RNA-binding motif of HIV-1 Rev is intrinsically disordered and folds upon RRE binding. *Biophysical Journal*, 105(4) :1004–1017.
- Chahine, M. N. and Pierce, G. N. (2009). Therapeutic targeting of nuclear protein import in pathological cell conditions. *Pharmacological Reviews*, 61(3) :358–372.
- Chen, F., Gülbakan, B., Weidmann, S., Fagerer, S. R., Ibáñez, A. J., and Zenobi, R. (2015). Applying mass spectrometry to study non-covalent biomolecule complexes. *Mass Spectrometry Reviews*.
- Choi, S., Yamashita, E., Yasuhara, N., Song, J., Son, S.-Y., Won, Y. H., Hong, H. R., Shin, Y. S., Sekimoto, T., Park, I. Y., Yoneda, Y., and Lee, S. J. (2014). Structural basis for the selective nuclear import of the C2h2 zinc-finger protein Snail by importin β . *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 70(Pt 4) :1050–1060.
- Chuderland, D., Konson, A., and Seger, R. (2008). Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular Cell*, 31(6) :850–861.
- Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M. T., and Gerace, L. (2002). Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Molecular Cell*, 10(6) :1345–1353.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., and Müller, C. W. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, 399(6733) :221–229.
- Cochrane, A. (2004). Controlling HIV-1 Rev function. *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, 4(4) :287–295.
- Cochrane, A. W., Perkins, A., and Rosen, C. A. (1990). Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev : relevance of nucleolar localization to function. *Journal of Virology*, 64(2) :881–885.
- Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., Hakim, J. G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J. H., Godbole, S. V., Mehendale, S., Chariyalertsak, S., Santos, B. R., Mayer, K. H., Hoffman, I. F., Eshleman, S. H., Piwowar-Manning, E., Wang, L., Makhema, J., Mills, L. A., de Bruyn, G., Sanne, I., Eron, J., Gallant, J., Havlir, D., Swindells, S., Ribaud, H., Elharrar, V., Burns, D., Taha, T. E., Nielsen-Saines, K., Celentano, D., Essex, M., and Fleming, T. R. (2011). Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *New England Journal of Medicine*, 365(6) :493–505.
- Connor, E. M., Sperling, R. S., Gelber, R., Kiselev, P., Scott, G., O’Sullivan, M. J., VanDyke, R., Bey, M., Shearer, W., and Jacobson, R. L. (1994). Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 331(18) :1173–1180.

-
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., and Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, 94(2) :193–204.
- Cook, A. G. and Conti, E. (2010). Nuclear export complexes in the frame. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2) :247–252.
- Corbett, A. H. and Silver, P. A. (1996). The NTF2 gene encodes an essential, highly conserved protein that functions in nuclear transport in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(31) :18477–18484.
- Cornu, T. I., Mussolino, C., Bloom, K., and Cathomen, T. (2015). Editing CCR5 : A Novel Approach to HIV Gene Therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 848 :117–130.
- Côrtés, F. H., Passaes, C. P. B., Bello, G., Teixeira, S. L. M., Vorsatz, C., Babic, D., Sharkey, M., Grinsztejn, B., Veloso, V., Stevenson, M., and Morgado, M. G. (2015). HIV controllers with different viral load cutoff levels have distinct virologic and immunologic profiles. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 68(4) :377–385.
- Cory, T. J., Schacker, T. W., Stevenson, M., and Fletcher, C. V. (2013). Overcoming pharmacologic sanctuaries. *Current opinion in HIV and AIDS*, 8(3) :190–195.
- Dahabieh, M. S., Battivelli, E., and Verdin, E. (2015). Understanding HIV latency : the road to an HIV cure. *Annual Review of Medicine*, 66 :407–421.
- Dale, G. E., Oefner, C., and D’Arcy, A. (2003). The protein as a variable in protein crystallization. *Journal of Structural Biology*, 142(1) :88–97.
- D’Angelo, M. A. and Hetzer, M. W. (2008). Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends in Cell Biology*, 18(10) :456–466.
- Daugherty, M. D., Booth, D. S., Jayaraman, B., Cheng, Y., and Frankel, A. D. (2010a). HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28) :12481–12486.
- Daugherty, M. D., Liu, B., and Frankel, A. D. (2010b). Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(11) :1337–1342.
- de Goede, A. L., Vulto, A. G., Osterhaus, A. D. M. E., and Gruters, R. A. (2015). Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I : Epidemiology and pathogenesis of HIV infection. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 73(2) :87–99.
- de Vries, S. J., van Dijk, M., and Bonvin, A. M. J. J. (2010). The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature Protocols*, 5(5) :883–897.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., and O’Brien, S. J. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and

-
- progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5283) :1856–1862.
- Denning, D. P., Patel, S. S., Uversky, V., Fink, A. L., and Rexach, M. (2003). Disorder in the nuclear pore complex : the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5) :2450–2455.
- Derewenda, Z. S. (2004). Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure (London, England : 1993)*, 12(4) :529–535.
- Derewenda, Z. S. (2011). It’s all in the crystals.... *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 67(Pt 4) :243–248.
- Devos, D., Dokudovskaya, S., Alber, F., Williams, R., Chait, B. T., Sali, A., and Rout, M. P. (2004). Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. *PLoS biology*, 2(12) :e380.
- Dian, C., Bernaudat, F., Langer, K., Oliva, M. F., Fornerod, M., Schoehn, G., Müller, C. W., and Petosa, C. (2013). Structure of a truncation mutant of the nuclear export factor CRM1 provides insights into the auto-inhibitory role of its C-terminal helix. *Structure (London, England : 1993)*, 21(8) :1338–1349.
- DiMattia, M. A., Watts, N. R., Stahl, S. J., Rader, C., Wingfield, P. T., Stuart, D. I., Steven, A. C., and Grimes, J. M. (2010). Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13) :5810–5814.
- Dingwall, C., Robbins, J., Dilworth, S. M., Roberts, B., and Richardson, W. D. (1988). The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *The Journal of Cell Biology*, 107(3) :841–849.
- Dishinger, J. F., Kee, H. L., Jenkins, P. M., Fan, S., Hurd, T. W., Hammond, J. W., Truong, Y. N.-T., Margolis, B., Martens, J. R., and Verhey, K. J. (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nature Cell Biology*, 12(7) :703–710.
- Dolgin, E. (2014). Long-acting HIV drugs advanced to overcome adherence challenge. *Nature Medicine*, 20(4) :323–324.
- Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A. M. J. J. (2003). HADDOCK : a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7) :1731–1737.
- Doria-Rose, N. A. and Joyce, M. G. (2015). Strategies to guide the antibody affinity maturation process. *Current Opinion in Virology*, 11 :137–147.
- Drake, M. J. and Bates, P. (2015). Application of gene-editing technologies to HIV-1. *Current opinion in HIV and AIDS*, 10(2) :123–127.
- Dultz, E. and Ellenberg, J. (2010). Live imaging of single nuclear pores reveals unique assembly kinetics and mechanism in interphase. *The Journal of Cell Biology*, 191(1) :15–22.

-
- 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. *Analytical Biochemistry*, 357(2) :289–298.
- Ferraretto, X., Estellat, C., Damond, F., Longuet, P., Epelboin, S., Demailly, P., Yazbeck, C., Llabador, M.-A., Pasquet, B., Yazdanpanah, Y., Matheron, S., and Patrat, C. (2014). Timing of intermittent seminal HIV-1 RNA shedding in patients with undetectable plasma viral load under combination antiretroviral therapy. *PLoS One*, 9(3) :e88922.
- Fontes, M. R., Teh, T., and Kobe, B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *Journal of Molecular Biology*, 297(5) :1183–1194.
- Fontes, M. R. M., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R. I., and Kobe, B. (2003). Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *The Journal of Biological Chemistry*, 278(30) :27981–27987.
- Forwood, J. K. and Jans, D. A. (2002). Nuclear import pathway of the telomere elongation suppressor TRF1 : inhibition by importin α . *Biochemistry*, 41(30) :9333–9340.
- Forwood, J. K., Lam, M. H., and Jans, D. A. (2001). Nuclear import of Creb and AP-1 transcription factors requires importin- β 1 and Ran but is independent of importin- α . *Biochemistry*, 40(17) :5208–5217.
- Forwood, J. K., Lange, A., Zachariae, U., Marfori, M., Preast, C., Grubmüller, H., Stewart, M., Corbett, A. H., and Kobe, B. (2010). Quantitative structural analysis of importin- β flexibility : paradigm for solenoid protein structures. *Structure (London, England : 1993)*, 18(9) :1171–1183.
- Forwood, J. K., Lonhienne, T. G., Marfori, M., Robin, G., Meng, W., Guncar, G., Liu, S. M., Stewart, M., Carroll, B. J., and Kobe, B. (2008). Kap95p binding induces the switch loops of RanGDP to adopt the GTP-bound conformation : implications for nuclear import complex assembly dynamics. *Journal of Molecular Biology*, 383(4) :772–782.
- Fraser, J. E., Rawlinson, S. M., Wang, C., Jans, D. A., and Wagstaff, K. M. (2014). Investigating dengue virus nonstructural protein 5 (NS5) nuclear import. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1138 :301–328.
- Fukuhara, N., Fernandez, E., Ebert, J., Conti, E., and Svergun, D. (2004). Conformational variability of nucleo-cytoplasmic transport factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(3) :2176–2181.
- Fulcher, A. J. and Jans, D. A. (2011). Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of viral proteins : an integral role in pathogenesis? *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1813(12) :2176–2190.
- Gandhi, M., Glidden, D. V., Liu, A., Anderson, P. L., Horng, H., Defechereuz, P., Guanira, J. V., Chariyalertsak, S., Bekker, L.-G., Grant, R. M., and iPrEX study team (2015). Concentrations of TFV-DP/FTC-TP in dried blood spots and TFV/FTC in hair are strongly correlated in iPrEX OLE : Implications for PrEP adherence monitoring. *The Journal of Infectious Diseases*.
- Geertsma, E. R. and Dutzler, R. (2011). A versatile and efficient high-throughput cloning tool for structural biology. *Biochemistry*, 50(15) :3272–3278.

