

Université de Lille 1-Sciences et Technologies

Ecole Doctorale Biologie Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Discipline *Biochimie*

Présentée et soutenue publiquement par

Marie DUJARDIN

Le 25 septembre 2015

Etude des relations structurales et fonctionnelles entre le domaine 2 de la protéine NS5A du virus de l'hépatite C et la Cyclophiline A humaine

Directeur de thèse

Xavier HANOULLE

JURY

Docteur Malene Ringkjøbing Jensen	Rapporteur
Professeur Johan Neyts	Rapporteur
Docteur François Penin	Examineur
Docteur Jean Dubuisson	Examineur
Docteur Guy Lippens	Invité
Docteur Xavier Hanouille	Directeur de Thèse

Remerciements

Ces trois années de thèse furent pour moi une expérience très enrichissante tant au niveau scientifique, professionnel et humain. J'aimerais adresser mes remerciements à l'ensemble des personnes ayant participé à ce travail.

Tout d'abord, au Dr Malène Ringkjøbing Jensen, au Pr Johan Neyts, au Dr François Penin et au Dr Jean Dubuisson, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de s'investir et d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr Guy Lippens pour m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant dans son équipe. Je tiens à le remercier pour tous ses conseils et observations sur mon travail de thèse, ainsi que pour son investissement dans diverses étapes de ce travail.

Je ne remercierai jamais assez le Dr Xavier Hanoulle de m'avoir encadrée depuis le Master. Merci pour ta très grande disponibilité, ton soutien, ton enthousiasme et ton aide précieuse. Tu as été un véritable « coach » tout au long de ce travail et je te dois tous mes progrès en biochimie structurale et biologie moléculaire.

Je remercie le Dr Caroline Smet-Nocca dont les cours de biologie structurale m'ont donné l'envie de réaliser une thèse dans ce domaine et dans cette équipe.

Je remercie le Dr Isabelle Landrieu pour ces encouragements et la bonne humeur qu'elle fait régner dans le laboratoire.

Je remercie le Dr Robert Schneider pour son aide dans la compréhension de différents problèmes de RMN.

Je remercie le Dr Isabelle Huvent pour sa sympathie, pour avoir partagé avec moi ses connaissances en biologie moléculaire, pour son soutien et pour tous les conseils qu'elle m'a donnés.

Un grand merci à François Xavier Cantrelle et Hélène Launay pour leur aide, le temps qu'ils m'ont consacré, pour les moments passés au bunker ou au 900 MHz et pour mon apprentissage de la RMN.

Je remercie Julie Bouckaert de m'avoir initiée à la cristallographie des protéines et d'avoir contribué à ce travail en cristallographie. Je remercie également Prakash Rucktooa qui m'a beaucoup aidé pour la résolution de la structure du complexe CypA-Alisporivir.

Je remercie Haoling Qi et Luiza Mamigonian-Bessa qui ont su me supporter dans le bureau lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci pour votre gentillesse et votre soutien psychologique. J'espère n'avoir pas été trop stressante lors du dernier sprint final de la rédaction de ce manuscrit. Bonne chance pour votre thèse.

Un très grand merci aux nouveaux docteurs Amina Kamah et Juan Lopez. Merci pour votre sens de l'humour et vos discussions qui m'ont rassurée.

J'adresse également toute ma sympathie et remerciements aux autres membres du groupe, Idir Malki, Arnaud Leroy, Clément Desprès, Pauline Bellanger, Emmanuelle Boll ainsi qu'aux anciens membres de l'équipe Hélène Launay, Puneet Ahuja, Morkos Henen, et Riccardo Peruzzini.

Je remercie les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, Gaëlle Montfils et Ekoué Logossa. Bien que vous soyez restés peu de temps, vous avez soulevé des interrogations et m'avez aidé à la réalisation de clonages et à la production de protéines.

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes avec qui j'ai pu travailler durant le monitorat: Xavier Roussel, Christophe Marillier, Frédéric Chirat, Florence Delplace, Sophie Groux-Deroote, ainsi que Renaud Léonard et Catherine Robbe-Masselot.

Je remercie tous les membres de l'UGSF et de l'IRI pour leur accueil.

J'aimerais remercier les membres de mon comité de suivi de thèse les Dr Malène Ringkjøbing Jensen, Dr Jean Dubuisson, Dr Françoise Jacob-Dubuisson, Dr Guy Lippens, et Dr Xavier Hanouille. Merci à eux pour leur écoute, leur temps et leurs conseils judicieux.

Tout ceci n'aurait pu être possible sans le soutien, l'aide et la patience de mes parents, qu'ils trouvent dans cette thèse l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon affection. La Cyclophiline A et la Cyclosporine A n'ont plus de secrets pour vous! (Par contre j'ai des doutes sur la compréhension du motif structural en échange...) J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux à mon frère et à Elodie ainsi qu'à toute ma famille qui a toujours été là pour moi.

Enfin, je remercie Roland dont l'amour me comble de bonheur. Merci pour tout tes conseils, de m'avoir encouragée et soutenue pendant toute la durée de ma thèse, merci aussi d'avoir supporté les allers-retours Paris-Lille et bien sur pour tout ce que nous avons partagé.

Résumé

Le Virus de l'Hépatite C (VHC) est un virus à ARN de polarité positive infectant plus de 170 millions de personnes dans le monde. La protéine non structurale du VHC NS5A est une protéine énigmatique multifonctionnelle faiblement caractérisée au niveau moléculaire. Cette protéine est strictement requise pour la réplication de l'ARN viral, l'assemblage des particules virales et la régulation de facteurs de la cellule hôte. Son domaine 2 désordonné interagit directement avec la Cyclophiline A (CypA) et constitue un substrat pour l'activité peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase (PPIase) de la CypA. La CypA, une protéine de l'hôte, joue un rôle essentiel pour la réplication de l'ARN viral mais sa fonction reste à élucider. NS5A (et plus particulièrement son domaine 2, NS5A-D2) est impliquée dans le mécanisme d'action de la CypA, étant donné que des mutations de résistances apparaissent dans ce domaine sous pression de sélection à la Cyclosporine A (CsA), l'inhibiteur connu de la CypA possédant une activité anti-VHC. La CypA interagit avec la région la plus conservée de NS5A-D2. Dans cette région la mutation D316E confère une résistance à la CsA. Les Cyclophilines sont une cible thérapeutique prometteuse pour lutter contre le VHC.

Au cours de ce travail, nous avons identifié et caractérisé par RMN un petit motif structural au sein de NS5A-D2 localisé au niveau de cette région particulière. Nous montrons que ce petit motif structural, que nous avons dénommé *PW-turn*, est essentiel pour la réplication de l'ARN du VHC. Nous avons également analysé les conséquences structurales des mutations de résistances aux inhibiteurs de Cyclophiline A, ainsi que les conséquences fonctionnelles de ces mutations de résistance vis-à-vis de la liaison et de l'activité PPIase de la CypA.

Précédemment, l'interaction entre NS5A-D2 et l'ARN-dépendante ARN-polymérase du VHC NS5B a été montrée au laboratoire. Grâce à l'utilisation de deux stratégies de marquage de NS5A-D2 au fluor, nous avons caractérisé par RMN l'interaction moléculaire entre NS5A-D2 et NS5B.

L'Alisporivir est un analogue non immunosuppresseur de la CsA actuellement en phase II de développement clinique pour une thérapie sans interféron. Nous avons analysé, par cristallographie des rayons X, la structure du complexe CypA-Alisporivir permettant d'apporter une explication moléculaire au caractère non immunosuppresseur de cette molécule.

L'infection par le VHC induit des modulations des voies métaboliques de la cellule hôte. Dans ce cadre, nous avons étudié l'interaction entre NS5A-D2 et l'hexokinase 2 humaine, la première enzyme limitante de la glycolyse, cette interaction augmente l'activité enzymatique de HK2. Nous nous sommes intéressés aux relations structurales et fonctionnelles entre NS5A-D2 et HK2.

Ces résultats apportent un nouvel éclairage sur le rôle de NS5A-D2 dans la réplication du VHC.

Abstract

Hepatitis C Virus (HCV) is a positive strand RNA virus that has infected more than 170 million people worldwide. The HCV protein NS5A is still an enigmatic multifunctional protein poorly characterized at the molecular level. This protein is essential for HCV RNA replication and particle assembly, and is involved in regulation of host pathways. Its disordered domain 2 directly interacts with host Cyclophilin A (CypA) and is a substrate for the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) activity of CypA. The host protein CypA plays an essential role in HCV RNA replication but its molecular function is unknown. NS5A, through its domain 2 (NS5A-D2), is linked to CypA as resistance mutations appeared in this domain under low doses of Cyclosporine A (CsA), the well-known CypA inhibitor with anti-HCV properties. The binding site of CypA onto NS5A-D2 corresponds to the most conserved region of the domain. In this region a mutation D316E has been shown to confer CsA resistance. Cyclophilin inhibitors hold promise as a novel anti-HCV therapy.

In this work we identified by NMR spectroscopy a short structural motif, a PW-turn, including this particular position in the otherwise disordered NS5A-D2, and report its structure. We show that this structural motif is essential for HCV RNA replication. In addition, we analyze the structural consequences of the resistance mutation to CypA inhibitors, and the functional consequences of these mutation regarding the binding and PPIase activity of CypA.

Previously, it has been demonstrated by NMR that NS5A-D2 interacts with the RNA-dependant RNA-polymerase NS5B. Here, we also describe the interaction between NS5A-D2 and NS5B with two different strategies to incorporate a ^{19}F nucleus in NS5A-D2 and explore the use of ^{19}F NMR to monitor the interaction between NS5A-D2 and NS5B.

Alisporivir is a non-immunosuppressive analogue of CsA with anti-HCV activity, currently completing Phase 2 studies of interferon-free treatment. We analyzed by X-ray crystallography the structure of the CypA-Alisporivir complex in order to provide a molecular explanation for its non-immunosuppressive character.

HCV has been shown recently to reprogram cell metabolism to support its replication. We also investigated the structural and functional relationship between NS5A-D2 and the human hexokinase 2 (HK2), the first rate limiting enzyme of glycolysis. NS5A-D2 interacts with HK2 and this interaction is sufficient to increase HK2 activity.

These results shed new light on the mechanisms by which NS5A-D2 contributes to the HCV replication cycle.

Sommaire

INTRODUCTION	17
1 L’HEPATITE C	19
1.1 DECOUVERTE	19
1.2 EPIDEMIOLOGIE	19
1.3 TRANSMISSION.....	20
1.4 PROGRESSION DE LA MALADIE	21
2 LE VIRUS DE L’HEPATITE C (VHC)	24
2.1 CLASSIFICATION ET VARIABILITE GENETIQUE DU VHC	24
2.2 LA PARTICULE VIRALE	27
2.3 ORGANISATION GENOMIQUE.....	28
2.4 STRUCTURES ET FONCTIONS DES PROTEINES VIRALES	30
2.5 FACTEURS CELLULAIRES NECESSAIRES A LA REPLICATION DU VHC.....	39
2.6 LE CYCLE VIRAL DU VHC.....	43
2.7 LES MODELES ET SYSTEMES D’ETUDES	49
3 LES TRAITEMENTS CONTRE L’INFECTION PAR LE VHC	54
3.1 LE TRAITEMENT DE REFERENCE JUSQU’EN 2011.....	54
3.2 LES ANTIVIRAUX A ACTION DIRECTE DAAS.....	55
3.3 LES INHIBITEURS DES FACTEURS CELLULAIRES HTAS	59
3.4 LES INHIBITEURS DE LA CYCLOPHILINE A	61
4 LE COMPLEXE TERNAIRE NS5A-NS5B-CYPA EST ESSENTIEL A LA REPLICATION DE L’ARN VIRAL	66
5 L’INFECTION PAR LE VHC INDUIT DES PERTURBATIONS DU METABOLISME CELLULAIRE	69
5.1 LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE ET LA GLYCOLYSE AEROBIE.....	69
5.2 PERTURBATIONS DU METABOLISME CENTRAL DU CARBONE PAR LES VIRUS	70
5.3 L’INFECTION PAR LE VHC INDUIT DES PERTURBATIONS DU METABOLISME DE LA CELLULE HOTE	71
5.4 MECANISMES MOLECULAIRES DE LA PERTURBATION DU METABOLISME DE LA CELLULE HOTE PAR LE VHC	71
6 LES PROTEINES INTRINSEQUEMENT DESORDONNEES (IDPS)	73
6.1 READAPTATION DU PARADIGME « STRUCTURE –FONCTION »	73
6.2 DEFINITION DES IDPS	74
6.3 LE ROLE DES PROTEINES DESORDONNEES	81
6.4 LES INTERACTIONS IMPLIQUANT DES IDPS.....	83
6.5 LES IDPS AU SEIN DES PROTEINES VIRALES.....	86
7 LA RMN DES PROTEINES INTRINSEQUEMENT DESORDONNEES	89
7.1 SPECTRE ^1H - ^{15}N HSQC ET ATTRIBUTION DES RESONANCES.....	89