-
- Goldschmidt, L., Cooper, D. R., Derewenda, Z. S., and Eisenberg, D. (2007). Toward rational protein crystallization : A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 16(8) :1569–1576.
- Gontan, C., Güttler, T., Engelen, E., Demmers, J., Fornerod, M., Grosveld, F. G., Tibboel, D., Görlich, D., Poot, R. A., and Rottier, R. J. (2009). Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for Sox family transcription factors. *The Journal of Cell Biology*, 185(1) :27–34.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., and Izaurralde, E. (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *The Journal of Cell Biology*, 138(1) :65–80.
- Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U., and Bischoff, F. R. (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *The EMBO Journal*, 15(20) :5584–5594.
- Grant, R. M., Anderson, P. L., McMahan, V., Liu, A., Amico, K. R., Mehrotra, M., Hosek, S., Mosquera, C., Casapia, M., Montoya, O., Buchbinder, S., Veloso, V. G., Mayer, K., Chariyalertsak, S., Bekker, L.-G., Kallas, E. G., Schechter, M., Guanira, J., Bushman, L., Burns, D. N., Rooney, J. F., Glidden, D. V., and iPrEx study team (2014). Uptake of pre-exposure prophylaxis, sexual practices, and HIV incidence in men and transgender women who have sex with men : a cohort study. *The Lancet. Infectious Diseases*, 14(9) :820–829.
- Grossman, E., Medalia, O., and Zwerger, M. (2012). Functional architecture of the nuclear pore complex. *Annual Review of Biophysics*, 41 :557–584.
- Gu, L., Tsuji, T., Jarbouli, M. A., Yeo, G. P., Sheehy, N., Hall, W. W., and Gautier, V. W. (2011). Intermolecular masking of the HIV-1 Rev NLS by the cellular protein HIC : novel insights into the regulation of Rev nuclear import. *Retrovirology*, 8 :17.
- Gu, W.-G. (2015). Genome editing-based HIV therapies. *Trends in Biotechnology*, 33(3) :172–179.
- Güttler, T., Madl, T., Neumann, P., Deichsel, D., Corsini, L., Monecke, T., Ficner, R., Sattler, M., and Görlich, D. (2010). NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(11) :1367–1376.
- Halder, K., Dölker, N., Van, Q., Gregor, I., Dickmanns, A., Baade, I., Kehlenbach, R. H., Ficner, R., Enderlein, J., Grubmüller, H., and Neumann, H. (2015). MD Simulations and FRET Reveal an Environment-Sensitive Conformational Plasticity of Importin- β . *Biophysical Journal*, 109(2) :277–286.
- Hammer, S. M., Squires, K. E., Hughes, M. D., Grimes, J. M., Demeter, L. M., Currier, J. S., Eron, J. J., Feinberg, J. E., Balfour, H. H., Deyton, L. R., Chodakewitz, J. A., and Fischl, M. A. (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *The New England Journal of Medicine*, 337(11) :725–733.
- Harwig, A., Das, A. T., and Berkhout, B. (2015). HIV-1 RNAs : sense and antisense, large mRNAs and small siRNAs and miRNAs. *Current opinion in HIV and AIDS*, 10(2) :103–109.
- Havlin, R. H., Blanco, F. J., and Tycko, R. (2007). Constraints on protein structure in HIV-1 Rev

-
- and Rev-RNA supramolecular assemblies from two-dimensional solid state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 46(11) :3586–3593.
- Henderson, B. R. and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors : the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *Journal of Molecular Biology*, 274(5) :693–707.
- Hetzer, M., Bilbao-Cortés, D., Walther, T. C., Gruss, O. J., and Mattaj, I. W. (2000). GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Molecular Cell*, 5(6) :1013–1024.
- Hoelz, A., Debler, E. W., and Blobel, G. (2011). The structure of the nuclear pore complex. *Annual Review of Biochemistry*, 80 :613–643.
- Horwitz, J. P., Chua, J., and Noel, M. (1964). Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- β -D-lyxofuranosyl)thymine1,2. *The Journal of Organic Chemistry*, 29(7) :2076–2078.
- Huber, J., Dickmanns, A., and Lührmann, R. (2002). The importin-beta binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 156(3) :467–479.
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müssig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., Blau, I. W., Hofmann, W. K., and Thiel, E. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 360(7) :692–698.
- Ibarra, A. and Hetzer, M. W. (2015). Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes & Development*, 29(4) :337–349.
- Iwai, S., Pritchard, C., Mann, D. A., Karn, J., and Gait, M. J. (1992). Recognition of the high affinity binding site in rev-response element RNA by the human immunodeficiency virus type-1 rev protein. *Nucleic Acids Research*, 20(24) :6465–6472.
- Jain, C. and Belasco, J. G. (2001). Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. *Molecular Cell*, 7(3) :603–614.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D., and Görlich, D. (1999). The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *The EMBO journal*, 18(9) :2411–2423.
- Jamali, T., Jamali, Y., Mehrbod, M., and Mofrad, M. R. K. (2011). Nuclear pore complex : biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 287 :233–286.
- Jayaraman, B., Crosby, D. C., Homer, C., Ribeiro, I., Mavor, D., and Frankel, A. D. (2014). RNA-directed remodeling of the HIV-1 protein Rev orchestrates assembly of the Rev-Rev response element complex. *eLife*, 3 :e04120.
- Jeang, K.-T. (2012). Multi-Faceted Post-Transcriptional Functions of HIV-1 Rev. *Biology*, 1(2) :165–174.

-
- Kabachinski, G. and Schwartz, T. U. (2015). The nuclear pore complex—structure and function at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(3) :423–429.
- Kahle, J., Baake, M., Doenecke, D., and Albig, W. (2005). Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin beta and importin 13. *Molecular and Cellular Biology*, 25(13) :5339–5354.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., and Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, 311(5981) :33–38.
- Kappel, C., Zachariae, U., Dölker, N., and Grubmüller, H. (2010). An unusual hydrophobic core confers extreme flexibility to HEAT repeat proteins. *Biophysical Journal*, 99(5) :1596–1603.
- Karris, M. Y. and Haubrich, R. H. (2014). Antiretroviral Therapy in the Elite Controller : Justified or Premature? *The Journal of Infectious Diseases*.
- Kimura, M. and Imamoto, N. (2014). Biological significance of the importin- β family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 15(7) :727–748.
- Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nature Structural Biology*, 6(4) :388–397.
- Kobe, B. and Kajava, A. V. (2000). When protein folding is simplified to protein coiling : the continuum of solenoid protein structures. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10) :509–515.
- Kobiler, O., Drayman, N., Butin-Israeli, V., and Oppenheim, A. (2012). Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 3(6) :526–539.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(1) :478–485.
- Kragelj, J., Ozenne, V., Blackledge, M., and Jensen, M. R. (2013). Conformational propensities of intrinsically disordered proteins from NMR chemical shifts. *Chemphyschem : A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 14(13) :3034–3045.
- Lam, M. H., Hu, W., Xiao, C. Y., Gillespie, M. T., and Jans, D. A. (2001). Molecular dissection of the importin beta1-recognized nuclear targeting signal of parathyroid hormone-related protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(2) :629–634.
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., Delfraissy, J.-F., and SEROCO-HEMOCO Study Group (2005). HIV controllers : a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(7) :1053–1056.
- Lambotte, O. and Delfraissy, J.-F. (2006). [HIV controllers : a homogeneous group of HIV-1 infected patients with a spontaneous control of viral replication]. *Pathologie-Biologie*, 54(10) :566–571.
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., and Corbett, A. H. (2007).

-
- Classical nuclear localization signals : definition, function, and interaction with importin alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8) :5101–5105.
- Le Roux, L. G. and Moroianu, J. (2003). Nuclear entry of high-risk human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein occurs via several pathways. *Journal of Virology*, 77(4) :2330–2337.
- Lee, S. J., Imamoto, N., Sakai, H., Nakagawa, A., Kose, S., Koike, M., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2000). The adoption of a twisted structure of importin-beta is essential for the protein-protein interaction required for nuclear transport. *Journal of Molecular Biology*, 302(1) :251–264.
- Lee, S. J., Matsuura, Y., Liu, S. M., and Stewart, M. (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature*, 435(7042) :693–696.
- Lee, S. J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoshimura, M., Sakai, H., Chong, K. T., Tsukihara, T., and Yoneda, Y. (2003). The structure of importin-beta bound to SREBP-2 : nuclear import of a transcription factor. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5650) :1571–1575.
- Lescop, E., Schanda, P., and Brutscher, B. (2007). A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, 187(1) :163–169.
- Levin, A., Hayouka, Z., Friedler, A., and Loyter, A. (2010a). Nucleocytoplasmic shuttling of HIV-1 integrase is controlled by the viral Rev protein. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 1(2) :190–201.
- Levin, A., Hayouka, Z., Friedler, A., and Loyter, A. (2010b). Transportin 3 and importin α are required for effective nuclear import of HIV-1 integrase in virus-infected cells. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 1(5) :422–431.
- Levin, A., Loyter, A., and Bukrinsky, M. (2011). Strategies to inhibit viral protein nuclear import : HIV-1 as a target. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1813(9) :1646–1653.
- Li, C., Guan, X., Du, T., Jin, W., Wu, B., Liu, Y., Wang, P., Hu, B., Griffin, G. E., Shattock, R. J., and Hu, Q. (2015a). Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4⁺ T cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *The Journal of General Virology*.
- Li, J. Z., Arnold, K. B., Lo, J., Dugast, A.-S., Plants, J., Ribaldo, H. J., Cesa, K., Heisey, A., Kuritzkes, D. R., Lauffenburger, D. A., Alter, G., Landay, A., Grinspoon, S., and Pereyra, F. (2015b). Differential levels of soluble inflammatory markers by human immunodeficiency virus controller status and demographics. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(1) :ofu117.
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Kouy, R. A., and Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86(3) :367–377.
- Mann, D. A., Mikaélian, I., Zimmel, R. W., Green, S. M., Lowe, A. D., Kimura, T., Singh, M., Butler, P. J., Gait, M. J., and Karn, J. (1994). A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *Journal of Molecular Biology*, 241(2) :193–207.

-
- Marenchino, M., Armbruster, D. W., and Hennig, M. (2009). Rapid and efficient purification of RNA-binding proteins : application to HIV-1 Rev. *Protein Expression and Purification*, 63(2) :112–119.
- Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J. J., Mehdi, A. M., Saunders, N. F. W., Curmi, P. M., Forwood, J. K., Bodén, M., and Kobe, B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1813(9) :1562–1577.
- Marion, D. (2010). Combining methods for speeding up multi-dimensional acquisition. Sparse sampling and fast pulsing methods for unfolded proteins. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, 206(1) :81–87.
- Maul, G. G., Maul, H. M., Scogna, J. E., Lieberman, M. W., Stein, G. S., Hsu, B. Y., and Borun, T. W. (1972). Time sequence of nuclear pore formation in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and in HeLa cells during the cell cycle. *The Journal of Cell Biology*, 55(2) :433–447.
- Mertens, H. D. T. and Svergun, D. I. (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of Structural Biology*, 172(1) :128–141.
- Mitrousis, G., Orlia, A. S., Walker-Kopp, N., and Cingolani, G. (2008). Molecular basis for the recognition of snurportin 1 by importin beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(12) :7877–7884.
- Monette, A., Panté, N., and Mouland, A. J. (2011). HIV-1 remodels the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology*, 193(4) :619–631.
- Moore, J. D., Yang, J., Truant, R., and Kornbluth, S. (1999). Nuclear import of Cdk/cyclin complexes : identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *The Journal of Cell Biology*, 144(2) :213–224.
- Moore, M. S. and Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 365(6447) :661–663.
- Mor, A., White, M. A., and Fontoura, B. M. A. (2014). Nuclear trafficking in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 28 :28–35.
- Morgner, N. and Robinson, C. V. (2012). Massign : an assignment strategy for maximizing information from the mass spectra of heterogeneous protein assemblies. *Analytical Chemistry*, 84(6) :2939–2948.
- Moroianu, J., Blobel, G., and Radu, A. (1995). Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(6) :2008–2011.
- Mosammaparast, N. and Pemberton, L. F. (2004). Karyopherins : from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends in Cell Biology*, 14(10) :547–556.
- Mühlhäusser, P., Müller, E. C., Otto, A., and Kutay, U. (2001). Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO reports*, 2(8) :690–696.

-
- Nielsen, M. H., Pedersen, F. S., and Kjems, J. (2005). Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*, 2 :10.
- Niesen, F. H., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, 2(9) :2212–2221.
- Nunes-Alves, C. (2015). Viral infection : CRISPR-Cas9 defence against HIV-1. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5) :250.
- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. L., and Macallan, D. C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection : Lessons for viral immunopathogenesis. *Reviews in Medical Virology*, 23(4) :221–240.
- Ohba, T., Nakamura, M., Nishitani, H., and Nishimoto, T. (1999). Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418) :1356–1358.
- Oliva, A., Llabrés, M., and Fariña, J. B. (2001). Comparative study of protein molecular weights by size-exclusion chromatography and laser-light scattering. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(5-6) :833–841.
- Page, R. (2008). Strategies for improving crystallization success rates. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 426 :345–362.
- Palmeri, D. and Malim, M. H. (1999). Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2) :1218–1225.
- Pau, A. K. and George, J. M. (2014). Antiretroviral therapy : current drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*, 28(3) :371–402.
- Pedersen, K. K., Eiersted, M. R., Gaardbo, J. C., Pedersen, M., Gerstoft, J., Troseid, M., and Nielsen, S. D. (2015). Lower self-reported Quality of Life in HIV-infected patients on cART and with low co-morbidity compared to healthy controls. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*.
- 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. *Journal of Applied Crystallography*, 45(Pt 2) :342–350.
- Pinzone, M. R., Berretta, M., Cacopardo, B., and Nunnari, G. (2015). Epstein-Barr Virus- and Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus-Related Malignancies in the Setting of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Seminars in Oncology*, 42(2) :258–271.
- Préau, M., Marcellin, F., Carrieri, M. P., Lert, F., Obadia, Y., Spire, B., and VESPA Study Group (2007). Health-related quality of life in French people living with HIV in 2003 : results from the national ANRS-EN12-VESPA Study. *AIDS (London, England)*, 21 Suppl 1 :S19–27.
- Pumroy, R. A. and Cingolani, G. (2015). Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *The Biochemical Journal*, 466(1) :13–28.

-
- Quinn, T. C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M. O., Lutalo, T., and Gray, R. H. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 342(13) :921–929.
- Radzio, J., Spreen, W., Yueh, Y. L., Mitchell, J., Jenkins, L., García-Lerma, J. G., and Heneine, W. (2015). The long-acting integrase inhibitor GSK744 protects macaques from repeated intravaginal SHIV challenge. *Science Translational Medicine*, 7(270) :270ra5.
- Rajabi, K., Ashcroft, A. E., and Radford, S. E. (2015). Mass spectrometric methods to analyze the structural organization of macromolecular complexes. *Methods (San Diego, Calif.)*.
- Rennie, S., Siedner, M., Tucker, J. D., and Moodley, K. (2015). The ethics of talking about 'HIV cure'. *BMC medical ethics*, 16 :18.
- Ribbeck, K. and Görlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *The EMBO journal*, 20(6) :1320–1330.
- Rodger, A., Bruun, T., Weait, M., Vernazza, P., Collins, S., Estrada, V., Lunzen, J. V., Corbelli, G. M., Lampe, F., Phillips, A., Lundgren, J., and PARTNER study group (2012). Partners of people on ART - a New Evaluation of the Risks (The PARTNER study) : design and methods. *BMC public health*, 12 :296.
- Rogez-Florent, T., Duhamel, L., Goossens, L., Six, P., Drucbert, A.-S., Depreux, P., Danzé, P.-M., Landy, D., Goossens, J.-F., and Foulon, C. (2014). Label-free characterization of carbonic anhydrase-novel inhibitor interactions using surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry and fluorescence-based thermal shift assays. *Journal of molecular recognition : JMR*, 27(1) :46–56.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382(6593) :722–725.
- Scanlon, M. J., Fairlie, D. P., Craik, D. J., Englebretsen, D. R., and West, M. L. (1995). NMR solution structure of the RNA-binding peptide from human immunodeficiency virus (type 1) Rev. *Biochemistry*, 34(26) :8242–8249.
- Schrader, N., Koerner, C., Koessmeier, K., Bangert, J.-A., Wittinghofer, A., Stoll, R., and Vetter, I. R. (2008). The crystal structure of the Ran-Nup153znf2 complex : a general Ran docking site at the nuclear pore complex. *Structure (London, England : 1993)*, 16(7) :1116–1125.
- Sharon, M. and Horovitz, A. (2015). Probing allosteric mechanisms using native mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology*, 34 :7–16.
- Sharp, P. M. and Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1) :a006841.
- Shiryaev, S. A., Remacle, A. G., Ratnikov, B. I., Nelson, N. A., Savinov, A. Y., Wei, G., Bottini, M., Rega, M. F., Parent, A., Desjardins, R., Fugere, M., Day, R., Sabet, M., Pellecchia, M., Lid-

-
- dington, R. C., Smith, J. W., Mustelin, T., Guiney, D. G., Lebl, M., and Strongin, A. Y. (2007). Targeting host cell furin proprotein convertases as a therapeutic strategy against bacterial toxins and viral pathogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29) :20847–20853.
- Sinz, A., Arlt, C., Chorev, D., and Sharon, M. (2015). Chemical cross-linking and native mass spectrometry : A fruitful combination for structural biology. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*.
- Sobott, F., Hernández, H., McCammon, M. G., Tito, M. A., and Robinson, C. V. (2002). A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies. *Analytical Chemistry*, 74(6) :1402–1407.
- Solyom, Z., Schwarten, M., Geist, L., Konrat, R., Willbold, D., and Brutscher, B. (2013). BEST-TROSY experiments for time-efficient sequential resonance assignment of large disordered proteins. *Journal of biomolecular NMR*, 55(4) :311–321.
- Sood, V., Unwalla, H., Gupta, N., Chakraborti, S., and Banerjee, A. C. (2007). Potent knock down of HIV-1 replication by targeting HIV-1 Tat/Rev RNA sequences synergistically with catalytic RNA and DNA. *AIDS (London, England)*, 21(1) :31–40.
- Spreen, W., Ford, S. L., Chen, S., Wilfret, D., Margolis, D., Gould, E., and Piscitelli, S. (2014). GSK1265744 pharmacokinetics in plasma and tissue after single-dose long-acting injectable administration in healthy subjects. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 67(5) :481–486.
- Stevens, R. C. (2000). High-throughput protein crystallization. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(5) :558–563.
- Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*, 9(7) :853–860.
- Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(3) :195–208.
- Stewart, M., Kent, H. M., and McCoy, A. J. (1998). The structure of the Q69I mutant of GDP-Ran shows a major conformational change in the switch II loop that accounts for its failure to bind nuclear transport factor 2 (NTF2). *Journal of Molecular Biology*, 284(5) :1517–1527.
- Strawn, L. A., Shen, T., Shulga, N., Goldfarb, D. S., and Wenthe, S. R. (2004). Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nature Cell Biology*, 6(3) :197–206.
- Takizawa, C. G., Weis, K., and Morgan, D. O. (1999). Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14) :7938–7943.
- Terry, L. J. and Wenthe, S. R. (2009). Flexible gates : dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryotic Cell*, 8(12) :1814–1827.
- Torres, R. A. and Lewis, W. (2014). Aging and HIV/AIDS : pathogenetic role of therapeutic side effects. *Laboratory Investigation ; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 94(2) :120–128.

-
- Truant, R. and Cullen, B. R. (1999). The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2) :1210–1217.
- van den Heuvel, R. H. H., van Duijn, E., Mazon, H., Synowsky, S. A., Lorenzen, K., Versluis, C., Brouns, S. J. J., Langridge, D., van der Oost, J., Hoyes, J., and Heck, A. J. R. (2006). Improving the performance of a quadrupole time-of-flight instrument for macromolecular mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(21) :7473–7483.
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D., and Wittinghofer, A. (1999a). Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, 97(5) :635–646.
- Vetter, I. R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J., and Wittinghofer, A. (1999b). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue : implications for nuclear transport. *Nature*, 398(6722) :39–46.
- Vyboh, K., Jenabian, M.-A., Mehraj, V., and Routy, J.-P. (2015). HIV and the gut microbiota, partners in crime : breaking the vicious cycle to unearth new therapeutic targets. *Journal of Immunology Research*, 2015 :614127.
- Waeber, G. and Habener, J. F. (1991). Nuclear translocation and DNA recognition signals colocalized within the bZIP domain of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(10) :1431–1438.
- Wagstaff, K. M., Sivakumaran, H., Heaton, S. M., Harrich, D., and Jans, D. A. (2012). Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *The Biochemical Journal*, 443(3) :851–856.
- Waldmann, I., Wälde, S., and Kehlenbach, R. H. (2007). Nuclear import of c-Jun is mediated by multiple transport receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(38) :27685–27692.
- Walther, T. C., Askjaer, P., Gentzel, M., Habermann, A., Griffiths, G., Wilm, M., Mattaj, I. W., and Hetzer, M. (2003). RanGTP mediates nuclear pore complex assembly. *Nature*, 424(6949) :689–694.
- Wang, H., Kowalski, M. D., Lakdawala, A. S., Vogt, F. G., and Wu, L. (2015). An efficient and highly diastereoselective synthesis of GSK1265744, a potent HIV integrase inhibitor. *Organic Letters*, 17(3) :564–567.
- Wang, Y. and Jardetzky, O. (2002). Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 11(4) :852–861.
- Wente, S. R. and Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10) :a000562.
- Wittinghofer, A. and Vetter, I. R. (2011). Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annual Review of Biochemistry*, 80 :943–971.
- Wodrich, H., Cassany, A., D'Angelo, M. A., Guan, T., Nemerow, G., and Gerace, L. (2006). Ade-

-
- novirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways. *Journal of Virology*, 80(19) :9608–9618.
- Wohlwend, D., Strasser, A., Dickmanns, A., and Ficner, R. (2007). Structural basis for RanGTP independent entry of spliceosomal U snRNPs into the nucleus. *Journal of Molecular Biology*, 374(4) :1129–1138.
- Wong, C.-H., Chan, H., Ho, C.-Y., Lai, S.-K., Chan, K.-S., Koh, C.-G., and Li, H.-Y. (2009). Apoptotic histone modification inhibits nuclear transport by regulating RCC1. *Nature Cell Biology*, 11(1) :36–45.
- Wright, K. (1986). AIDS therapy. First tentative signs of therapeutic promise. *Nature*, 323(6086) :283.
- Wu, J., Matunis, M. J., Kraemer, D., Blobel, G., and Coutavas, E. (1995). Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(23) :14209–14213.
- Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y. I., and Lodish, H. F. (2000). A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14) :7853–7858.
- Xu, D., Farmer, A., and Chook, Y. M. (2010). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- β proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(6) :782–790.
- Yang, L., Song, G., and Jernigan, R. L. (2007). How well can we understand large-scale protein motions using normal modes of elastic network models? *Biophysical Journal*, 93(3) :920–929.
- Yang, S. N. Y., Takeda, A. A. S., Fontes, M. R. M., Harris, J. M., Jans, D. A., and Kobe, B. (2010). Probing the specificity of binding to the major nuclear localization sequence-binding site of importin-alpha using oriented peptide library screening. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(26) :19935–19946.
- Zachariae, U. and Grubmüller, H. (2008). Importin-beta : structural and dynamic determinants of a molecular spring. *Structure (London, England : 1993)*, 16(6) :906–915.
- Zhang, C. and Clarke, P. R. (2000). Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5470) :1429–1432.
- Zhang, R. and Monsma, F. (2010). Fluorescence-based thermal shift assays. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 13(4) :389–402.
- Zhou, P. and Wagner, G. (2010). Overcoming the solubility limit with solubility-enhancement tags : successful applications in biomolecular NMR studies. *Journal of biomolecular NMR*, 46(1) :23–31.
- Zhu, W., Lei, R., Le Duff, Y., Li, J., Guo, F., Wainberg, M. A., and Liang, C. (2015). The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, 12(1) :22.