7.2	DEPLACEMENTS CHIMIQUES ET STRUCTURES SECONDAIRES RESIDUELLES	92
7.3	DETERMINATION DES ANGLES DIEDRAUX Φ ET Ψ	95
7.4	LES CONTRAINTES DE DISTANCES NOE	97
7.5	LA RELAXATION PARAMAGNETIQUE	97
7.6	L'ÉCHANGE CHIMIQUE EN RMN	98
7.7	ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE DES PROTEINES PAR RMN	99
7.8	ÉTUDE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES PAR RMN	106
OBJECTIFS		111
RESULTATS		115
1	CARACTERISATION MOLECULAIRE D'UN PETIT MOTIF STRUCTURAL AU SEIN DU DOMAINE 2 DESORDONNE DE NS5A	117
1.1	RESUME.....	117
1.2	ARTICLE	119
1.3	CLONAGE, EXPRESSION ET PURIFICATION DE PEPTIDES RECOMBINANTS MARQUES POUR LA RMN	121
2	ETUDE DES RELATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES ENTRE LA CYP A ET NS5A-D2(JFH1)	129
2.1	EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES	129
2.2	MISE EN EVIDENCE DU MOTIF STRUCTURAL AU SEIN DE NS5A-D2 (JFH1)	133
2.3	ÉTUDE DU MOTIF STRUCTURAL DANS NS5A-D2 (JFH1) A L'AIDE D'UN MODELE PEPTIDIQUE	150
2.4	ÉTUDE DE LA MUTATION A311G	155
2.5	ÉTUDE DES FORMES MINORITAIRES DU W312 DE NS5A-D2 WT	158
2.6	LES MUTANTS PROLINE-ALANINE MODIFIENT L'ÉQUILIBRE DU PW-TURN ENTRE UN ETAT STRUCTURE ET UN NON STRUCTURE.	198
2.7	LE MOTIF STRUCTURAL INTERAGIT AVEC LA CYP A ET EST UN SITE SUBSTRAT POUR SON ACTIVITE PPIASE	202
2.8	ÉTUDE DES MUTATIONS DE RESISTANCE A DES INHIBITEURS DE CYP A	205
2.9	CONCLUSION	227
3	STUDY OF NS5A-D2 INTERACTION WITH NS5B BY ¹⁹F NMR	237
3.1	INTRODUCTION	237
3.2	RESULTS.....	238
3.3	DISCUSSION	243
3.4	EXPERIMENTAL SECTION	246
3.5	SUPPLEMENTARY MATERIAL	249
4	ETUDE DU COMPLEXE CYP A-ALISPORIVIR PAR CRISTALLOGRAPHIE	253
4.1	EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA CYP A POUR LA CRISTALLOGRAPHIE	254
4.2	CRISTALLISATION DU COMPLEXE CYP A-ALISPORIVIR.....	255
4.3	RESOLUTION DE LA STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DU COMPLEXE CYP A-ALISPORIVIR	261
4.4	ANALYSE DE LA STRUCTURE DU COMPLEXE CYP A-ALISPORIVIR ET DISCUSSION	265
4.5	CONCLUSION	270

5	REGULATION DE L'HEXOKINASE 2 HUMAINE PAR LA PROTEINE NS5A DU VHC	271
5.1	CLONAGE, EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'HEXOKINASE 2	272
5.2	TESTS D'ACTIVITE DE HK2 PAR RMN	276
5.3	INTERACTION ENTRE L'HEXOKINASE 2 ET LES DOMAINES 2 ET 3 DE NS5A	278
5.4	ACTIVATION DE L'HEXOKINASE 2 PAR NS5A-D2	280
5.5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	285
	CONCLUSION GENERALE	289
	REFERENCES	293

Publications et communications

Article

Dujardin M., Mandan V., Montserret R., Ahuja P., Huvent I., Launay H., Leroy A., Bartenschlager R., Penin F., Lippens G. & Hanouille X. “A Proline-Tryptophan turn in intrinsically disordered domain 2 of NS5A protein is essential for Hepatitis C Virus RNA replication”, 2015, *The Journal of Biological Chemistry*.

Communications

Dujardin M., Mandan V., Montserret R., Ahuja P., Huvent I., Launay H., Leroy A., Bartenschlager R., Penin F., Lippens G. & Hanouille X. “Caractérisation moléculaire d’un motif structural au sein du domaine 2 de la protéine NS5A du virus de l’hépatite C”, Congrès ANRS, 13^{ème} Réunion du Réseau National Hépatites, Paris, 24-25 Janvier 2013. Communication orale.

Dujardin M., Mandan V., Montserret R., Ahuja P., Huvent I., Launay H., Leroy A., Bartenschlager R., Penin F., Lippens G. & Hanouille X. “The Cyclophilin A binding site on the intrinsically disordered domain 2 of HCV NS5A contains a short structural motif that is essential for viral replication”, DGK-AK1-Workshop: Diffraction Data Collection Using Synchrotron radiation, Berlin-Adlershof, Bessy, Allemagne, 13-15 Juin 2013. Communication par affiche.

Dujardin M., Mandan V., Montserret R., Ahuja P., Huvent I., Launay H., Leroy A., Bartenschlager R., Penin F., Lippens G. & Hanouille X. “A short structural motif in the disordered domain 2 of NS5A is essential for HCV RNA replication”. Rencontre du groupement Scientifique RMN du Nord, Institut Pasteur de Lille, 22 Juin 2013. Communication orale.

Dujardin M., Mandan V., Montserret R., Huvent I., Launay H., Leroy A., Bartenschlager R., Penin F., Lippens G., & Hanouille X. “A short structural motif in the disordered HCV NS5A domain 2 is essential for HCV RNA replication”, 20th HCV 2013, International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne, Australie, 7 Octobre 2013. Communication par affiche.

Dujardin M., Mandan V., Montserret R., Ahuja P., Huvent I., Launay H., Leroy A., Bartenschlager R., Penin F., Lippens G. & Hanouille X. “A short structural motif in the disordered domain 2 of NS5A is essential for HCV RNA replication”, 14^{ème} colloque annuel

des Doctorants - Journée André Verbert, Université de Lille 1, 11 Septembre 2014.
Communication par affiche.

Dujardin M., Diaz O., André P., Cantrelle F., Lippens G., Hanouille X. "Regulation of Human Hexokinase 2 by HCV NS5A protein", UGSF, Université de Lille 1, 3 Octobre 2014.
Communication orale.

Autres communications

Hanouille X., Huvent I., Rosnoble C., Verdegem D., Dujardin M., Badillo A., Coelmont L., Fritzing B., Wieruszeski J.M., Landrieu I., Neyts J., Bartenschlager R., Penin F., Lippens G. "HCV NS5A : NMR analyses of its interactions with NS5B and cyclophilin A and molecular characterization of a cyclophilin inhibitor-resistance mutation", 18th International Hepatitis C Virus and Related Diseases (Molecular Virology and Pathogenesis), Seattle, USA, 8 Septembre 2011. Communication orale.

Launay H., Dujardin M., Rosnoble C., Canterelle F.X., Lippens G., Hanouille X. " Hepatitis C virus RNA polymerase studied by NMR", Rencontre GS-RMN, Université de Lille 1, 3 Juillet 2012. Communication Orale.

Hanouille X., Dujardin M., Montserret R., Madan V., Huvent I., Badillo A., Wieruszeski J.M., Bartenschlager R., Penin F., Lippens G. "Molecular characterization of a Cyclophilin inhibitor-resistance mutation in HCV NS5A", 19th International Hepatitis C Virus and Related Diseases (Molecular Virology and Pathogenesis), Venise, Italie, 5 Septembre 2012. Communication par affiche.

Launay H., Dujardin M., Bressanelli S., Penin F., Lippens G., Hanouille X. "NMR analyses of the hepatitis C virus RNA replication", Keystone symposium, Snow Bird Resort, Utah, USA, 13-18 Janvier 2013. Communication par affiche.

Abréviations

Ac	Anticorp
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine amino transférase
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BFTA	3-bromo-1,1,1-trifluorocatone
Bin1	Bridging integrator protein 1
CD	Circular dichroism
RDC	Couplage dipolaire résiduel
CNS	Crystallography and NMR system
CPMG	Carr-Purcel-Meiboom-Gill
CsA	Cyclosporine A
CSI	Chemical shift index
CypA	Cyclophiline A
DAA	Direct acting antiviral
DMV	Double-membrane vesicle
EGFR	Epidermal growth factor
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetic acid
EMCV	Virus de l'encéphalomyocardite
FKBPs	FK506-binding proteins
GAGs	Glycosaminoglycannes
GCK	Glucokinase
GF	Gel filtration
GFP	Green fluorescent protein
GSK3	Glycogène synthase kinase 3
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine triphosphate
HCA	Hydrophobic cluster analysis
HCMV	Cytomégalovirus humain
HCVcc	Culture cellulaire dérivée du VHC
HCVpp	Pseudoparticules virales
HK	Hexokinase
HSQC	Heteronuclear simple quantum correlation
HTA	Host targeted antiviral
IDP	Protéine intrinsèquement désordonnée
IFN	Interféron
IRES	Internal ribosome entry site
ITC	Isothermal titration calorimetry
JFH1	Japanese fluminant hepatitis-1
K_D	Constante de dissociation
k_{on}	Constante de vitesse de la réaction de formation d'un complexe (<i>on-rate</i>)
k_{off}	Constante de vitesse de la réaction de dissociation d'un complexe (<i>off-rate</i>)
LDL	Low density lipoprotein
LDL-R	Low density lipoprotein receptor
LVP	Lipo-viro-particule
MALDI TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight

MAP2	Microtubule associated protein 2
MCC	Métabolisme central du carbone
MMV	Multi-membrane vesicle
MOBK1B	Mps one binder kinase activator-like 1B
MoRE	Molecular recognition element
MoRF	Molecular recognition feature
NANBH	Hépatite non A non B
NFAT	Nuclear factor Activated T-cells
MPT	Modification post-traductionnelle
NPVH	Non-primate hepacivirus
ncIDP	neighbor corrected Intrinsically Disordered Protein
NOE	Nuclear overhauser effect
NOSEY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
NS2	Protéine non structurale
OCLN	Occludine
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open reading frame
pepD2(Con1)	Peptide de NS5A-D2 Con1
pepD2(JFH1)	Peptide de NS5A-D2 JFH1
PI3 kinases	Phosphoinositide 3-kinase
PI4KIII α	Phosphatidylinositol 4-kinase III alpha
Plk1	Polo-like kinase
PPIase	Peptidyl-prolyl cis/trans isomérase
ppm	Partie par million
PRE	Paramagnetic relaxation enhancement
PreSMos	Prestructured motifs
PSEs	Preformed structural elements
R1	Relaxation transversale
R2	Relaxation longitudinale
RBV	Ribavirine
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante
RE	Réticulum endoplasmique
RHV	Hépacivirus de rongeur
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAXS	Small-angle X-ray scattering
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis
siRNA	Silencing RNA
SPR	Résonance plasmonique de surface
SSP	Secondary structure propensity
TFA	Acide trifluoroacétique
TFET	2,2,2-trifluorométhyl-1-thiol
TIMs	Triosephosphate isomerases
TMSP	Sodium 3-(triméthylsilyl)-2,2,3,3-d ₄ -propionate
TOCSY	Total correlation spectroscopy
Tris	2-amino-2hydroxyméthyl-1,3-propanediol
VHA	Virus de l'hépatite A
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VLDL	Very low density lipoproteins
WT	Wild type

Introduction

1 L'hépatite C

1.1 Découverte

Le virus de l'hépatite C (VHC) fut découvert en 1989. Avant cette date, deux agents viraux étaient connus pour causer des hépatites virales : le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite A (VHA). Dans les années 70, Harvey J. Alter et son équipe ont montré que des cas d'hépatites n'étaient pas associés à l'infection par ces deux virus. Ces nouveaux cas d'hépatites furent ainsi désignés hépatites « non-A, non B » (NANBH) (Feinstone et al., 2001). En 1989, grâce à des techniques de biologie moléculaire utilisées pour cloner une souche virale isolée à partir d'un chimpanzé infecté, l'agent responsable des hépatites « non A, non B » a été identifié (Choo et al., 1989). La séquence de son génome a révélé son appartenance à la famille des *Flaviviridae*. Pour la première fois de l'histoire de la virologie, un virus était identifié par son génome sans que la particule virale elle-même ait été isolée. Ce nouveau virus fut appelé virus de l'hépatite C.