Annexe A

Traitements contre le VIH-1

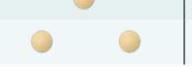
Voici une liste de 2015 des médicaments utilisés contre le VIH-1 en France¹ :

INHIBITEURS NON NUCLÉOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE (INNTI)					
RPV	EDURANT® rilpivirine JANSSEN		1 comprimé (25 mg), 1 fois/jour		à prendre au cours d'un repas
EVV	INTELENCE® etravirine JANSSEN		2 comprimés (100 mg), 2 fois/jour ou 1 comprimé (200 mg), 2 fois/jour		à prendre après un repas
EFV	SUSTIVA® efavirenz BMS		1 comprimé (600 mg), 1 fois/jour		à prendre à jeun (1 H avant ou 2 H après un repas), de préférence le soir au coucher
EFV	EFAVIRENZ générique de Sustiva® MYLAN		1 comprimé (600 mg), 1 fois/jour		à prendre à jeun (au moins 1 H avant ou 2 H après repas), de préférence le soir au coucher
NVP	VIRAMUNE® névirapine BOEHRINGER INGELHEIM		1 comprimé (200 mg), 1 fois/jour les 14 premiers jours puis 1 comprimé (200 mg), 2 fois/jour		à prendre au cours ou en dehors des repas
NVP	NÉVIRAPINE générique de Viramune® MYLAN / SANDOZ		1 comprimé (200 mg), 1 fois/jour les 14 premiers jours puis 1 comprimé (200 mg), 2 fois/jour		à prendre au cours ou en dehors des repas
NVP	VIRAMUNE LP® névirapine BOEHRINGER INGELHEIM		1 comprimé (400 mg), 1 fois/jour en remplacement des comprimés de VIRAMUNE® 200 mg pris 2 fois/jour ou en relais après 14 jours d'une prise unique de VIRAMUNE® 200 mg		à prendre au cours ou en dehors des repas

1. Figures de l'association actions traitements

INHIBITEURS DE LA PROTÉASE (IP)					
LPV/RTV	KALETRA® lopinavir ritonavir ABBOTT		2 comprimés (200 mg de lopinavir + 50 mg de ritonavir) 2 fois/jour ou 4 comprimés, 1 fois/jour	 	à prendre au cours ou en dehors d'un repas
DRV	PREZISTA® darunavir JANSSEN		2 comprimés (400 mg), 1 fois/jour boostés avec 100 mg de Norvir® ou 1 comprimé (600 mg), 2 fois/jour boosté avec 100 mg de Norvir® à chaque prise ou 1 comprimé (800 mg), 1 fois/jour boosté avec 100 mg de Norvir®	  	à prendre au cours d'un repas
ATV	REYATAZ® atazanavir BMS		1 gélule (300 mg), 1 fois/jour boostée avec 100 mg de Norvir® (ou 2 gélules à 200 mg en fonction du traitement antirétroviral associé)	 	à prendre au cours d'un repas, même léger

INHIBITEURS NUCLÉOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE (INTI)					
		DOSAGE ET POSOLOGIE ADULTE	PLANIFICATION DES PRISES	RECOMMANDATION DE PRISE	
FTC	EMTRIVA® emtricitabine GILEAD		1 gélule (200 mg), 1 fois/jour		à prendre au cours ou en dehors des repas
TDF	VIREAD® ténofovir GILEAD		1 comprimé (245 mg), 1 fois/jour		à prendre au cours d'un repas, même léger
ABC	ZIAGEN® abacavir VIV HEALTHCARE		1 comprimé (300 mg), 2 fois/jour ou 2 comprimés (300 mg), 1 fois/jour	 	à prendre au cours ou en dehors des repas
3TC	EPIVIR® lamivudine VIV HEALTHCARE		1 comprimé (150 mg), 2 fois/jour ou 1 comprimé (300 mg), 1 fois/jour	 	à prendre au cours ou en dehors des repas
3TC	LAMIVUDINE générique de Epivir® MYLAN		1 comprimé (150 mg), 2 fois/jour ou 1 comprimé (300 mg), 1 fois/jour	 	à prendre au cours ou en dehors des repas

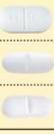
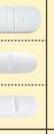
INHIBITEURS DE L'INTEGRASE					
RAL	ISENTRESS® raltegravir MSD		1 comprimé (400 mg), 2 fois/jour		à prendre au cours ou en dehors des repas
DTG	TIVICAY® dolutégravir VIV HEALTHCARE		<i>selon le profil viral</i> 1 comprimé (50 mg), 1 fois/jour ou 2 comprimés 1 fois/jour	 	à prendre au cours ou en dehors d'un repas à prendre pendant un repas

INHIBITEUR DU RECEPTEUR CCR-5					
MVC	CESENTRI® maraviroc VIV HEALTHCARE		1 comprimé (150 mg), 2 fois/jour ou 1 comprimé (300 mg), 2 fois/jour ou 2 comprimés (300 mg), 2 fois/jour en fonction des antiviraux associés	  	à prendre au cours ou en dehors des repas

INHIBITEUR DE FUSION

T-20	FUZÉON® enfuvirtide ROCHE		1 injection sous-cutanée de 90 mg (1mL), 2 fois/jour		bien suivre les recommandations de reconstitution du produit et d'injection
-------------	--	---	---	--	--

ASSOCIATIONS DE PLUSIEURS MOLÉCULES

	4 MOLÉCULES/CP	DOSAGE ET POSOLOGIE ADULTE	PLANIFICATION DES PRISES	RECOMMANDATION DE PRISE
Comprimés à prise unique quotidienne	STRIBILD® ténofovir + emtricitabine + elvitégravir + cobicistat GILEAD <small>TDF+FTC+EI+G+COBI</small>	 1 comprimé (300mg de ténofovir + 200mg d'emtricitabine + 150mg d'elvitégravir + 150mg de cobicistat) 1 fois/jour		au cours d'une repas, même léger
	ATRIPLA® efavirenz + emtricitabine + ténofovir GILEAD & BMS <small>EFV+FTC+TDF</small>	 1 comprimé (600 mg d'efavirenz + 200 mg d'emtricitabine + 245 mg de ténofovir) 1 fois/jour		à prendre à jeun (1 H avant ou 2 H après un repas), de préférence le soir au coucher
	EVIPLERA® emtricitabine + rilpivirine + ténofovir GILEAD & JANSSEN <small>FTC+RPV+TDF</small>	 1 comprimé (200 mg d'emtricitabine + 25mg de rilpivirine + 245 mg de ténofovir) 1 fois/jour		à prendre au cours d'un vrai repas
	TRIZIVIR® abacavir + lamivudine + zidovudine VIV HEALTHCARE <small>ABC+3TC+AZT</small>	 1 comprimé (300 mg d'abacavir + 150 mg de lamivudine + 300 mg de zidovudine) 2 fois/jour	 	à prendre au cours ou en dehors des repas
	TRIUMEQ® abacavir + lamivudine + dolutégravir VIV HEALTHCARE <small>3TC+ABC+DTG</small>	 1 comprimé (600mg d'abacavir + 300mg de lamivudine + 50mg de dolutégravir) 1 fois/jour		au cours ou en dehors d'un repas
combinaison de deux molécules à associer avec un autre ARV	COMBIVIR® lamivudine + zidovudine VIV HEALTHCARE <small>3TC+ZDV</small>	 1 comprimé (150 mg de lamivudine + 300 mg de zidovudine) 2 fois/jour	 	à prendre au cours ou en dehors des repas
	LAMIVUDINE + ZIDOVUDINE générique de Combivir® MYLAN / TEVA / SANDOZ <small>3TC+ZDV</small>	 1 comprimé (150 mg de lamivudine + 300 mg de zidovudine) 2 fois/jour	 	au cours ou en dehors d'un repas
	KIVEXA® abacavir + lamivudine VIV HEALTHCARE <small>ABC+3TC</small>	 1 comprimé (600 mg d'abacavir + 300 mg de lamivudine) 1 fois/jour		à prendre au cours ou en dehors des repas
	TRUVADA® emtricitabine + ténofovir GILEAD <small>FTC+TDF</small>	 1 comprimé (200 mg d'emtricitabine + 245 mg de ténofovir) 1 fois/jour		à prendre au cours d'un repas, même léger

BOOSTER

RTV	NORVIR® ritonavir ABBOTT		utilisé comme booster de chaque prise d'inhibiteur de protéase, c'est à dire pour augmenter la concentration des molécules prises en association	posologie en fonction de l'antiprotéase associé	à prendre au cours des repas
------------	---------------------------------------	---	--	---	------------------------------

Annexe **B**

Quelques implications à AIDES

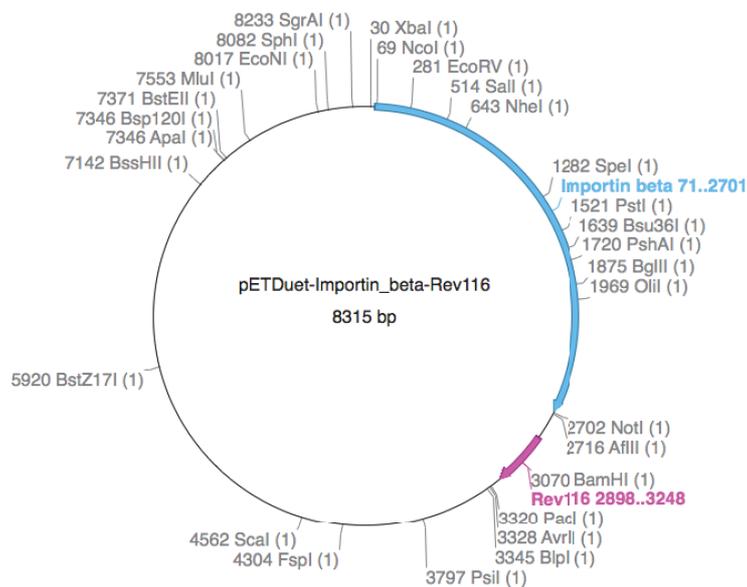
Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler en tant que "volontaire" au service de la plus grosse association française de lutte contre le VIH/SIDA et des hépatites virales : AIDES. Comme pour les pompiers, nous utilisons le terme de "volontaire" plutôt que celui de "bénévole". Cette association, créée par Daniel Defert en 1984, a participé entre autre, à la création des lignes d'écoute téléphonique pour soutenir les personnes séro-concernées (délégées désormais principalement à Sida Info Service (SIS)) ainsi que la création de l'université des jeunes chercheurs (UJC, désormais maintenue difficilement par le Sidaction). Cette université est une formation intensive et enrichissante d'excellence qui a lieu tous les deux ans et dont les jeunes chercheurs francophones peuvent jouir et bénéficier. Il s'agit notamment de cours de la part des ténors francophones de la recherche sur le VIH/SIDA. Via AIDES, j'ai eu une faible activité au sein du COREVIH (un comité régional de lutte contre le VIH/SIDA et d'autres agents infectieux). J'ai par exemple participé à l'établissement de tests diagnostiques d'infections sexuellement transmissibles (IST, $\approx 30\%$ de découvertes d'au moins une IST) pour des cibles vulnérables, réalisé moi-même des orientations diagnostiques vis-à-vis de l'infection au VIH et participé à la création d'une brochure pour l'arrivée "locale" des autotests vis-à-vis du VIH-1/2 (cf. Annexe J, page 204). J'ai pu également collaborer sous la supervision de Jean-Marie Le Gall (AIDES), puis Daniela Rojas Castro (AIDES) et Marie Préau (GRePS) au projet de recherche en sciences sociales QualiPEP, qui grâce à des

entretiens semi-directifs et qualitatifs permet d'étudier les mécanismes permettant l'accès au traitement post exposition sexuelle vis-à-vis du VIH (cf. affiche Annexe K, page 211). Par mon action à AIDES, j'ai fais un cours passage au sein de la méta-association spécialisée vis-à-vis des traitements et de la recherche thérapeutique en lien avec les patients (TRT-5). C'est avec honneur que j'ai pu être le premier "jeune chercheur" financé par l'Agence National de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (**ANRS**) à pouvoir assister à son conseil scientifique. Dans tous les cas, ces expériences ont considérablement augmenté ma conscience des progrès thérapeutiques et biomédicaux qui ont eu lieu dans le domaine du VIH ces dernières années, tout en ayant conscience des freins sociétaux qui persistent. Je tenu à inclure un résumé de ces progrès ici (cf. 1.1.4, page 8), mais comme il n'est pas strictement pertinent pour une compréhension de mon travail de thèse, je l'ai inclus dans avec un autre interligne et une autre couleur afin de bien le délimiter du texte principal. Mais ce texte me semble riche en liens bibliographiques pertinents dans le domaine de la recherche sur le VIH/SIDA.