1.2 Epidémiologie

L'hépatite C représente un problème majeur de santé publique. Plus de 25 ans après sa découverte, l'organisation mondiale de la santé (O.M.S.) estime que 130 à 170 millions de personnes sont chroniquement infectées par le VHC, ce qui représente 2,2 à 3 % de la population mondiale (WHO 2000). La prévalence du VHC varie de 0,1 à plus de 10 % de population infectée d'une région à l'autre du monde (Figure 1) (Lavanchy, 2011). Les pays industrialisés de l'Amérique du Nord et de l'Europe de l'ouest sont les moins touchés (1% au Canada, 0,75 % en Allemagne, 1,3 % en France) par rapport aux pays en voie de développement d'Afrique et d'Asie (> 2,5%). C'est en Egypte que le taux de prévalence est le plus élevé avec plus de 14 % de la population infectée. Cela s'explique par une campagne de prévention massive contre le schistosome à partir des années 1920 et jusque dans les années 1970. L'utilisation de seringues contaminées pour délivrer le traitement a conduit à une transmission massive du VHC (Frank et al., 2000).

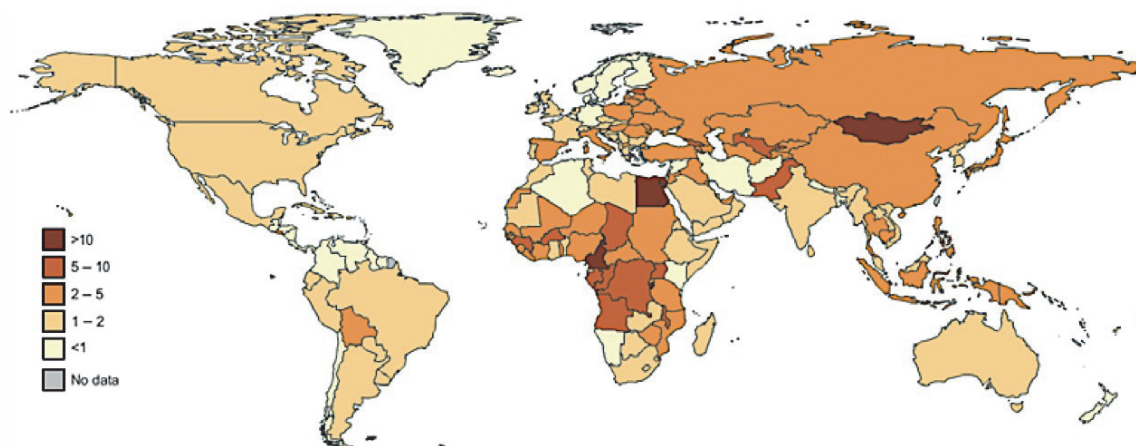


Figure 1. Prévalence de l'infection par le VHC dans le monde en 2010 (Lavanchy, 2011).

1.3 Transmission

La transmission se fait essentiellement par voie parentérale (Lavanchy, 2009), c'est-à-dire lorsque le sang d'une personne entre en contact avec celui d'une personne infectée, principalement par la transfusion de sang et de produits dérivés, par l'usage de drogues par voie veineuse. L'utilisation de matériel médical mal désinfecté peut également transmettre le virus.

La transmission par transfusion a été la plus répandue jusqu'à l'élaboration de tests de dépistage du VHC dans les dons de sang en 1991 dans les pays développés. Les premiers reposaient sur la détection d'anticorps anti-VHC, pas toujours présents avant la séroconversion (Puoti et al., 1992), ou chez les individus immunodéprimés ou hémodialysés (Bukh et al., 1993; Chan et al., 1993; Ragni et al., 1993). Depuis la mise au point en 2001 de tests détectant l'ARN du virus, ce type de transmission est devenu extrêmement rare dans les pays développés. Actuellement c'est donc surtout par l'injection de drogues par voie veineuse que se transmet le VHC (Broers et al., 2005). 80 % des nouvelles infections sont attribuées aujourd'hui aux toxicomanes. Le VHC peut rester infectieux dans quelques microlitres de sang pendant plusieurs jours, voire même pendant plusieurs semaines à basse température (Paintsil et al., 2010).

La transmission nosocomiale n'est pas à négliger, même si actuellement le risque est extrêmement faible lors d'interventions chirurgicales, dentaires ou de stomatologie lorsque des règles strictes d'asepsie sont mises en œuvre. Le personnel de santé est également exposé lors d'une piqure accidentelle, avec un risque d'infection de 3 % à partir d'une source positive, alors qu'il est de 0,3 % pour le VIH, et de 30 % pour le VHB, évitable par la vaccination.

Le VHC n'est pas détecté par PCR dans le sperme ni les sécrétions vaginales (Liou et al., 1992). Néanmoins la transmission sexuelle semble exister dans de très rares cas, notamment chez des patients atteints d'autres infections sexuellement transmissibles, ou à l'occasion de relations sexuelles au cours des menstruations.

Le risque de transmission de la mère à l'enfant pendant la naissance est de 5 % environ et il n'est pas diminué par une césarienne ou l'abstention de l'allaitement (Indolfi and Resti, 2009).

Des cas de contaminations familiales ont été recensées mais restent rares, il est conseillé aux personnes infectées de ne pas partager leur rasoir, leurs instruments de manucures et leur brosse à dents qui risquent de porter du sang contaminé.

1.4 Progression de la maladie

Quatre à douze semaines après la contamination, alors que la durée de l'incubation semble dépendre de la quantité de virus inoculé, l'infection se caractérise par une phase aigüe, le plus souvent asymptomatique. Le diagnostic est donc rarement établi à ce stade de la maladie. Environ 10 % des personnes infectées présentent lors de cette phase des signes tels que, fatigue, fièvre, nausées, douleurs abdominales, ictère avec coloration sombre de l'urine. La maladie dure généralement de 2 à 12 semaines. La confirmation du diagnostic peut être établie, par la mise en évidence dans le sang de l'ARN viral, qui devient détectable une à trois semaines après la contamination, par l'élévation du taux des transaminases hépatiques, après deux à quatre semaines puis par la présence d'anticorps anti-VHC, dans les sept à huit semaines suivant la contamination (Bowen and Walker, 2005; Santantonio et al., 2008). Dans certains cas, la séroconversion intervient tardivement après le pic des transaminases.

Selon les études, 15 à 45 % des hépatites C aigües, symptomatiques ou non, vont évoluer vers une guérison. L'ARN viral devient alors indétectable et les transaminases retrouvent une valeur normale. Les anticorps anti-VHC diminuent mais restent présents dans le sérum pendant de nombreuses années (Figure 2).

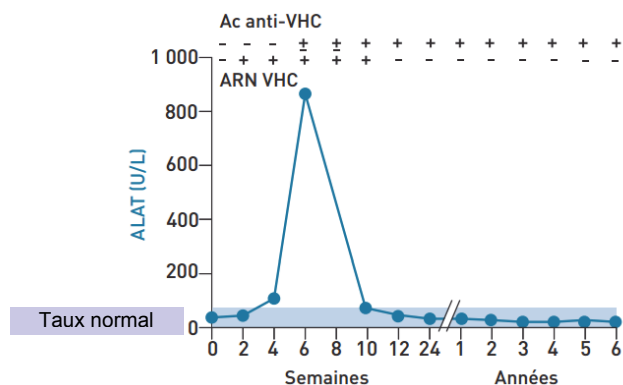


Figure 2. Hépatite C aigüe évoluant vers la guérison. Taux d'alanine amino transférase (ALAT) en fonction du temps, depuis l'infection par le VHC. (source <http://hepatoweb.com/hepatite-C-infection.php>).

65 à 85 % des personnes infectées vont développer une infection chronique, ce diagnostic est établi lorsque l'ARN viral persiste plus de six mois après la phase aigüe, en général à un taux inférieur à celui de la phase aigüe. Transitoirement l'ARN viral peut même être indétectable. Les transaminases peuvent restées élevées ou se normaliser (Figure 3).

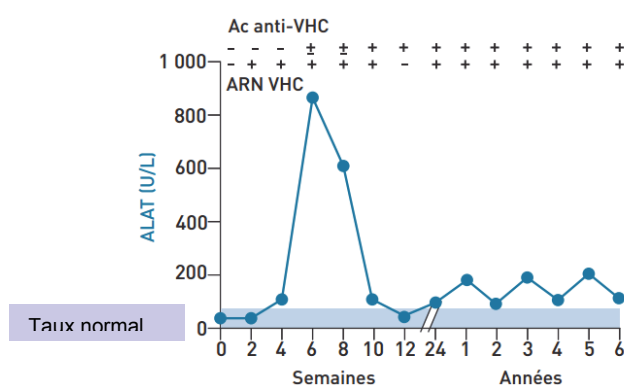


Figure 3. Hépatite C aigüe évoluant vers la chronicité. Taux d'alanine amino transférase (ALAT) en fonction du temps, depuis l'infection par le VHC. (source <http://hepatoweb.com/hepatite-C-infection.php>).

Cette évolution dépend du sexe, de l'âge, du génotype viral, d'une infection virale associée (HBV ou VIH), de la consommation d'alcool (Chen and Morgan, 2006; Grebely and Tyndall, 2011). Il semblerait que l'évolution vers la chronicité soit en relation avec la grande variabilité génétique du virus qui circule sous la forme de quasi-espèces, lui permettant ainsi d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Farci et al., 1999).

On peut distinguer trois formes d'hépatite C chronique:

- l'hépatite chronique avec un taux de transaminases normal : dans 25 % des cas, avec des lésions hépatiques minimales et très peu d'évolution.

- l'hépatite chronique minime : dans 50 % des cas avec transaminases variables légèrement supérieures aux normales, et une très lente évolution.
- l'hépatite chronique active : dans 25 % une fibrose du foie apparaît avec une évolution possible vers une cirrhose dans 20 % des cas, en 10 à 30 ans.

A partir du stade de cirrhose du foie, il existe un risque de 1 à 4 % de développer un cancer du foie. (Le risque de cancer du foie est 20 fois plus élevé chez les sujets infectés par le VHC.) Le caractère asymptomatique fréquent des hépatites C aiguës et chroniques fait que seules 50 % des personnes infectées ont connaissance de leur état.

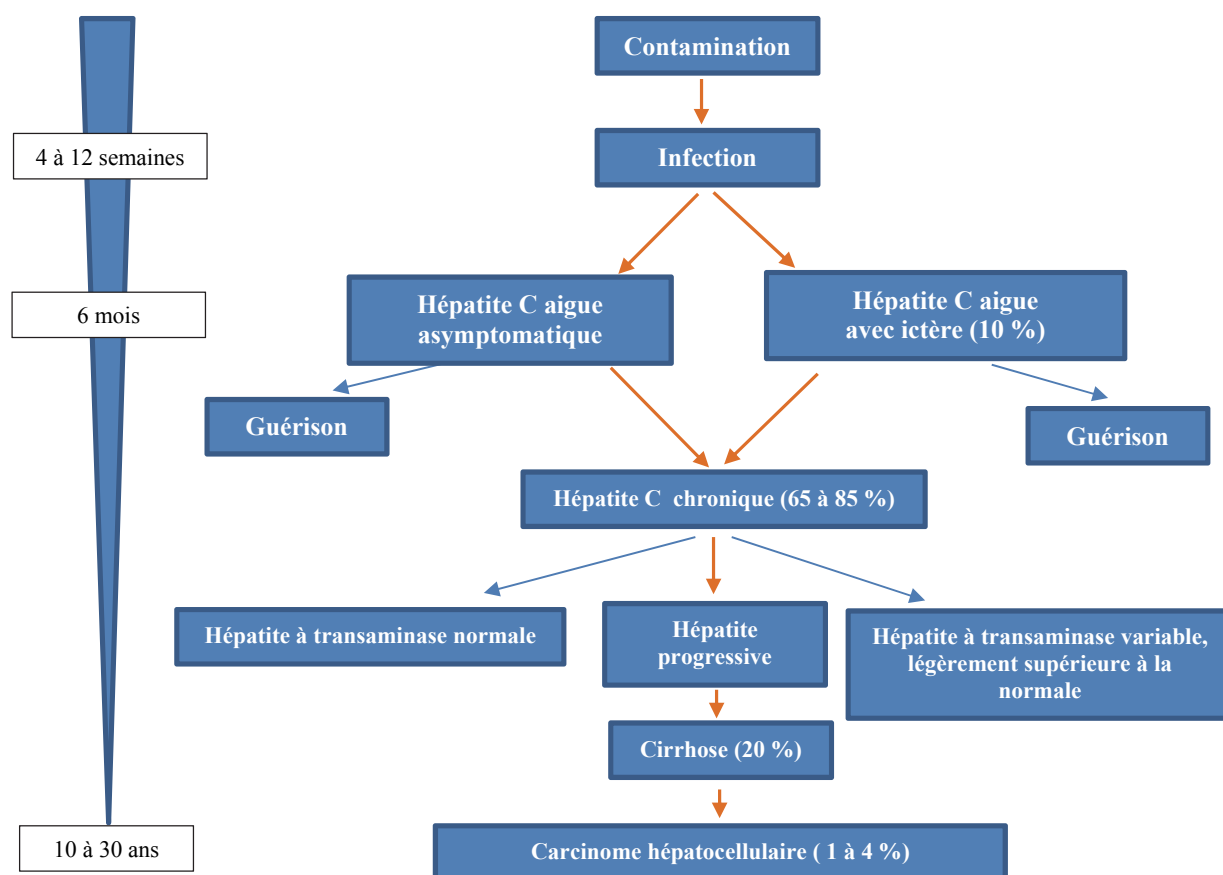


Figure 4 : Evolution de l'infection par le VHC. Adapté de Chen and Morgan, (2006).

est répliqué, il se produit une mutation. Ces mutations peuvent être létales, sinon elles s'accumulent au cours des réplifications successives et conduisent à une importante variabilité génétique favorisée par l'abondante production de virions estimé à 10^{12} par jour (Neumann et al., 1998). Cette variabilité génétique a pour conséquence une importante diversification du VHC qui s'exprime au niveau des populations infectées et aussi au niveau de l'individu, dans lequel le VHC circule sous la forme d'un mélange de variants viraux apparentés, appelé « quasi-espèce ». La quasi-espèce confère au virus une capacité d'adaptation qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire et aux traitements antiviraux et ainsi d'établir une infection chronique.