Annexe C

Plasmide pETDuet incorporant Rev et Imp β

Voici une carte du plasmide pETDuet initialement utilisé pour réaliser la co-expression et co-purification de Rev et Imp β :



Annexe **D**

Spectrométrie de masse ESI/MALDI avec $\text{Imp}\beta$

La qualité des échantillons d' $\text{Imp}\beta$ a ensuite été analysé par les techniques ESI et MALDI en spectrométrie de masse. Cette analyse a été faite par Luca Signor, ingénieur de recherche dans notre groupe.

Les résultats de la technique MALDI sont présentés dans la **Figure D.1**. Nous avons détecté $\text{Imp}\beta$ avec une ou deux charges ($(M + H)^+$ et $(M + H)^{2+}$). $\text{Imp}\beta$ est également présente de façon très visible sous forme de dimère $(2M + H)^+$. Ce dimère ne semble pas être un artefact lié à l'ionisation en phase gazeuse car $\text{Imp}\beta$ en gel filtration est présente également à environ 4% sous forme dimérique (voir les données de SEC/MALLS; 2.4.1, page 53).

La masse d' $\text{Imp}\beta$ mesurée en MALDI est un peu différente des 97170 Da attendus théoriquement (**Figure D.1**). L'écart de masse est d'environ 517 Da. Cela peut provenir de l'hydrolyse de résidus en partie N- ou C-terminale de la protéine, ou alors que le spectromètre de masse n'était pas parfaitement calibré à l'analyse de protéine de hauts poids moléculaires.

Nous avons également analysé $\text{Imp}\beta$ par la technique d'ionisation ESI-TOF qui permet d'obtenir une précision de masse supérieure comparée au MALDI (**Figure**

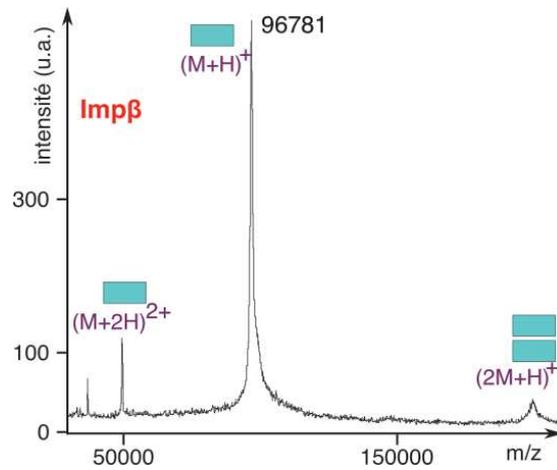
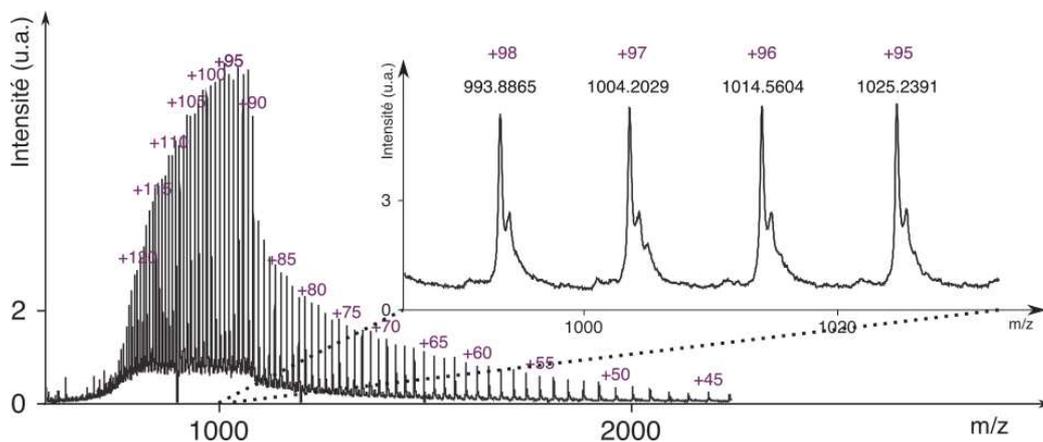


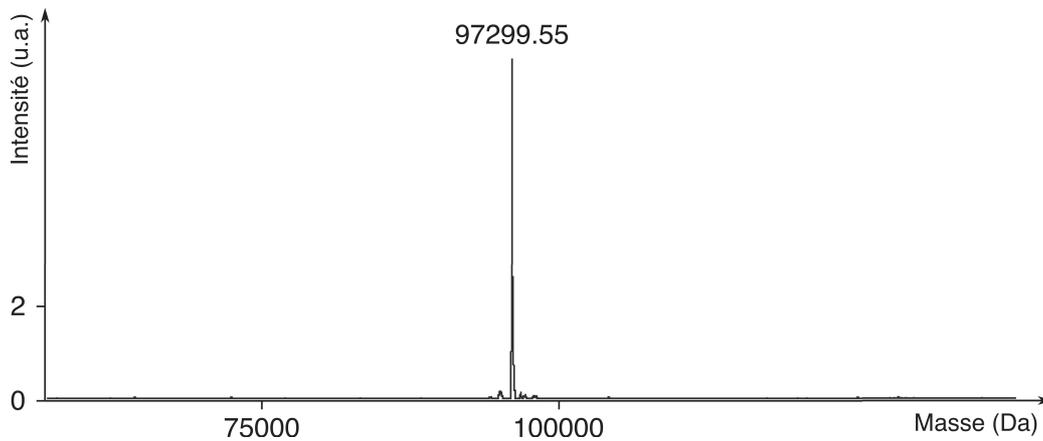
FIGURE D.1 – Spectres de masse MALDI-TOF d'Imp β . Les intensités relative du signal en fonction de la masse sur la charge (m/z) sont représentées. La masse mesurée est indiquée au niveau du pic principal. L'état d'ionisation de la protéine est indiqué en violet. En bleu sont représentés les formes monomériques et dimériques d'Imp β .

D.2 (a) et (b). Le spectre montre que la protéine est fortement chargée en ions (possibilité d'ajouter plus d'une centaine d'ions). Après déconvolution du spectre nous pouvons voir un $\Delta Masse$ entre la masse théorique et la masse observé d'Imp β de 1 Da (soit 13 ppm), ce qui confirme que la protéine est intacte et n'a pas subi de dégradation.

En conclusion, ce nouveau protocole permet de récupérer Imp β avec un haut degré de pureté (>99%) et en quantité suffisante pour pouvoir réaliser des études biophysiques et structurales.



(a) Spectre brut



(b) Spectre déconvolué

FIGURE D.2 – Spectres de masse ESI-TOF d'Imp β . (a) Spectre brut. Un zoom sur une partie du spectre est présenté et les différents états de charge de la protéine sont indiqués en violet. (b) Spectre déconvolué. La valeur au-dessus du pic correspond à la masse moléculaire mesurée d'Imp β . u.a. : unité arbitraire

Annexe **E**

Spectrométrie de masse ESI/MALDI avec Rev

Comme contrôle de qualité, nous avons analysés les échantillons de Rev par les techniques ESI et MALDI en spectrométrie de masse. Les résultats de la technique MALDI sont présentés dans la **Figure E.1**. Rev^{V16D/I55N} est détecté principalement sous forme monomérique. Une forme dimérique est aussi détectée, mais l'intensité du signal est très faible. L'écart de masse ($\Delta masse$) mesuré de Rev est de 2 Da soit une erreur de 138 ppm.

Les spectres obtenus en ESI de Rev sont montrés dans les **Figures E.2 (a) et (b)**. Sur le spectre brut, Rev est détectée sous forme ionisée, avec entre 5 et 22 charges positives (Figure D.2 (a)). Le spectre déconvolué donne un $\Delta Masse$ pour Rev^{V16D/I55N} de 0.12 Da (9 ppm ; **Figure E.2 (b)**). Un zoom du spectre déconvolué sur la partie où se trouve Rev, révèle la présence d'autres espèces minoritaires. Ces espèces sont cohérentes avec l'ajout d'une molécule de β -mercaptoéthanol ou d'une à trois molécules d'acide trifluoroacétique (TFA, 114.02 g.mol⁻¹ ; **Figure E.2 (b)**, en vert et rouge). Ces résultats confirment que la protéine Rev obtenu par notre protocole de purification est intact et de haute qualité.