La sélection des variants les mieux adaptés à leur environnement et leur transmission a permis, dans des zones géographiques et dans certaines populations, l'émergence des géotypes particuliers qui se sont diversifiés.

La comparaison de séquences nucléotidiques de VHC issues du monde entier a permis d'établir la phylogénie des variants et de mettre en évidence 6 géotypes qui diffèrent de 30 à 35 % (Simmonds et al., 2005). Au sein de chaque géotype, de nombreux sous types (notés a, b, c, ...) qui diffèrent de 20 à 25 % ont été identifiés. En 2007, un nouveau géotype 7 a été décrit chez un patient originaire de la République démocratique du Congo (Murphy et al., 2007). L'ensemble des données de séquençage ne cessant d'augmenter, une publication de 2014 sur la base de 1300 séquences disponibles a permis de répertorier 7 géotypes, 67 sous-types dans lesquels 21 séquences supplémentaires ont été apparentées (Smith et al., 2014).



Figure 6. Arbre phylogénétique des génotypes du VHC. (Smith et al., 2014)

La distribution mondiale des génotypes, présenté Figure 7, montre que les génotypes 1, 2 et 3 sont présents sur tous les continents, les génotypes 1 et 2 prévalent en Amérique, en Russie, au Japon, en Chine en Europe, où l'on rencontre également 20 % des génotypes 3. D'autres types sont plus spécifiques d'une région géographique comme le type 4 qui a une forte prévalence au Moyen-Orient comme en Egypte. Le type 5 est essentiellement rencontré en Afrique du Sud et le type 6 en Asie du sud-est. En Inde, c'est le génotype 3 qui domine (Lee et al., 2014; Hajarizadeh et al., 2013).

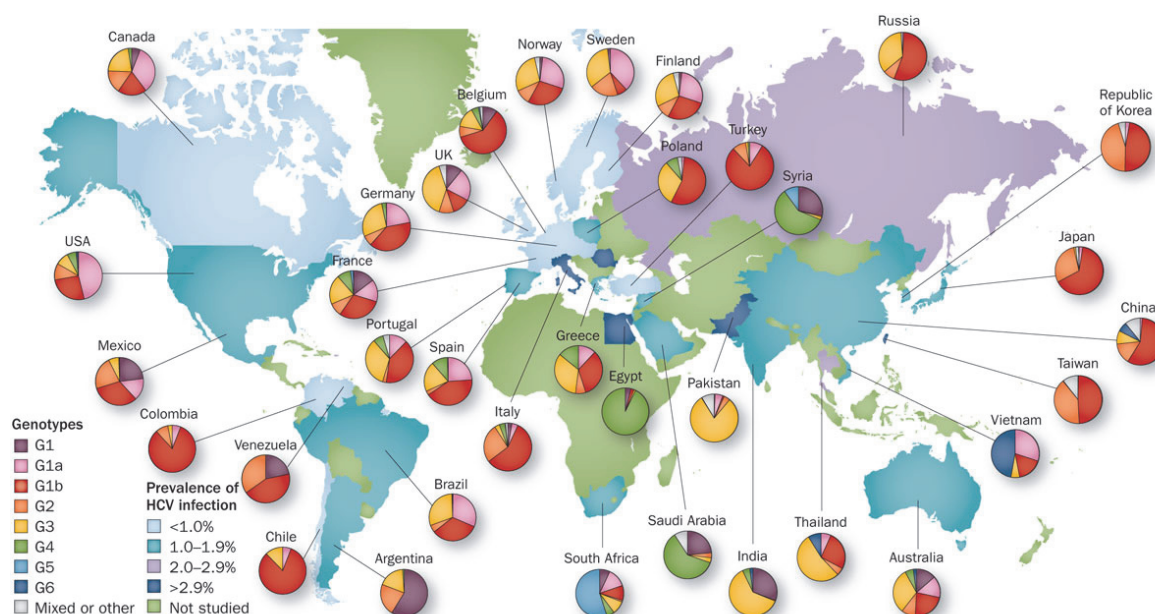


Figure 7. Répartition mondiale des génotypes du VHC. (Hajarizadeh et al., 2013)

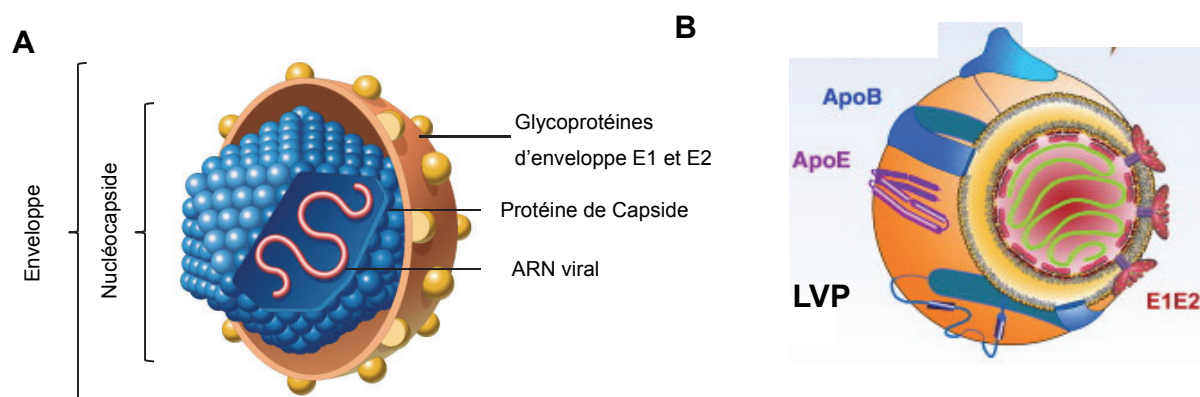
En France, avant la découverte du VHC, le génotype 1b a été principalement transmis par transfusion sanguine et les génotypes 1a et 3a l'étaient par l'usage des drogues par voie veineuse. Depuis le dépistage du VHC dans les dons de sang, la proportion de génotypes 1a et 3a a augmenté par rapport au génotype 1b (Martinot-Peignoux et al., 1999).

Le passage à la chronicité ne dépend pas du génotype mais la détermination de celui-ci est nécessaire, car les différents génotypes ne réagissent pas de la même manière aux traitements.

2.2 La particule virale

Le VHC est un petit virus enveloppé, le diamètre des particules virales est estimé entre 55 et 65 nm. L'ARN viral est contenu dans une capsidie protéique (C) à symétrie isocaédrique, elle-même située dans une enveloppe lipidique (dérivée de la cellule), dans laquelle sont insérées les glycoprotéines virales E1 et E2 (Figure 8) (Wakita et al., 2005). La densité dans le sérum des particules virales analysées par ultracentrifugation en gradient de saccharose est variable, de 1,03 à 1,25 g/ml (Andre et al., 2002). Cette variabilité reflète l'hétérogénéité de ces particules pouvant être des capsides virales non enveloppées, des virions sous forme libre ou associés à des lipoprotéines de densité variable. En effet, dans le sérum des patients on peut retrouver des virions associés aux lipoprotéines de basse densité (*low density lipoproteins* pour LDL) ou de très faible densité (VLDL pour *very low density lipoproteins*). Ces virions associés aux lipoprotéines

forment des particules hybrides appelées lipo-viro-particules (LVP) (Bartenschlager, Penin, Lohmann, et André, 2011).



2.3 Organisation génomique

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive d'environ 9,6 kb. Son organisation est identique à celle des génomes des *Pégivirus* des *Pestivirus* et des *Flavivirus*, les trois autres genres de la famille des *Flaviviridae*. Il comprend trois régions distinctes: la région 5' non codante, un cadre de lecture ouvert (ORF *Open Reading Frame*) unique et la région 3' non codante (Figure 9). Le cadre de lecture unique code pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés qui sera clivée par des protéases de l'hôte et des protéases virales en 3 protéines structurales et 7 protéines non structurales.

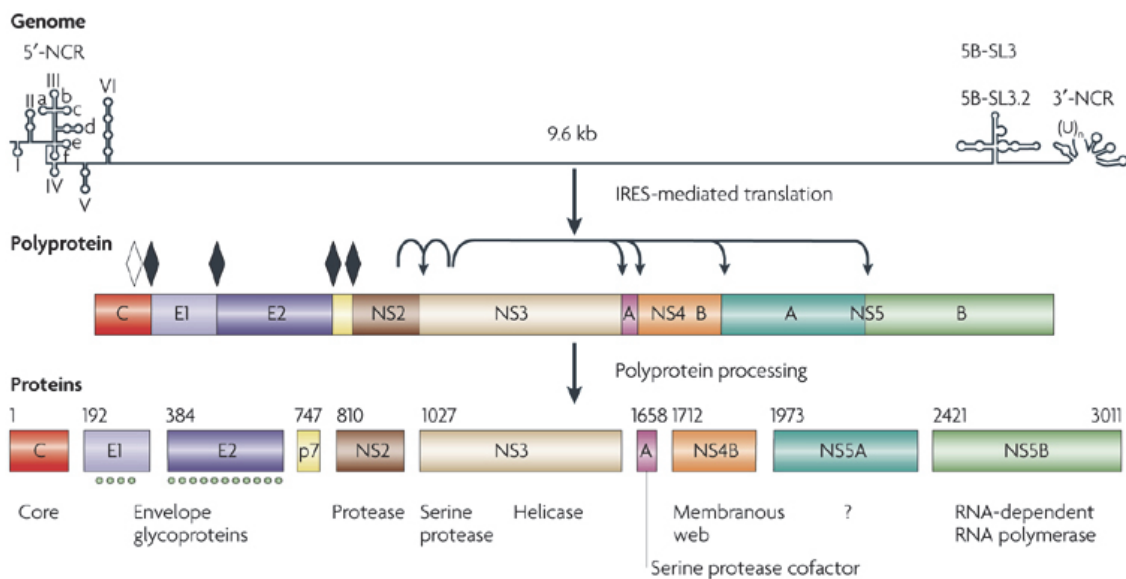


Figure 9. Organisation du génome viral. (Moradpour et al., 2007). Le génome du VHC est un simple brin d'ARN positif. L'IRES, présent dans la région 5' non codante est situé devant l'unique cadre de lecture codant pour une polyprotéine de 3 000 acides aminés. La polyprotéine est clivée par des protéases cellulaires (losanges) et virales (flèches) donnant naissances aux protéines structurales et non structurales.

2.3.1 La région 5' non codante

La région 5' non codante est très conservée et contient le site d'entrée interne du ribosome (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*) essentiel pour la traduction de l'ARN viral. L'IRES est composé de 4 domaines numérotés de I à IV structurés ainsi que des 30 premiers nucléotides de l'ORF (Friebe et al., 2001).

2.3.2 Le cadre de lecture ouvert

La région 5' non codante est suivie du cadre de lecture ouvert débutant par un codon AUG initiateur de la traduction. Il code pour 10 protéines virales : des protéines structurales (protéines de capsid C, glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) et des protéines non structurales, NS (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, et NS5B).

2.3.3 La région 3' non codante

La région 3' non codante comporte trois régions successives: une région de 30 nucléotides non traduite, une région poly-U/C de longueur variable, et une région terminale très conservée, appelée région 3'X (Kolykhalov et al., 1996). La région 3'X possède 3 structures secondaires

successives de type tiges-boucles qui sont impliquées dans la synthèse du brin d'ARN négatif au cours de la réplication (Yi and Lemon, 2003) .