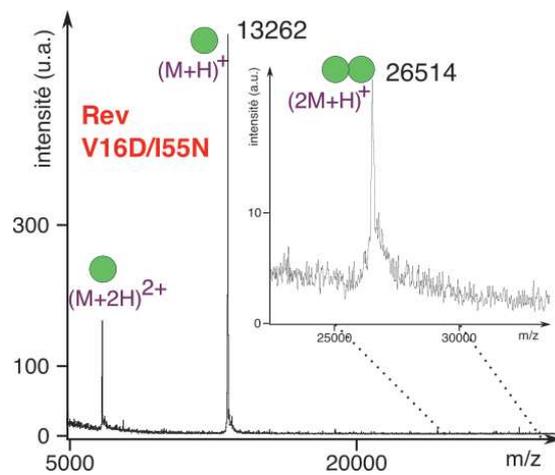
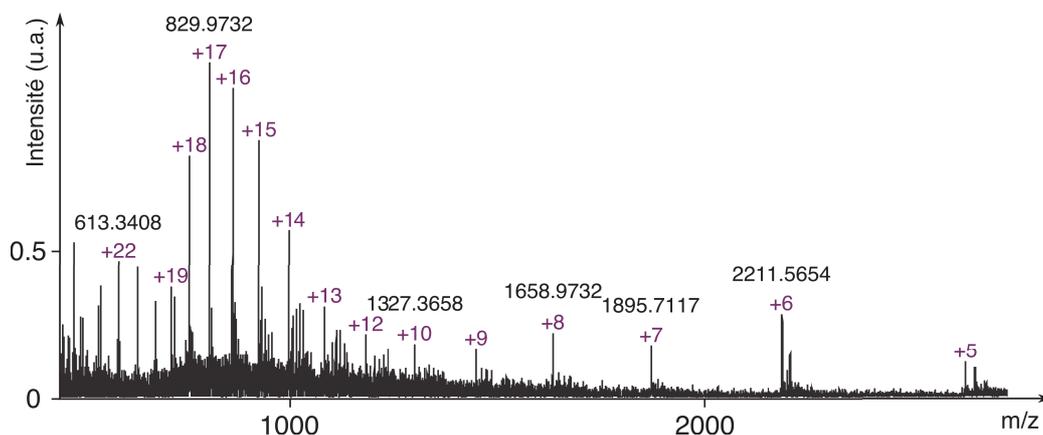
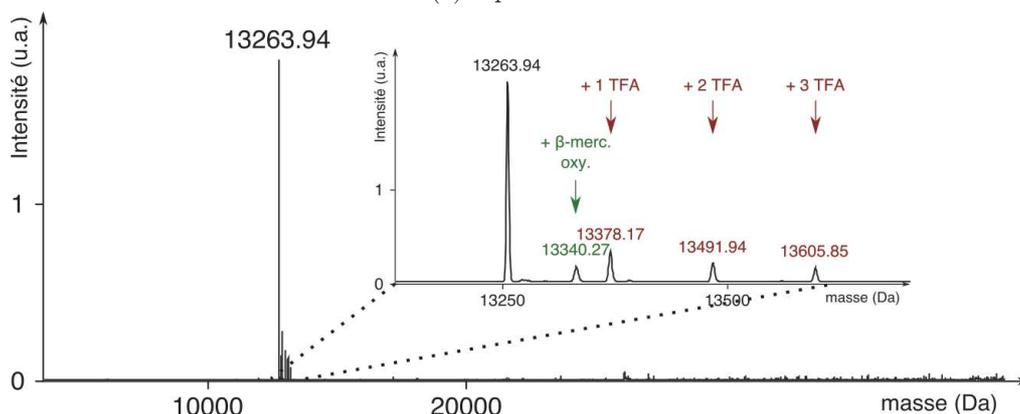


FIGURE E.1 – Spectre de masse MALDI-TOF de Rev. Les intensités relatives du signal en fonction de la masse sur la charge (m/z) sont représentées. La masse mesurée est indiquée au niveau du pic principal. L'état d'ionisation de la protéine est indiqué en violet. En vert est représentée Rev qui est principalement présent sous forme monomérique. L'image de droite montre le zoom d'une région du spectre de masse qui montre Rev sous forme dimérique (entre 25 et 30 kDa).



(a) Spectre brut



(b) Spectre déconvolué

FIGURE E.2 – Spectres de masse ESI-TOF de Rev^{V16D/I55N} (a) Spectre brut de Rev^{V16D/I55N} en ESI-TOF. En ordonnée est représentée l'intensité relative des différents pics. Les différents états de charge de la protéine sont représentés en violet. (b) Spectre déconvolué. Un zoom est réalisé autour du pic déconvolué correspondant à Rev. En vert correspond un pic ayant une masse en plus de 76 Da et pouvant correspondre à l'oxydation d'une molécule de β -mercaptoéthanol sur la protéine. En rouge des augmentations successives de 114 Da pouvant correspondre à des additions de TFA présent lors de l'acquisition de ces spectres.

Microscopie électronique d'Imp β

Imp β seule était difficilement visible sur les micrographes, le signal que nous voyons correspondait principalement à du bruit de fond (**Figure F.1**). Potentiellement, cela pourrait provenir de la faible thermostabilité d'Imp β et d'un dépliement de la protéine provoqué par l'agent de contraste utilisé (l'acétate d'uranyl). Cette hypothèse a été confirmée par la suite par Francesca lorsqu'elle a construit et analysé une protéine chimérique constituée d'Imp β fusionnée à une enzyme : la glutamine synthétase. Alors que la partie correspondant à glutamine synthétase était facilement visible dans des micrographes (car cette enzyme s'oligomérisait en dodécamère caractéristique), la partie correspondant à Imp β était invisible.

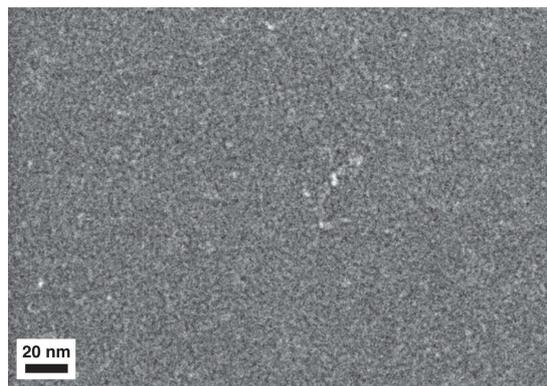


FIGURE F.1 – **Micrographe d'Imp β** . Cliché de microscopie électronique obtenu avec Imp β seule. Fourni par Francesca Coscia

Annexe G

Imp β 493 QEE > AAA

Nous pouvons voir sur la **Figure G.1** qu'il existe un équilibre dynamique d'Imp β 493 QEE > AAA entre sa forme dimérique et monomérique. En effet, en prenant la fraction de gel filtration correspondant à la version dimérique et en la réinjectant sur la colonne de gel filtration 1h ou 40h après purification initiale, nous pouvons constater que la forme dimérique d'Imp β décroît au profit d'une augmentation de la forme monomérique.

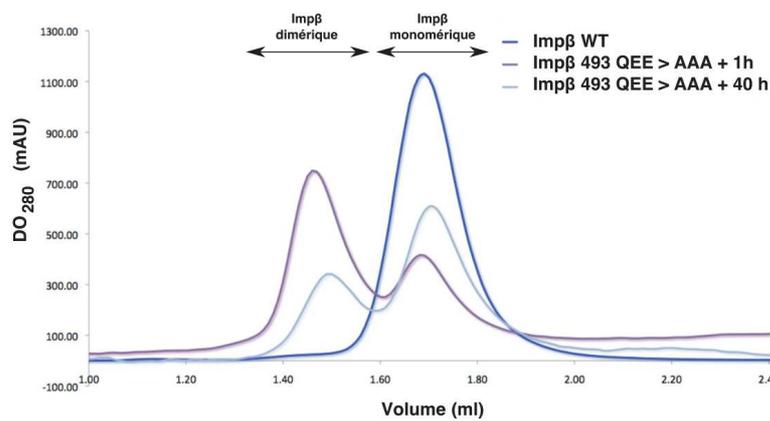


FIGURE G.1 – **Tendance d'Imp β 493 QEE > AAA à dimériser.** Chromatogrammes superposés d'Imp β WT ou de la fraction de la protéine mutée dimérique au cours du temps (1h et 40h après gel filtration).

Annexe H

Tableau de mes plasmides

Voici une liste de tableaux des plasmides que je possédais à l'IBS ^{1 2 3 4 5 6 7 8} :

NUMÉRO DE BOITE	COORDONNÉES	PLASMIDE	MARQUEUR DE SÉLECTION	PROMOTEUR	PROTÉINE-S CODÉE-S	CONCENTRATION (ng/μl)
1	A 1	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Tat86/Impβ	112
1	A 2	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Rev70-L12S/Impβ col1	226.5
1	A 3	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Rev-L60R/Impβ	108.7
1	A 4	pMIP2	Kana	T7	His-TEV-CCDB -- For FX Cloning	32.6
1	A 5	pMIP1	Kana	T7	His-GFP-TEV-Tat86	?
1	A 6	pQE60	Ampi	?	Impβ	134
1	A 7	pMIP1	Kana	T7	His-GFP-TEV-Tat40-86	?
1	A 8	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Tat86	87.5
1	A 9	pETDuet	Ampi	T7	His-Tev-Rev116/ImpB	?
1	B 1	pMIP1	Kana	T7	His-GFP-TEV-Rev116	?
1	B 2	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Rev70-L12SL60R/Impβ col 4.1	171.1
1	B 3	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Rev70-L12SL60R/Impβ col 4.2	153.4
1	B 4	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Rev116/Impβ	154.5
1	B 5	pMIP2	Kana	T7	His-TEV-Impβ	88.1
1	B 6	pUC19	Ampi	T5	-	0.01

-
1. ? : inconnu-e
 2. -TEV- : Site de cleavage à la protéase TEV
 3. h : humaine
 4. m : de souris (*mouse*)
 5. His : étiquette poly-histidine (6x)
 6. AmpI : Ampicilline
 7. Kana : Kanamycine
 8. FX cloning fait référence à la stratégie de clonage (Geertsma and Dutzler, 2011)

NUMÉRO DE BOITE	COORDONNÉES	PLASMIDE	MARQUEUR DE SÉLECTION	PROMOTEUR	PROTÉINE-S CODÉE-S	CONCENTRATION (ng/µl)
1	B 7	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD2BD1	220.5
1	B 8	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD2BD2	269
1	B 9	pHARRO1	Ampi	T7	hBRF1	215
1	C 1	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD7	219
1	C 2	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD3BD1	216
1	C 3	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD8	236
1	C 4	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD3BD2	180
1	C 5	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD4BD1	40
1	C 6	pHARRO1	Ampi	T7	hBRDT	172
1	C 7	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD4BD2	56
1	C 8	pHARRO1	Ampi	T7	mBRDTBD1	20
1	C 9	pHARRO1	Ampi	T7	mBRDTBD2	30
1	D 1	pHARRO1	Ampi	T7	hBRD1	239
1	D 2	pHARRO1	Ampi	T7	hRSCABD1	183
1	D 3	pHARRO1	Ampi	T7	hTAFBD2	169
1	D 4	pHARRO1	Ampi	T7	hRAZ1B	235
1	D 5	pHARRO1	Ampi	T7	hPHIPBD1-2	163
1	D 6	pHARRO1	Ampi	T7	hTAFBD1	199
1	D 7	pMMIP3	Kana	T7	His-MBP-TEV-CCDB -- For FX Cloning	57
1	D 8	pMMIP4	Kana	T7	His-GFP-TEV-CCDB -- For FX cloning	98
1	D 9	Boite	Kana	T7	His-GFP-TEV-Rev116-I55N	57
1	E 1	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Rev116V16DI55N	85
1	E 2	pMIP1	Kana	T7	His-GFP-TEV-Rev116V16DL60R	63
1	E 3	pMIP1	Kana	T7	His-GFP-TEV-Rev116V16DL60R	60
1	E 4	pMIP1	Kana	T7	His-GFP-TEV-Rev70-V16DL60R	76
1	E 5	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Rev70-V16DI55N	74
1	E 9	pETDuet	Ampi	T7	His-TEV-Rev116-I55N	96