2.4 Structures et fonctions des protéines virales

La traduction du cadre de lecture ouvert donne naissance à une polyprotéine, associée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Elle est le précurseur de toutes les protéines virales. Le découpage de la polyprotéine virale est assuré par des protéases cellulaires (signal peptidase et signal-peptide peptidase du RE) et virales (NS2 et NS3/4A) donnant naissance aux 10 protéines virales fonctionnelles : les 3 premières Core, les glycoprotéines E1 et E2 composent la particule virale et sont dites « protéines structurales » et les 7 suivantes (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, et NS5B) sont dites « non structurales » et font partie du complexe de réplication (excepté de p7 et NS2 non indispensable à la réplication). Le clivage entre les protéines structurales et p7 et NS2 est effectué par les protéases cellulaires tandis que le reste des clivages est assuré par les protéases virales NS2 et NS3/4A (Moradpour et al., 2007). Toutes les protéines du VHC sont ancrées ou associées aux membranes cellulaires (Figure 10).

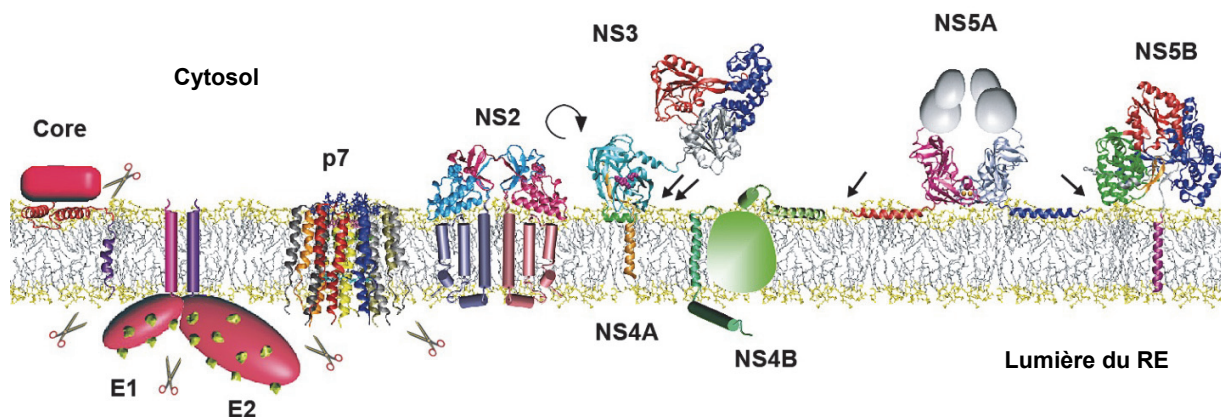


Figure 10. Structure et association des protéines du VHC à la membrane (Moradpour and Penin, 2013). Les ciseaux indiquent le clivage par la signal peptidase (coté lumière du RE) et la signal-peptide peptidase (coté cytoplasme). La flèche circulaire indique l'auto-clivage entre NS2 et NS3 par la protéase NS2-3. Les flèches droites indiquent le clivage par la sérine protéase NS3-4A.

2.4.1 Les protéines structurales

2.4.1.1 La protéine de capsid : Core

Core (23 kDa) est la première protéine structurale codée par l'ORF et forme la capsid virale. Sa maturation implique deux protéines cellulaires. Lors de la traduction, la polyprotéine naissante est dirigée vers le RE. La protéine core est ensuite clivée une première fois par la signal peptidase (SP) à la jonction protéine core - glycoprotéine E1, libérant core de la polyprotéine pour donner une protéine immature de 23kDa (Yasui et al., 1998). La séquence en acides aminés 179-191 ancrée à la membrane du RE est ensuite reconnue et clivée par une autre protéine cellulaire : la signal peptide peptidase, pour donner une protéine mature de 21 kDa (McLauchlan et al., 2002). La protéine mature ainsi obtenue est dimérique, elle est caractérisée par deux domaines (Boulant et al., 2005). Le domaine D1 (résidus 1-117) riche en résidus basiques est désordonné lorsqu'il est seul en solution et possède des structures résiduelles en hélice-alpha. D1 se replie lorsqu'il interagit avec le domaine D2 (118-177) qui est composé d'hélices-alpha amphipatiques. La protéine core mature reste ancrée à la membrane du RE par son domaine hydrophobe D2 en C-terminal et migre ensuite vers les gouttelettes lipidiques du RE (McLauchlan et al., 2002). Hormis son rôle structural de capsid virale, la protéine core joue un rôle important dans l'assemblage du virus (paragraphe 2.6.4). En effet, son domaine N-terminal D1 riche en acides aminés basiques interagit avec la région 5' non codante de l'ARN viral permettant la formation de la nucléocapsid. Il a également été suggéré que la protéine core recrute les protéines non structurales autour des gouttelettes lipidiques, indiquant son rôle central dans la morphogénèse des virions (Miyinari et al., 2007).

2.4.1.2 Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (33 et 70 kDa) sont des constituants de l'enveloppe virale. Elles sont essentielles pour l'étape d'entrée du VHC et l'assemblage des particules virales. Lors de la maturation de la polyprotéine, E1 et E2 sont libérées par la SP (Dubuisson et al., 2002). E1 et E2 contiennent chacune un domaine N-terminal extracellulaire hautement glycosylé de 160 et 334 acides aminés respectivement et un domaine C-terminal transmembranaire de 30 acides aminés hydrophobe (Cocquerel et al., 2000). Ces protéines s'assemblent en un hétérodimère non covalent à travers leurs domaines transmembranaires (De Beeck et al., 2001).

2.4.2 Les protéines non structurales

2.4.2.1 La protéine p7

p7 est une petite protéine membranaire de 63 acides aminés constituée de deux segments transmembranaires connectés par une petite boucle cytoplasmique, tandis que les extrémités N-terminal et C-terminal sont orientées vers la lumière du RE (Carrère-Kremer et al., 2002). Il a été montré que cette protéine de la famille des viroporines s'oligomérisse et possède une activité de canal cationique (Carrère-Kremer et al., 2002; Pavlović et al., 2003). Son rôle précis n'est pas connu avec certitude. Elle joue un rôle dans l'assemblage et la sécrétion des virions (Steinmann and Pietschmann, 2010), notamment par son interaction avec la protéine NS2 régulant ainsi la localisation de core (Boson et al., 2011; Jirasko et al., 2010; Ma et al., 2011). p7 semble aussi importante pour l'entrée du virus dans la cellule hôte (Sakai et al., 2003).

2.4.2.2 La protéine non-structurale NS2

NS2 est une protéase à cystéine associée à la membrane du RE (Lorenz et al., 2006). Le domaine N-terminal est constitué de plusieurs domaines transmembranaires (Jones et al., 2007) et le domaine C-terminal en association avec le domaine N-terminal de NS3 forme la protéase NS2-3. Cette enzyme NS2-3 catalyse le clivage entre ces deux protéines lors de la maturation de la polyprotéine (Lorenz et al., 2006). La structure cristallographique du domaine protéase NS2 montre qu'elle forme un dimère possédant deux sites actifs, contenant chacun des acides aminés provenant des deux monomères. NS2 n'est pas indispensable à la réplication de l'ARN, elle est impliquée dans l'assemblage des particules virales (Jones et al., 2007).

2.4.2.3 Le complexe NS3-4A

NS3-4A est un complexe non covalent entre NS3 et le cofacteur NS4A. La structure de ces protéines a été caractérisées (Yao et al., 1999; Raney et al., 2010; Morikawa et al., 2011). NS4A est ancrée en N-terminal à la membrane par une hélice alpha transmembranaire de 21 acides aminés. NS3 est une protéine hydrophile, composée d'un domaine sérine protéase en N-terminal et un domaine NTPase/hélicase en C-terminal. L'association du domaine sérine protéase de NS3 avec le cofacteur NS4A permet d'activer le domaine sérine protéase de NS3 permettant de cliver la polyprotéine aux sites NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B (Penin et al., 2004a). Le domaine C-terminal NTPase/hélicase de NS3 intervient dans la réplication de l'ARN viral. L'activité hélicase de NS3 servirait à séparer les brins d'ARN positifs et négatifs de l'ARN viral

lors de la réplication et à abolir les structures secondaires des ARN (IRES et régions X de l'extrémité 3' non codante) lors de la traduction des protéines virales et lors de la réplication pour permettre à l'ARN polymérase d'accéder aux structures très repliées de l'ARN. L'activité NTPase du domaine C-terminal de NS3 permet de fournir l'énergie nécessaire à l'activité hélicase en hydrolysant les NTP et dNTP (Penin et al., 2004a). En 2011, deux inhibiteurs anti-sérine protéase NS3-4A ont été approuvés pour traiter le génotype 1b du VHC, il s'agit du Bocéprévir et du Télaprévir (Doyle et al., 2013).

2.4.2.4 La protéine non structurale NS4B

NS4B est une petite protéine hydrophobe transmembranaire localisée dans la membrane du RE. Cette protéine est relativement mal caractérisée mais des programmes de prédictions de topologie indiquent que NS4B contiendrait 4 domaines transmembranaires ainsi qu'un domaine N-terminal et un domaine C-terminal localisés coté cytosolique. La partie N-terminal a la particularité d'être transloquée du côté de la lumière du RE (Elazar et al., 2004; Gouttenoire et al., 2009a; Gouttenoire et al., 2009b). Sa fonction serait de modifier la membrane du RE pour former le réseau membranaire nécessaire à la réplication de l'ARN viral (paragraphe 2.6.3) (Egger et al., 2002). L'activité GTPase et ATPase de cette protéine sont également nécessaires à la réplication de l'ARN viral (Thompson et al., 2009).

2.4.2.5 NS5A

NS5A est une phosphoprotéine hydrophile, ancrée à la membrane, de 49 kDa, riche en prolines (approximativement 10 % des acides aminés de la séquence totale de NS5A sont des prolines), indispensable pour la réplication du génome du VHC et la formation de particules virales, dont le rôle reste à élucider. Aucune fonction enzymatique n'a été mise en évidence pour cette protéine. Sa fonction serait d'interagir avec l'ARN viral, des protéines virales et cellulaires pour assurer la réplication du VHC.

NS5A est ancrée à la membrane du RE par une hélice alpha amphipathique (résidus 1-27) (Brass et al., 2002; Penin et al., 2004b). Sa partie cytoplasmique est constituée de trois domaines : NS5A-D1 (résidus 28-213), NS5A-D2 (résidus 250-342) et NS5A-D3 (résidus 356-447). Les trois domaines sont séparés par deux séquences de faible complexité riche en sérines et prolines (LCS, *Low Complexity Sequence*). La structure du domaine 1 a été résolue par cristallographie aux rayons X (Tellinghuisen et al., 2005). C'est un domaine de liaison au zinc formant un homodimère avec une cavité basique électropositive. Il a été montré que D1 sous forme

d'homodimère peut lier l'ARN (Hwang et al., 2010), la cavité de l'homodimère servirait de rail pour l'ARN. En 2009, Love et al., ont obtenu une nouvelle structure de l'homodimère NS5A-D1 adoptant une organisation différente de celle qui était déjà publiée par Tellinghuisen et al. Ces deux structures pourraient chacune être impliquées dans des rôles différents de NS5A, la réplication de l'ARN viral et la formation des particules virales. Le domaine 1 de NS5A est la cible du Daclatasvir, une molécule anti-VHC approuvée par l'agence américaine FDA (*Food and Drug Administration*) en juillet 2015. Récemment Lambert et al., (2014) ont obtenue une structure cristallographique du domaine 1 de NS5A (génotype 1a), révélant deux nouvelles formes dimérique de ce domaine.

Les domaines 2 et 3 de NS5A ont une variabilité de séquence beaucoup plus élevée par rapport au domaine 1 (Penin et al., 2004a; Tellinghuisen et al., 2004). Le domaine 2 de NS5A a été caractérisé par résonance magnétique nucléaire (RMN) pour la première fois en 2007 par Liang et al. Les domaines 2 et 3 ont ensuite été caractérisés par RMN dans notre laboratoire (Hanouille et al., 2010; Hanouille et al., 2009a). Il s'agit de domaines désordonnés, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas de structure tridimensionnelle stable dans le temps. Il a été montré que ces domaines désordonnés ont des propensions intrinsèques à former des structures secondaires en hélices-alpha (Verdegem et al., 2011; Hanouille et al., 2010; Feuerstein et al., 2012). NS5A-D2 (Con1) possède deux tendances hélicales dans les régions 250-267 et 299-305. NS5A-D3 (Con1) possède deux tendances hélicales en N- et C-terminal dans les régions 360-379 et 442-445.

NS5A-D2 possède des résidus essentiels à la réplication du génome viral (Tellinghuisen et al., 2007). Ross-Thriepfand et al., (2013) ont également montré que ce domaine est nécessaire à la réplication virale, mais non indispensable pour la formation et la libération de virions. Au contraire, NS5A-D3 n'est pas strictement nécessaire à la réplication de l'ARN viral mais est indispensable à l'assemblage des particules virales infectieuses (Appel et al., 2008) (Figure 11).