NUMÉRO DE BOITE	COORDONNÉES	PLASMIDE	MARQUEUR DE SÉLECTION	PROMOTEUR	PROTÉINE-S CODÉE-S	CONCENTRATION (ng/µl)
1	F 1	pQE60	Ampi	T5	Untag-ImpB	200
1	F 2	pQE60	Ampi	T5	Untag-ImpB	100
1	F 3	pQE60	Ampi	T5	Untag-ImpB	171
1	F 4	pQE60	Ampi	T5	Untag-ImpB	79.7
1	F 6	pRDP	Kana	CMV	Rev116-RFP	500
1	F 7	pRFP	Kana	CMV	Rev116-RFP	50
1	G 4	pMIP1	Kana	T7	Rev116WT	54
1	G 5	pETDuet	Ampi	T7	ImpB/Rev116WT	54
1	G 6	pMIP1	Kana	T7	Rev116WT	44
1	G 8	pMIP2	Kana	T7	His-TEV-ImpB	8
1	G 9	pQE60	Ampi	T7	ImpB	51
1	H 2	pMIP1	Kana	T7	Rev116 WT	48.6
1	H 4	pMIP1	Kana	T7	Rev116 WT	44.5
1	H 6	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev116WT	53
1	H 8	pUC57	Ampi	?	Linker G/S-BamH1-TEV-BamH1-G/S	200
1	H 9	pUC57	Ampi	?	Linker G/S-BamH1-TEV-BamH1-G/S	217
1	I 1	pRFP	Kana	CMV	Rev116V16D-RFP	107
1	I 2	pRFP	Kana	CMV	Rev116V16DI55N	599
1	I 3	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev116-L12SL18QI59DL60D	30
1	I 4	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev116-V16DI55N	77
1	I 5	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev116-V16DI55N	79.7
1	I 6	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev116-L12SL18QI59DL60D	78.2
1	I 7	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev1-69_V16DI55N	32
1	I 8	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev4-69_V16DI55N	67
1	I 9	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev9-69_V16DI55N	47
2	1	pMIP2	Kana	T7	His-TEV-Impβ 185KEE->AAA	40
2	2	pMIP2	Kana	T7	His-TEV-Impβ 213KEE->AASA	37
2	3	pMIP2	Kana	T7	His-TEV-Impβ 493QEE->AAA	110
2	19	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev-V16DI55N 4-82	28
2	20	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev-V16DI55N 9-74	32
2	21	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-Rev-V16DI55N 12-82	36
2	37	pET28a	Kana	T7	His-GB1-TEV-REV116V16DI55N Nterm HA	45

Annexe I

Design des Amorces utilisées

NOMS	SÉQUENCES
Rev-BH1-mut-for	CTATTTCTGAACGGATGCTTAGCACTTATCTG
Rev-BH1-mut-rev	CAGATAAGTGCTAAGCATCCGTTCAGAAATAG
His-removing-For	GATTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAGCTGATCACCATTCTC
His-removing-rev	GAGAAATGGTGATCAGCTCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAATC
Nco1-Rev-For	CATGCCATGGCTGGTCTGTTCTGG
Rev-unstop-L-re	GAAAATAAAGATTCTCGCTCCTTCTTTAGTTCCTGACTCCAATATTG
Rev116-mut-for	CTATTTCTGAACGGATTCTTAGCACTTATCTG
Rev116-mut-rev	CAGATAAGTGCTAAGAATCCGTTCAGAAATAG
Rev-unstop-fo	CAATATTGGAGTCAGGAACTAAAGAAGGCAGCGAGAATCTTTATTTTC
L-Nco1-ImpB-rev	CCATGGAGCTGCCGCCCTGAAAATAAAG
BsrG1-ImpB-For	ACTTATGTACAGCATTGGGAAG
ImpB-L-R-stop-R	CTGAAAATAAAGATTCTCGCTGCCAGCTTGGTCTTTCAGTTTCCTCAG
ImpB-L-for-stopR	CTGAGGAACTGAAGAACCAAGCTGGCAGCGAGAATCTTTATTTTCAG

NOMS	SÉQUENCES
L-Rev-reverse	GTCTAGGGTCGACTGGTTCATGCTGCCGCCCTGAAAATAAAGATTCTC
L-Rev-For	GAGAATCTTTATTTTCAGGGCCGAGCATGGAACAGTCGACCCCTAGAC
Rev-2stop-sac	TTTGCGGCCGCGAGCTCTCACTATTCCTTAGGACCTGTCCG
Rev116to70-for	GACGATCTGCGGAGCCTTAGTAACCTCAGTACCACCGCTTGAG
Rev116to70-rev	CTCAAGCGGTGGTAGCTGAAGTTACTAAGGCTCCGAGATCGTC
RevV16D-for	GAAGAACTGATTGTCACCGATCGTCTGATTAAGTGC
RevV16D-rev	GCAGTTAATCAGACGATCGGTACGAATCAGTTCTTC
RevI55NR60L-for	CGTCAAATTCATTCTAATTCGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACG
RevI55NR60L-rev	CGTCCCAGATAAGTGCTAAGGATCCGTTCAAGAATTAGAATGAATTTGACG
ImpB-185KEE-AAAf	CTAGCTCACATTACTAGGTGCTGCTGCCCTATCCCTGGATTATGGCAG
ImpB-185KEE-AAAr	CTGCCATAATCCAGGGGATGAGGGCAGCAGCACCTAGTAATAATGTGAAGCTAG
ImpB-493QEE-AAAf	GCAGTAAGTAGTGGTGTGCCGCATCATCAGCAACGCTGTCAGCTTCATA
ImpB-493QEE-AAAr	TATGAAGCTGCAGACGTTGCTGATGATGCGGCAGCACCAGTACTACTGC
ImpB213KESEAASAf	TGCATAATAAAGTCCCTTGACAGCGCTGCATCAAAGTTTGCTTTGGTGAATCCAATGAGTTC
ImpB213KESEAASAr	GAACTCATTGGAGTTCACCAAAGCAAACCTTTGATGACGCTGCAAGGCACTTTATTATGCA
Rev116HANterm-F	CGAAAATCTGTACTCCAGGGTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGCTGGTCTTCTGGTG
Rev116HANterm-R	CACCAGAACGACCAGCCATAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAACCTGGAAGTACAGATTTTCG
Rev116HACterm-F	CAATATTGGAGTCAGGAACCTAAAGAATACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTAGCTCGAGCACCACCAC
Rev116HACterm-R	GTGGTGGTCTCGAGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAATCTTAGTCTGACTCCAATATTG
Rev9-69HANterm-F	CGAAAATCTGTACTCCAGGGTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGATGAAGAAGTATTCTGACCGATC
Rev9-69HANterm-R	GATCGGTACGAATCAGTCTTCTATCAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAACCTGGAAGTACAGATTTTCG
Rev9-69HACterm-F	GGGACGATCTGCGGAGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTGATAACCTCTCAGTACCAC
Rev9-69HACterm-R	GTGGTAGCTGAAGAGGTTATCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAACCTCCGAGATCGTCCC
FXImpF	ATATATGCTCTTCTATGGAGCTGATCACATTCTCG
FXImpBR	ATATATGCTCTTCTATGGAGCTGATCACATTCTCG
Rev_L12S_F	CTGGTGATTCTGATGAAGAATCGATTGTCACGTTCTGCTGA
Rev_L12S_R	TCAGACGAACGGTACGAATCGATTCTTATCAGAATCACCAG
Rev_L60R_F	CTATTTCTGAACGGATCCGTAGCACTTATCTGGGACG
Rev_L60R_R	CGTCCCAGATAAGTGCTACGGATCCGTTACAGAAATAG
Rev_L18Q_F	CTGATTCTGACCGTTCTGATGATTAAGTCTGATCAA
Rev_L18Q_R	TTGATACAGCAGTTAATCTGACGAACGGTACGAATCAG
Rev_I55N_F	TGAACGTCAACGTCAAATTCATTCTAATCTGAAACGGATCC
Rev_I55N_R	GGATCCGTTCAAGATTAGAATGAATTTGACGTTGACGTTCA

Autotests vis-à-vis du VIH

Ce guide a été établi dans un but de planifier localement l'arrivée des autotests dirigés pour l'orientation diagnostique de l'infection par le VIH-1/2 grâce au travail collégial et la supervision du COREVIH Arc-Alpin.^{1 2}



1. Travail effectué en grande partie par Paul-Emmanuel Devez, Jonathan Quard, Etienne Raimondeau, Elodie Guillois, Alain Poensin, Marianne Hauzanneau, Nicolas Charpentier.

2. Le bureau du COREVIH a souhaité démocratiquement citer que le nom du graphiste ayant réalisé le livret en creative commons : Etienne Raimondeau, jeune chercheur et surtout ami depuis 2007.

Sommaire

Quelle prise en charge en cas de test positif ? page 4

- Répertoire des lieux de prise en charge médicale sur l'arc alpin et à Genève page 8

Vivre avec le VIH, ça veut dire quoi aujourd'hui ? page 12

La séropositivité, à qui en parler ? page 16

- Répertoire des associations de soutien aux personnes séroconcernées page 20

Autotest VIH: et si mon test est négatif ? page 22



COREVIH Arc Alpin
CHU de GRENOBLE - CS 10217
38043 GRENOBLE Cedex 09
Tél : 04 76 76 61 62
Courriel : coreviharc alpin@chu-grenoble.fr

Cette brochure a été réalisée par le COREVIH arc alpin, dans le cadre de sa Commission Prévention et Dépistage.
Maquette : Etienne Raimondeau.
Tirage : 6000 exemplaires, Novembre 2014.



2

3

Quelle prise en charge en cas de test positif ?



4

Un autotest positif qu'est-ce que cela signifie ?

Cela signifie que vous êtes très probablement infecté-e par le VIH (virus responsable du SIDA).

Ce premier résultat doit être confirmé par une prise de sang (sérologie) réalisée en laboratoire, en centre de dépistage (appelé CDAG ou CIDDIST) ou à l'hôpital.

Les résultats de cet examen sanguin vous seront donnés par un médecin quelques jours après le prélèvement. En attendant ce résultat, vous pouvez utiliser un préservatif masculin ou féminin lors de vos rapports sexuels, même en cas de sexe oral, pour éviter de transmettre ce virus.

Quelle prise en charge en cas de test positif ?

5

Etre séropositif qu'est-ce que cela signifie ?

Une sérologie confirmée positive signifie que vous êtes porteur du virus de l'immunité humaine (VIH).

Etre séropositif-ve ne veut pas dire que vous avez le SIDA ou que vous le développerez un jour.

Etre séropositif-ve signifie que vous pouvez transmettre le virus si vous avez des pratiques sexuelles sans préservatifs, si vous partagez du matériel de consommation de produits psychoactifs (seringues, pailles de snif, ...) ou si vous n'avez pas de traitement contre le VIH.

Si vous êtes séropositif-ve, vous serez orienté-e vers un médecin spécialiste pour bénéficier d'une prise en charge médicale et d'un traitement anti-VIH.



Un traitement efficace contre le VIH permet une espérance de vie presque identique à celle d'une personne séronégative. Ce traitement réduit fortement le risque de transmission du VIH à son ou ses partenaire(s) et permet d'avoir un enfant sans risque de transmission à celui-ci.

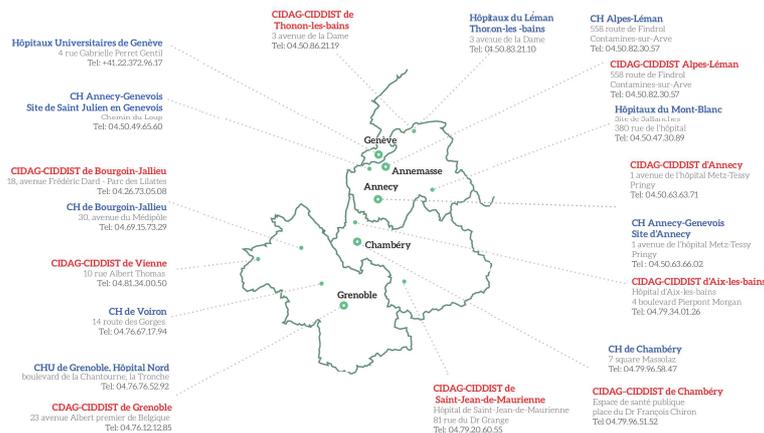
6

Quelle prise en charge en cas de test positif ?

7

Répertoire des lieux de prise en charge médicale sur l'arc alpin et à Genève

Centres hospitaliers où confirmer une infection VIH et commencer sa prise en charge médicale
Centres de dépistage pouvant confirmer une infection VIH



A Genève, vous pouvez trouver les adresses des centres de dépistages où faire confirmer une infection VIH sur le site : www.infotestvih.ch

8

Quelle prise en charge en cas de test positif ?

9

La première consultation avec le médecin spécialiste

Lors de votre première consultation avec le médecin spécialiste, vous ferez le point avec lui :

- Il effectuera un examen clinique complet. C'est-à-dire la mesure du poids, de la taille, la prise de la tension artérielle, la palpation abdominale, l'auscultation cardio-pulmonaire, la recherche de ganglions, l'examen de la bouche qui permet d'évaluer l'état buccodentaire et l'examen des organes génitaux pour rechercher d'éventuelles lésions.
- Il vous prescrira aussi un bilan biologique et des examens complémentaires afin d'analyser le type de virus en cause, d'évaluer le retentissement de l'infection VIH sur votre organisme et de diagnostiquer d'éventuelles autres infections (hépatites, syphilis, tuberculose ...).
- Vous pourrez également vérifier votre situation sociale et, si vous ne bénéficiez pas de couverture sociale, trouver une solution de prise en charge de vos soins.

A l'issue de ce bilan, le médecin vous proposera un suivi adapté et discutera avec vous du début d'un traitement antirétroviral.

10

Les bénéfices du traitement pour tous

Il est désormais recommandé de proposer le traitement antirétroviral à toutes les personnes vivant avec le VIH quel que soit leur état de santé, à la fois pour des raisons de santé individuelle et de prévention de la transmission du virus.

En primo-infection, c'est-à-dire dans les premières semaines qui suivent l'infection, il est conseillé de mettre en place le traitement dès le diagnostic.

L'objectif principal du traitement contre le VIH est d'empêcher la progression de l'infection vers le sida. Il permet d'avoir la même espérance de vie que tout un chacun en maintenant les défenses immunitaires de la personne et d'améliorer ou préserver sa qualité de vie. Pour atteindre ce but et diminuer les effets du VIH, le traitement doit rendre la quantité de virus dans le sang indétectable.

Commencer le traitement contre le VIH dès le diagnostic permet de diminuer fortement le risque de transmission du VIH, et ça c'est de la prévention !

Mais attention, le traitement du VIH ne protège pas des autres infections sexuellement transmissibles (IST) ni des hépatites.

Quelle prise en charge en cas de test positif ?

11

**Vivre avec le VIH,
ça veut dire quoi
aujourd'hui ?**



12

5 idées fausses sur la vie avec le VIH

! idée fausse

“C'est de ma faute, je suis nul-le de m'être contaminé-e”

Bien sûr que non ! Il s'agit d'une épidémie et vous n'avez aucune raison de vous sentir coupable. 7000 à 8000 personnes se contaminent chaque année et aujourd'hui en France 150 000 personnes vivent avec le VIH.

! idée fausse

“Je n'ai plus que quelques années à vivre”

C'est totalement infondé. Grâce aux traitements, l'espérance de vie des personnes vivant avec le VIH tend à rejoindre celle de la population générale. Donc, vous avez beaucoup d'années de vie devant vous.

Vivre avec le VIH, ça veut dire quoi aujourd'hui ?

13

 **idée fausse**

“Avec les traitements, ma vie sera invivable”

Finis les traitements anti-VIH lourds et les 20 pilules par jour : les traitements sont plus simples, plus efficaces et mieux tolérés. Une ou deux prises par jour, avec un choix de médicaments qui permet de trouver ceux qui conviennent.

 **idée fausse**

“Je devrai aller à l'hôpital tous les mois”

Pas nécessairement, cela varie généralement entre 3 à 6 mois, même si à certains moments ça peut être plus fréquent (notamment au début du traitement, pour vérifier que tout se passe bien). Par contre si vous le souhaitez, il peut aussi vous être proposé un suivi rapproché pour vous aider dans cette prise de traitement au départ. On peut aussi, parfois, être suivi en médecine de ville.

14

 **idée fausse**

“Je vais finir seul et sans enfant”

Parce que vous pensez que l'amour dépend du statut sérologique ? Il y a le traitement comme prévention, c'est une des grandes révolutions de la lutte contre le VIH. Le traitement du VIH réduit la quantité de virus et donc diminue fortement les risques de contamination. On estime désormais que le traitement, s'il est pris correctement, est un outil préventif aussi efficace que le préservatif. Ne pas s'interdire de tomber amoureux, d'avoir une sexualité épanouie, ne plus craindre que le préservatif craque, faire un enfant comme les autres : ça change tout. Avec les progrès de la médecine, concevoir naturellement un enfant, qui ne sera pas infecté, est possible.

Vivre avec le VIH, ça veut dire quoi aujourd'hui ?

15

A qui en parler ?



16

Quelques idées à méditer

Déramatisez ! Ne rentrez pas, dès l'annonce, dans la peau d'un malade.

Votre vie ne s'arrête pas avec la découverte de votre séropositivité : être séropositif-ve aujourd'hui, ce n'est plus comme à l'époque du film Philadelphia. C'est grave uniquement si l'on n'est ni suivi ni traité.

Mais lorsqu'on apprend sa séropositivité, il peut être important d'avoir du soutien, et de ne pas rester seul-e face à cette découverte.

A qui en parler ?

17

Pour éviter que l'information ne vous échappe, prenez quelques instants pour réfléchir aux personnes à qui en parler. Identifiez des proches (amis, parents, frères, sœurs), en qui vous avez confiance, qui pourraient vous soutenir et éventuellement vous accompagner pour la suite des démarches. En effet, si médicalement le vécu avec le VIH a grandement changé, le regard que porte la société sur les personnes séropositives peut être toujours lourd à supporter.

Votre statut sérologique vous appartient, vous n'avez aucune obligation de le révéler au travail.

Si vous avez un-e partenaire régulier-e et même si ça peut être compliqué à dire, il est important de trouver les ressources pour lui en parler afin qu'il-elle fasse le test, et, si ce n'était pas déjà le cas, que vous protégiez vos rapports sexuels dans l'attente de son résultat. Si vos rapports sexuels avec cette personne remontent à moins de 48h, vous pouvez aussi lui indiquer d'aller aux urgences de l'hôpital chercher un traitement d'urgence contre le VIH (cf. adresses des hôpitaux pages 8 et 9).

Avec les partenaires occasionnels ou les personnes avec qui vous avez échangé du matériel (seringue, etc.) vous pouvez, sans forcément parler de votre test positif, les inciter à faire aussi un test (en prétextant un test douteux pour vous, ou alors un autre de vos partenaires qui aurait pris un risque par exemple).



En plus des équipes médicales pluridisciplinaires (médecins, psychologues, assistantes sociales...) qui suivent les personnes séropositives, des associations de lutte contre le VIH et de soutien aux personnes séropositives sont là pour vous soutenir et éventuellement vous accompagner dans vos démarches, vous et vos proches en Isère, Savoie, Haute-Savoie et sur le canton de Genève. Vous trouverez le répertoire des associations en page suivante.

Répertoire des associations de soutien aux personnes séroconcernées

AIDES, Association de lutte contre le VIH et les hépatites virales. AIDES propose du dépistage communautaire
www.aides.org

04.50.83.48.28 ou 06.01.20.10.09
13 avenue Emile Zola
Cité de la solidarité internationale
Annemasse

06.14.50.47.97
256 chemin des moulins
Quartier de mérande
Chambéry

04.76.47.20.37
8 rue du Sergent Bobillot
Grenoble

TEMPO, personnes vivant avec le VIH et leur entourage
www.astempo.fr
04.76.03.16.43
13 rue Gay Lussac
Grenoble

PVA Genève, personnes vivant avec le VIH/sida et leurs proches

www.pvagenève.ch
+41.22.732.44.45
35 rue des Pâquis
Genève

Groupe sida Genève, antenne régionale de l'Aide suisse contre le sida

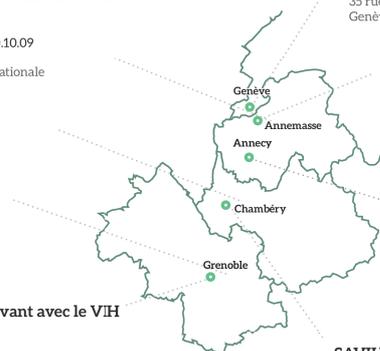
www.groupesida.ch
+41.22.700.15.00
9 rue du Grand-Pré
Genève

ARAVIH, Association Réseau Annécien Ville Hôpital autour du VIH et des Hépatites

www.araviv.fr
04.50.63.60.71
Annecy, Centre hospitalier de la région d'Annecy
Service des maladies infectieuses
1 avenue de l'hôpital Metz-Tessy
Pringy

SAVIHEP, Savoie Vih HEPatites et ist

www.savihep.org
04.79.36.42.12
256 chemins des moulins
Quartier de mérande
Chambéry



Autotest VIH : et si mon test est négatif ?

Cela signifie que vous n'êtes pas infecté par le VIH, mais attention ce résultat n'est valable que si vous n'avez pas eu de pratiques à risque depuis 3 mois.



A savoir : dès 6 semaines après un risque, vous avez la possibilité de vous faire dépister par prise de sang en laboratoire ou en CIDAG/CIDDIST (cf. adresses pages 8 et 9).

Si vous avez un doute, pensez au préservatif masculin ou féminin avec votre (vos) partenaire(s) jusqu'au prochain dépistage.

Il existe un traitement post exposition (TPE) à commencer dans les 48h après un risque (au mieux dans les 4h). Il est disponible dans les services d'urgence où un médecin évaluera avec vous le risque pris et l'intérêt de vous prescrire ce traitement d'urgence. N'hésitez pas à venir avec votre (vos) partenaire(s).

D'autres infections sexuellement transmissibles (syphilis, gonocoque, chlamydiae, herpès, papillomavirus, etc.) et les hépatites peuvent passer inaperçues car elles provoquent parfois peu de symptômes... La plupart d'entre elles se soignent facilement mais, non traitées, elles peuvent entraîner des complications et fragilisent les muqueuses, ce qui augmente le risque d'infection par le VIH.

Lorsqu'on a plusieurs partenaires, il est recommandé de dépister de manière régulière ces IST.

Faire ses dépistages (du VIH ou des IST) c'est prendre soin de soi et des autres. C'est pourquoi recommencez quand vous voulez, au moins un fois par an !

Étude scientifique QualiPEP

Voici l'affiche de l'étude scientifique QualiPEP dont j'ai été un des acteurs portant le projet depuis le début et dont l'affiche et le flyer ont été réalisés par mes soins sous les conseils d'autres collaborateurs : Sabrina Roduit, Nicolas Charpentier et Jonathan Quard.