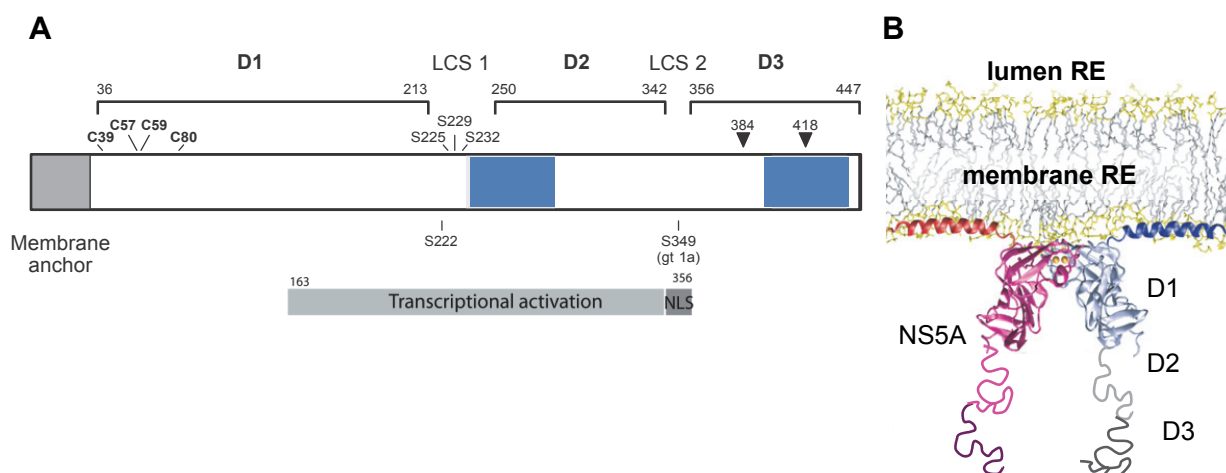


Figure 11. La protéine non structurale NS5A. Adapté de Moradpour and Penin, (2013). A, Représentation schématique de NS5A. La numérotation correspond à la souche Con1 (génotype 1b). L'organisation en trois domaines proposée par Tellinghuisen et al., (2004) est indiquée. Les domaines D1-D2 et D2-D3 sont séparés par des séquences de faibles complexités (LCS) 1 et 2 respectivement. Les résidus de cystéines 39, 57, 59, et 80 permettent de fixer un atome de zinc. L'extrémité N-terminale en hélice alpha amphipathique permettant l'ancrage membranaire est représentée par un rectangle gris. Les résidus de sérines impliqués dans la forme hyperphosphorylée de NS5A sont indiqués (S225, S229, S232). Les résidus de sérine 222 (pour le génotype 1b) et sérine 349 (pour le génotype 1a) sont les sites de phosphorylation de la forme basale de NS5A. Les rectangles bleus sont deux exemples de délétion n'affectant pas la réplication de l'ARN viral (Blight et al., 2000; Appel et al., 2005). Les flèches 384 et 418 représentent les sites d'insertion de la protéine GFP (Moradpour et al., 2004a) permettant de suivre la localisation de NS5A et des complexes de réplication dans le système réplicon sous-génomique du VHC. Le domaine de transactivation avec la région contenant le site de putatif de localisation nucléaire (NLS) sont illustrés par des rectangles gris. B, Forme dimérique de NS5A adapté de Moradpour et al., (2007). L'hélice amphipathique en N-terminal modélisée est suivie de la structure du domaine 1 sous forme de dimère (Tellinghuisen et al., 2005), permettant la fixation d'un atome de zinc. Les domaines 2 et 3 désordonnés de NS5A sont représentés par des traits ayant une conformation aléatoire.

Sur gel SDS-PAGE, NS5A apparaît sous une forme phosphorylée de 56 kDa et une forme hyperphosphorylée de 58 kDa. Les sites d'hyperphosphorylation de NS5A ont été localisés dans une région riche en sérine allant du résidu 221 à 240 (génotype 2a), localisée dans la séquence LCS1. Des analyses réalisées par spectrométrie de masse ont révélé des motifs de phosphorylation complexes dans cette séquence, obtenus par cascade de phosphorylations séquentielles (Ross-Thriepland and Harris, 2014). Des mutations adaptatives ont été identifiées dans la séquence LCS1, correspondant à la perte des sites de phosphorylation. De plus, l'absence de la forme hyperphosphorylée de NS5A due à la présence d'inhibiteurs de kinases (des inhibiteurs de type ATP-compétitive 2,4,5-trisubstitué imidazole) améliore la réplication virale (Neddermann et al., 2004). Ces observations suggèrent que l'état de phosphorylation de NS5A régule les nombreux rôles de cette protéine. De nombreuses kinases ont été identifiées en tant qu'enzymes phosphorylant NS5A, notamment les caséines kinases I et II (CKI et CKII) (Kim et al., 1999 ; Tellinghuisen et al., 2008 ; Masaki et al., 2014), la polo-like kinase (Plk1) (Chen et al.,

2010), la glycogène *synthase kinase 3* (GSK3) et la mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Huang et al., 2007b).

Il a été montré que la phosphorylation du domaine 3 de NS5A est essentielle à la formation des particules virales. La délétion du domaine 3 de NS5A perturbe la co-localisation des protéines NS5A et core au niveau des gouttelettes lipidiques et abolit la formation des particules virales (Appel et al., 2008). Il a été montré que la substitution des résidus de sérine par des alanines au sein de NS5A-D3 (résidus 2428, 2430 et 2433) perturbe la phosphorylation de NS5A. Ceci conduit à une diminution de l'interaction core-NS5A, essentielle à la formation des particules virales (Masaki et al., 2008).

NS5A pourrait jouer un rôle de régulateur de gènes de la cellule hôte. NS5A possède côté C-terminal, un site putatif de localisation nucléaire (NLS) suggérant que NS5A, sous forme tronquée dépourvue d'hélice- α N-terminal, pourrait être transloquée dans le noyau pour utiliser ses propriétés d'activateur de la transcription (Ide et al., 1996). NS5A possède deux régions acides (régions 170-211 et 247-300 pour le génotype 1b) suivies d'une région riche en prolines (région 309-335 génotype 1b) entre les deux séquences LCS. Ce type de séquence primaire est retrouvé chez de nombreux facteurs de transcriptions cellulaires et viraux (Ko, 1991). NS5A pourrait activer le promoteur de l'IL8, une interleukine connue pour réduire l'activité antivirale de l'interféron, (Polyak et al., 2001). NS5A-D2 et D3 ainsi que les séquences LCS possèdent des motifs ProX_{aa}X_{aa}Pro, ces motifs sont connus pour être présents dans de nombreuses protéines de signalisation et pour se lier aux domaines SH3 (*Src-Homology 3*). Les domaines SH3 sont des domaines d'environ 60 acides aminés composés de 6 brins bêta retrouvés dans de nombreuses familles de protéines (PI3 kinases, *Ras GTPase-activating protein*, Bin1...) ayant un rôle dans différentes voies de signalisation cellulaire tels que la transactivation de gènes. Une interaction directe entre NS5A-D2 (étendu aux séquences LCS) et le domaine SH3 de Bin1 (*Bridging integrator protein 1*) a effectivement été mise en évidence par RMN, cependant l'incidence de celle-ci dans la réplication du virus n'a pas été démontrée (Feuerstein et al., 2012). La régulation de gènes par NS5A permettrait d'activer l'expression des facteurs de la cellule hôte nécessaires à la réplication virale.

NS5A interagit avec de nombreuses protéines virales et protéines de la cellule hôte (Tellinghuisen and Rice, 2002; Polyak, 2003; de Chasse et al., 2008). Les différents profils de phosphorylation et la nature désordonnée des domaines 2 et 3 permettent à NS5A d'interagir avec de multiples partenaires, faisant de NS5A « une plateforme » des interactions protéiques. De nombreuses études ont montré que NS5A est impliquée dans la modulation de la réponse

immunitaire, l'apoptose, la croissance cellulaire et différentes voies de signalisations cellulaires (Macdonald, 2004).

2.4.2.6 NS5B

NS5B (68 kDa) est une ARN-dépendante ARN polymérase (RdRp). Elle assure la réplication de l'ARN viral.

➤ Structure

La structure d'NS5B a été déterminée par cristallographie aux rayons X en 1999 (Ago et al., 1999; Bressanelli et al., 1999; Lesburg et al., 1999). NS5B possède une hélice transmembranaire en C-terminal de 21 acides aminés qui lui permet de s'ancrer à la membrane du RE. Cet ancrage n'est pas nécessaire *in vitro* pour l'activité ARN polymérase de NS5B (Lohmann et al., 1997; Yamashita et al., 1998) mais obligatoire *in vivo* pour la réplication du virus en culture cellulaire (Moradpour et al., 2004b). La suppression de la séquence d'insertion membranaire augmente la solubilité et favorise la purification de l'enzyme, ainsi la majorité des études biochimiques et structurales utilisent la forme appelée NS5B Δ 21. NS5B possède une structure tridimensionnelle caractéristique des polymérases dite « en main droite » (Figure 12) constituée de trois sous domaines appelés « doigts », « pouce » et « paume » ainsi qu'un motif G₂₂₀D₃₁₈D₃₁₉ caractéristique du site catalytique des ARN polymérases dépendantes de l'ARN. La plupart des structures publiées ont une conformation dite fermée, les « doigts » et le « pouce » forment un tunnel replié sur la « paume » permettant d'amener l'ARN jusqu'à la « paume » correspondant au site actif de la polymérase (Bressanelli et al., 1999). Le domaine « pouce » correspond à la région C-terminale de l'enzyme et possède un β -hairpin spécifique de la famille du VHC (les *Flaviviridae*) (Lescar and Canard, 2009). Ce β -hairpin (résidus 443-454) localisé dans le domaine « pouce » dépasse vers le site actif de l'enzyme et serait important pour le positionnement de l'extrémité 3' de l'ARN viral pour l'initiation correcte de la réplication. Dans le contexte de la polymérase apo, ce β -hairpin est positionné à l'endroit où l'ARN se fixe (Hong et al., 2001; Zhong et al., 2000). Le site catalytique G₂₂₀D₃₁₈D₃₁₉ se trouve à la jonction entre les 3 domaines.

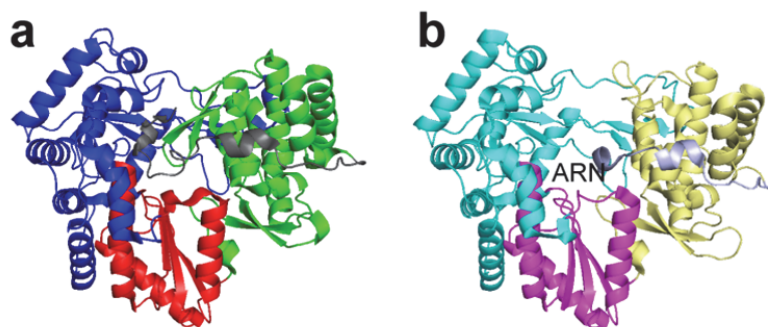


Figure 12. Structure de NS5B (JFH1). a, Structure fermée de NS5B (code pdb : 2XXD) (Schmitt et al., 2011), les trois domaines bleu, rouge et verts sont respectivement les doigts, la paume et le pouce. b, Structure ouverte de NS5B, en présence d'ARN (code pdb : 4E76) (Mosley et al., 2012).

➤ Synthèse de l'ARN viral par NS5B

L'initiation de la synthèse de l'ARN viral par NS5B est une initiation de *novo*, c'est-à-dire amorce indépendante. NS5B interagit avec l'ARN matrice du virus, un nucléotide triphosphate initiateur (NTP_i) et un second NTP (NTP_{i+1}). Il y a formation d'un pont phosphodiester entre le NTP_i et le NTP_{i+1} . Lors de l'initiation NS5B possède une conformation fermée, qui stériquement ne peut pas contenir au sein de son site actif un double brin d'ARN. La plupart des structures de NS5B obtenues par cristallographie ont une conformation fermée de la polymérase. La structure de NS5B de la souche JFH1 possède une conformation plus fermée, ceci serait une des raisons permettant d'expliquer l'efficacité accrue de réplication de la souche JFH1 (Schmitt et al., 2011). En 2012, Mosley et al., ont obtenu une structure de NS5B en conformation plus ouverte avec de nombreux changements conformationnels, permettant la fixation d'un petit ARN double brin. La protéine NS5B utilisée dans cette étude possède une délétion du β -hairpin (Figure 12 b). Cette conformation ouverte correspondrait à celle de l'étape d'élongation. La transition entre l'étape d'initiation (correspondant à la conformation fermée de NS5B) et l'étape d'élongation (correspondant à la conformation ouverte de NS5B) serait une étape clé et cinétiquement limitante. Récemment, Appleby et al., (2015) ont obtenu la structure cristallographique de NS5B en conformation ouverte, sans délétion du β -hairpin, en présence de la matrice d'ARN, de l'amorce dinucléotide et d'un nucléotide UDP (Figure 13). Cette conformation ouverte de NS5B correspond à l'étape précédent celle de l'élongation. La régulation d'ouverture/fermeture de cette enzyme par différents partenaires viraux et cellulaires tels que NS5A et la CypA reste à déterminer.

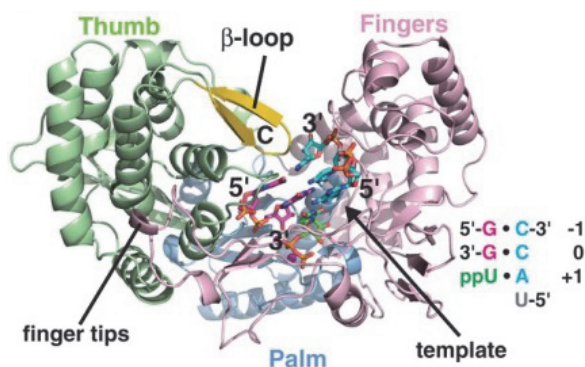


Figure 13. Structure de NS5B en conformation ouverte lors de l'étape précédant celle de l'élongation (Appleby et al., 2015). La protéine est coloré en fonction des sous domaines (rose, les doigts ; bleu, la paume ; vert, le pouce), avec le β -hairpin en jaune. L'ARN matrice 5'-UACC est en bleu, l'amorce dinucléotide 5'-pGG est en magenta, et le nucléotide UDP en vert.

2.5 Facteurs cellulaires nécessaires à la réplication du VHC

2.5.1 Régulation du VHC par des facteurs de la cellule hôte

Outre les protéines virales, de nombreux facteurs de la cellule hôte sont indispensables à la réplication virale. Plus de 500 interactions entre des protéines du VHC et des protéines de l'hôte ont été mises en évidence par différentes méthodes de détection des interactions protéines-protéines (GST pull down, co-immunoprécipitation, double hybride, RMN, ITC, SPR...). La base de donnée HCV pro : <http://cbrc.kaust.edu.sa/hcvpro/index.php> (Kwofie et al., 2011) répertorie l'ensemble des interactions protéines du VHC – protéines de l'hôte connues dans la littérature.

Le métabolisme glucido-lipidique de la cellule hôte est essentiel à différentes étapes de cycle de vie du VHC. De manière non exhaustive, des screens réalisés par *siRNA* ont mis en évidence le rôle essentiel du facteur de l'hôte, la phosphatidylinositol 4-kinase III alpha (PI4KIII α) pour la réplication virale. Le *knock-down* de l'expression de PI4KIII α perturbe la formation d'un réseau membranaire indispensable à la réplication de l'ARN viral. NS5A stimule la PI4KIII α et la production de PI4P nécessaire à la formation du complexe de réplication (Berger et al., 2011). Récemment, il a été montré par des expériences de co-immunoprécipitation que NS5A entière interagit avec l'hexokinase 2 humaine, la première enzyme limitante de la glycolyse. Cette interaction permet d'activer l'hexokinase 2 et augmente le flux glycolytique dans la cellule hôte nécessaire à la réplication virale (Ramiere et al., 2014) (section 5.4).

Un autre facteur cellulaire essentiel pour la réplication de l'ARN viral est la Cyclophiline A. Il a été montré par RMN dans notre laboratoire que les domaines D2 et D3 désordonnés de NS5A interagissent directement avec la CypA et que ces domaines sont des sites substrats pour son activité PPIase (Hanouille et al., 2009b ; Hanouille et al., 2010).

2.5.2 La Cyclophiline A est un cofacteur essentiel à la réplication du VHC

2.5.2.1 Caractérisation des Cyclophilines

Les Cyclophilines humaines (CypA, CypB, CypC, CypD, Cyp40...) possèdent une homologie de séquence primaire et une structure tridimensionnelle très conservée. Elles diffèrent par leurs localisations cellulaires ainsi que par leur abondance relative au sein de la cellule. Elles se caractérisent par leur capacité à fixer la Cyclosporine A (CsA), un inhibiteur connu des Cyclophilines, et par leur activité peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase (PPIase). Elles forment avec les FKBP (FK506-*binding proteins*) la famille des Immunophilines. Les FKBP ont également une activité PPIase mais fixent d'autres molécules immunosuppressives, le FK506 et la Rapamycine (Schreiber, 1991; Ryffel, 1993; Galat, 1999).

La première Cyclophiline décrite est la Cyclophiline A, la plus abondante dans la cellule, elle est principalement localisée dans le cytosol (Handschumacher et al., 1984; Harding et al., 1986). Sa structure a été déterminée par cristallographie aux rayons X pour la première fois en 1991 (Figure 14). Elle adopte une structure en tonneau composée de 8 feuillets β antiparallèles, fermée par deux hélices alpha. Les brins B3 à B6 ainsi qu'une boucle allant de K118 à H126 forment une poche hydrophobe constituant le site de liaison à la CsA et le site catalytique PPIase (Ke et al., 1991).

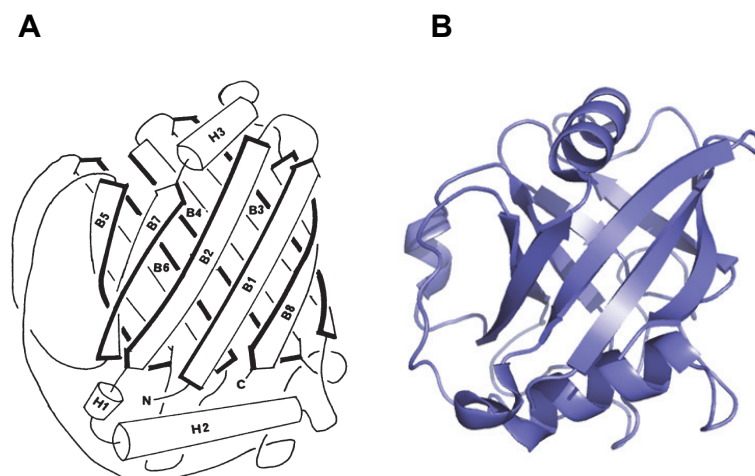


Figure 14. Représentation schématique A, et représentation «cartoon» B, de la Cyclophiline A. (Ke et al., 1991)

La CypA possède la structure de base des Cyclophilines sur laquelle viennent se greffer des extensions N-terminale et C-terminale spécifiques des autres membres de la famille. Ces différences structurales leur confèrent des localisations subcellulaires différentes. La Cyclophiline B (CypB), décrite en 1991 par Spik et al., est principalement localisée dans les vésicules du RE (Arber et al., 1992), et elle est exprimée à des taux 5 à 10 fois inférieurs à la CypA. Elle possède 65 % d'identité de séquence avec la CypA. D'autres membres de la famille des Cyclophilines ont été décrits, dont la Cyclophiline C (CypC) (Friedman and Weissman, 1991), principalement localisée dans le rein, elle possède 48 % d'identité de séquence avec la CypA. La Cyclophiline D (CypD) est localisée dans la mitochondrie et possède 76 % d'identité avec la CypA (Bergsma et al., 1991).

2.5.2.2 L'activité PPIase des Cyclophilines

L'activité PPIase des Cyclophilines correspond à l'isomérisation *cis/trans* de la liaison peptidique précédant un résidu de proline (Fischer et al., 1984; Takahashi et al., 1989) (Figure 15).

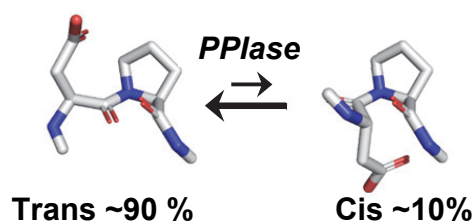


Figure 15. Activité PPIase de la Cyclophiline : accélération de l'isomérisation *cis/trans* de la liaison peptidique précédant un résidu de proline. Les rapports indiqués sont caractéristiques d'un peptide ou d'une protéine désordonnée.

Les acides aminés sont majoritairement sous conformation *trans* dans le squelette peptidique. En moyenne, pour un peptide ou une protéine désordonnée le ratio *cis/trans* est de 0,1 % de conformation *cis* et 99,9 % de conformation *trans*. La proline est le seul acide aminé dont la chaîne latérale forme un cycle avec le squelette peptidique. Cette structure confère à la proline la remarquable propriété d'être représentée au sein des protéines sous formes de deux conformères limites et stables, les conformères *cis* et *trans* qui s'interconvertissent par simple rotation autour de la liaison peptidique qui la précède. Le ratio *cis/trans* d'une liaison peptidique X_{aa}-Pro, pour un peptide ou une protéine désordonnée est beaucoup plus élevé par rapport aux autres liaisons peptidiques, il peut varier de 10 à 30 % de conformation *cis* en fonction de la nature la liaison X_{aa}-Pro. Le ratio le plus élevé est observé lorsque l'acide aminé en i-1 de la proline est un acide aminé aromatique. L'isomérisation *cis/trans* de la liaison X_{aa}-Pro est un événement moléculaire lent (de l'ordre de la minute) mais essentiel, ce qui explique l'intervention d'enzymes spécialisées qui catalysent cette isomérisation. Camilloni et al ont récemment étudié le mécanisme d'action de la CypA. Grâce à des mesures RMN et des simulations de dynamiques moléculaires, ils ont pu montrer que la CypA catalyse l'isomérisation de la liaison peptidique précédant un résidu de proline par un mécanisme dit « *electrostatic handle* » où rien n'est covalent. Dans ce mécanisme, l'enzyme PPIase crée un environnement électrostatique au niveau du site catalytique qui provoque la rotation de la liaison peptidique du substrat en « tirant » le dipôle électrique du groupement carbonyle de la liaison peptidique (Camilloni et al., 2014).

Les Cyclophilines, sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques comme la réponse immunitaire, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, le repliement des protéines, mais également dans le cycle de réplication de plusieurs virus dont le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'hépatite C (VHC).

La liaison et l'activité enzymatique des PPIases sont en soi étroitement couplées, soulevant la question de leurs rôles respectifs dans les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées (Fischer et al., 1998). Dans le cas de l'infection d'*Escherichia coli* par le phage filamenteux fd, il semble que la Cyclophiline 18 régule l'isomérisation *cis/trans* de la Proline 213 (Eckert et al., 2005; Weininger et al., 2009). Tandis que dans le cas de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), il semble que ce soit la liaison de la CypA à une unique proline en conformation *trans* (Pro 90) de la protéine de capsid Gag du VIH qui soit importante pour la réplication (Gamble et al., 1996).

2.5.2.3 La Cyclophiline A est un cofacteur indispensable à la réplication du VHC

La CsA inhibe la réplication du VHC. Les études *in vitro* sur la CsA et ses dérivés ont montré une corrélation entre l'inhibition de la réplication de l'ARN du VHC et la liaison des dérivés de la CsA à la Cyclophiline (Ma et al., 2006), suggérant que les Cyclophilines sont les cibles directes de l'action inhibitrice de la CsA sur la réplication virale. Cette découverte a permis de montrer que les Cyclophilines sont essentielles pour la réplication du VHC (Ma et al., 2006; Watashi et al., 2005). C'est la Cyclophiline B qui initialement fut décrite comme le principal isoforme nécessaire pour la réplication du VHC. Watashi et al., en 2005 ont montré que la CypB interagissait avec NS5B et qu'elle pouvait moduler la capacité de l'ARN polymérase à lier les ARN. Ces résultats ont permis de proposer un mécanisme moléculaire de l'action anti-VHC de la Cyclosporine A qui avait été observée bien plus tôt (Nakagawa et al., 2004). Cependant des données plus récentes, issues de plusieurs laboratoires, ont montré que l'isoforme le plus important pour la réplication du VHC est la CypA (Yang et al., 2008; Kaul et al., 2009). Les auteurs ont montré que l'extinction de l'expression des gènes, CypB ou CypC, par *siRNA* n'avait pas d'effets sur la réplication du VHC contrairement à l'extinction du gène de la CypA.

2.6 Le cycle viral du VHC

Le cycle viral du VHC peut être divisé en plusieurs étapes comme illustré sur la Figure 16. Les hépatocytes sont les cellules cibles préférentielles du VHC, mais d'autres types cellulaires peuvent être infectés, telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes B.

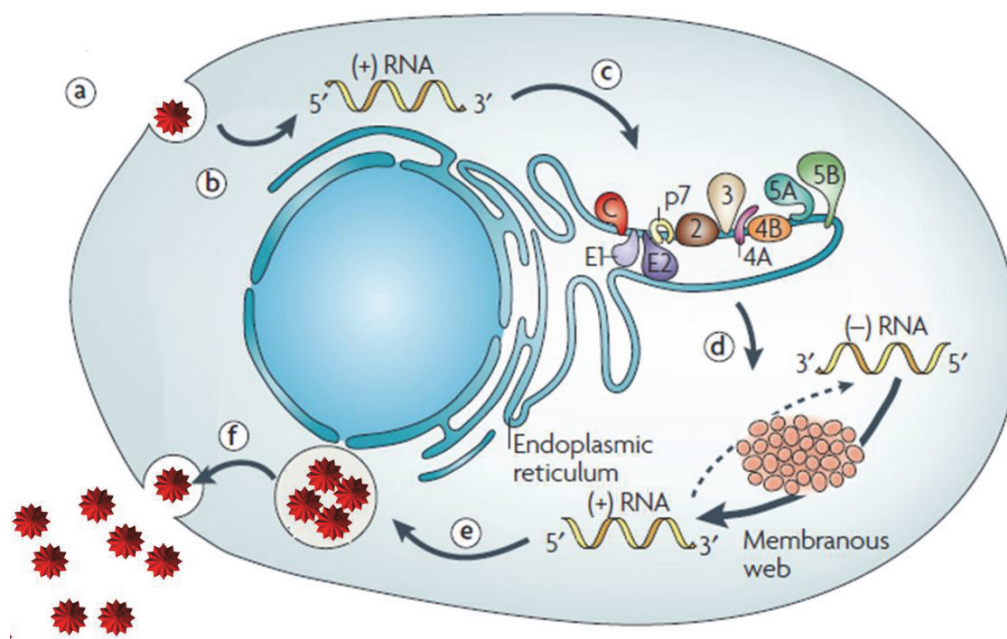


Figure 16. Cycle viral du VHC (Moradpour et al., 2007). a, Fixation et internalisation. b, décapsulation et libération de l'ARN viral. c, Traduction et maturation de la polyprotéine. d, Réplication de l'ARN viral. e, Assemblage de nouveaux virions. f, Maturation et sécrétion des nouveaux virions.

2.6.1 L'entrée virale

L'entrée du VHC est un processus complexe impliquant plusieurs facteurs cellulaires. Cette étape est hautement dynamique et finement orchestrée dans le temps et l'espace. Le virus s'attache par ses glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 aux récepteurs localisés à la surface de la cellule hôte. Plusieurs récepteurs ont été identifiés tels que les glycosaminoglycane (GAGs) (Barth et al., 2003), les lectines (Gardner et al., 2003) et le récepteur aux LDL (LDL-R). Le LDL-R est un récepteur de surface des hépatocytes qui interagit avec les lipoprotéines afin de réguler le métabolisme des lipides. Le VHC circulant sous forme de lipo-viro-particules dans le sang, il se fixerait aux cellules par ce récepteur (Agnello et al., 1999). Des récepteurs spécifiques ont également été identifiés tels que la tétraspanine CD81 (récepteur spécifique de la glycoprotéine E2) (Pileri et al., 1998), le récepteur *scavenger* classe B type I (SR-BI) (Scarselli et al., 2002) et deux protéines localisées dans les jonctions cellulaires la claudine-1 (CLDN1) et l'occludine (OCLN) (Liu et al., 2009a). L'interaction avec ces récepteurs spécifiques mène à l'internalisation de la particule virale par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine, l'acidification de l'endosome provoque la fusion de la membrane endosomale et de l'enveloppe virale. Le génome viral est ainsi libéré dans le cytosol (Moradpour et al., 2007).

2.6.2 Traduction de l'ARN viral et maturation de la polyprotéine

L'ARN viral simple brin de polarité positive se comporte comme un ARN messager (ARNm) et est traduit en une unique polyprotéine de 3000 acides aminés par la machinerie de la cellule hôte. La traduction a lieu en étroite association avec la membrane du RE. Le clivage de la polyprotéine immature est assuré par des protéases cellulaires et virales. Les protéases cellulaires (signal peptidase et signal-peptide peptidase) assurent le clivage des 3 protéines structurales et de p7, et les protéases virales (NS2 et NS3-4A) assurent le clivage des protéines non structurales de NS3 à NS5B. Ces différents clivages sont à l'origine des protéines virales fonctionnelles associées à la membrane du RE (Moradpour et al., 2007).

2.6.3 Réplication de l'ARN du VHC

Le VHC, comme tous les virus à ARN simple brin de polarité positive, forme un complexe de réplication avec les protéines non structurales néosynthétisées associées aux membranes cellulaires (Salonen et al., 2005). La réplication commence par la synthèse, par NS5B, d'un brin d'ARN négatif complémentaire du brin d'ARN positif, qui sera la matrice pour la réplication du génome en de multiples copies. Ces brins d'ARN positifs nouvellement synthétisés serviront soit à la synthèse des protéines virales, soit à l'encapsidation dans de nouvelles particules virales. Les protéines non structurales, associées à la membrane du RE, forment le complexe de réplication. Des altérations spécifiques des membranes cellulaires au niveau du RE, appelées « *membranous web* » ont été identifiées comme étant les sites de réplication de l'ARN viral (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). Bien que le mécanisme de la régulation de la synthèse de l'ARN viral ne soit pas encore entièrement élucidé, un nombre important de facteurs viraux mais aussi de facteurs de la cellule hôte ont été identifiés en tant que régulateurs de la réplication de l'ARN viral.

2.6.3.1 Le complexe de réplication

L'expression des protéines non structurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) est nécessaire et suffisante à la réplication de l'ARN du VHC (Lohmann et al., 1999). De nombreuses interactions protéine-protéine ont été décrites mettant en évidence que les protéines non structurales étaient capables d'interagir les unes avec les autres de manière directe ou par l'intermédiaire de complexes (Dimitrova et al., 2003) formant ainsi un complexe protéique hautement ordonné nécessaire à la réplication de l'ARN viral.

2.6.3.2 Le « membranous web »

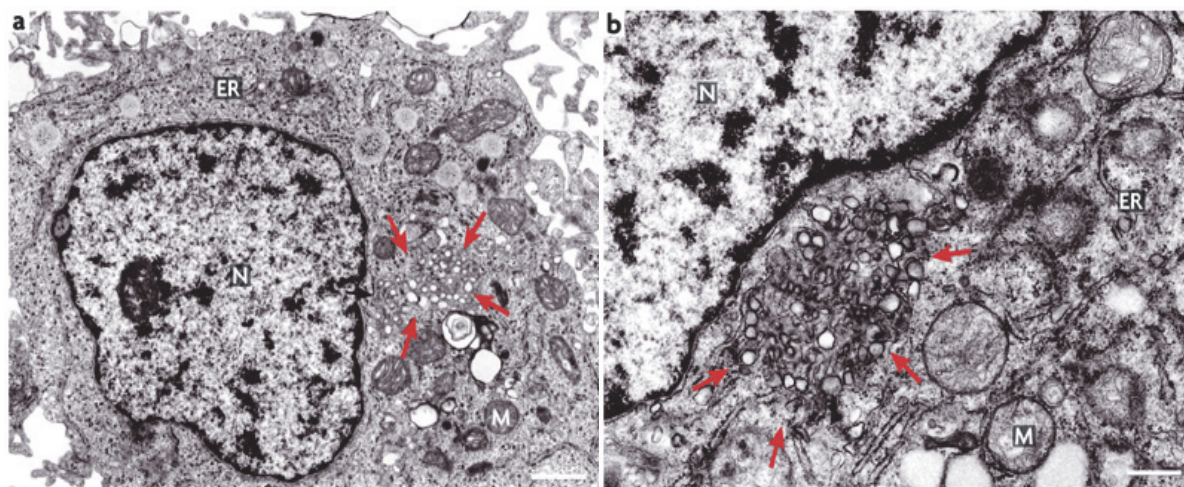


Figure 17. « *Membranous web* » observé en microscopie électronique. (Moradpour et al., 2007) a, observation de cellules Huh-7 répliquant le réplicon sous-génomique du VHC. Des altérations membranaires sont observées à proximité du noyau, nommées « *membranous web* » (flèches). La barre d'échelle représente 1 μ m. B, Grossissement de la zone « *membranous web* » composé de petites vésicules intégrées dans une matrice membranaire situé à proximité du RE. La barre d'échelle représente 500 nm. Le « *membranous web* » contient toute les protéines non structurales et l'ARN néosynthétisé. ER, *endoplasmic reticulum* ; M, mitochondrie ; N, noyau.

L'infection par le VHC mène à la formation et à l'accumulation de vésicules particulières dérivées du RE pour former un réseau membranaire appelé « *membranous web* » où est localisé le complexe de réplication du VHC (Figure 17). Ce réseau membranaire a été mis en évidence pour la première fois en 2002 par microscopie électronique (Egger et al., 2002) par expression des protéines virales dans des lignées cellulaires sans réplication de l'ARN viral. Ceci a été confirmé par d'autres modèles d'études *in vitro* (voir paragraphe 2.7.1), le réplicon sous-génomique du VHC (Gosert et al., 2003) et le modèle *HCVcc* (Rouillé et al., 2006). La localisation des protéines non structurales par immunofluorescence a révélé leur distribution au sein de ce réseau membranaire avec de l'ARN nouvellement formé (Gosert et al., 2003). Il a été montré que ce réseau membranaire dérive du RE où les protéines virales sont exprimées. Par analogie avec les virus de la même famille, il semble que ces vésicules membranaires sont des invaginations de la membrane du RE, connectées avec le cytoplasme par de petits pores permettant l'échange de petites molécules non perméables à la membrane comme des nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ARN (Welsch et al., 2009). Il a été montré que la majorité des membranes issues d'une altération par l'infection du VHC n'était pas des vésicules composées d'une membrane unique. Ce serait des structures plus complexes composées de deux ou plusieurs membranes nommé respectivement DMV (*double-membrane vesicles*) et MMV (*multi-membrane vesicles*) (Ferrari et al., 2008; Reiss et al., 2011). L'ARN viral et les protéines NS

retrouvées à l'intérieur de ces DMVs ainsi que leur abondance en corrélation avec le taux de réplication de l'ARN viral, montre leur rôle fonctionnel. (Romero-Brey et al., 2012).

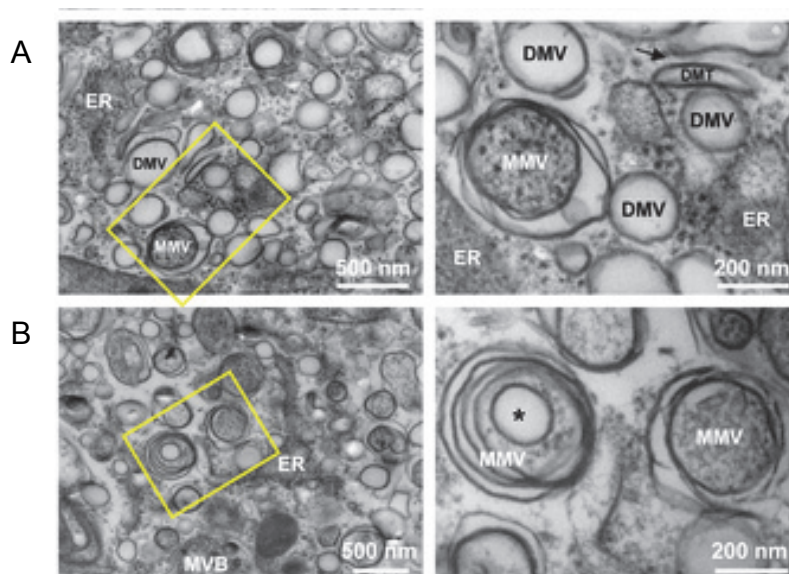


Figure 18. Observation en microscopie électronique de DMVs et MMVs (Romero-Brey et al., 2012). A, 36h et B, 48h après infection par l'ARN bicistronique du système réplicon sous-génomique du VHC. Les carrés jaunes indiquent la zone montrée sur la droite à un plus fort grossissement. DMV, *Double Membrane Vesicles* ; MMV, *Multi Membrane Vesicles* ; ER, *Endoplasmic Reticulum*.

➤ Morphogénèse du « *membranous web* » : facteurs viraux

NS4B a été identifiée comme étant la principale protéine responsable de la mise en place du « *membranous web* », en effet son expression seule induit la formation des mêmes structures que lorsque l'ensemble des protéines NS sont exprimées (Egger et al., 2002). L'oligomérisation de NS4B pourrait déclencher la formation des membranes vésiculaires (Paul et al., 2011). Il a en effet été montré que des mutations au sein de NS4B empêchant son oligomérisation génèrent des structures DMVs anormales (Paul et al., 2011). NS4B ne serait pas la seule protéine responsable de la morphogénèse du « *membranous web* », en effet l'expression seule de NS3-4A, NS5A et NS5B donnent également des réarrangements vésiculaires (Romero-Brey et al., 2012). NS3-4A, et NS5B induisent des vésicules composées d'une membrane unique, différentes des DMVs et MMVs observés lors de l'expression complète des protéines de NS3 à NS5B (Romero-Brey et al., 2012). Par opposition, NS5A induit la formation de vésicules contenant plusieurs bicouches lipidiques et occasionnellement des structures semblables au DMVs (Romero-Brey et al., 2012). La formation de ces DMVs et MMVs est complexe et engage une action conjointe de plusieurs protéines non-structurales.

➤ Morphogénèse du « *membranous web* » : facteurs cellulaires

Des études ont montré la contribution de nombreux facteurs de la cellule hôte dans la formation du « *membranous web* ». La phosphatidylinositol 4-kinase III alpha (PI4KIII α) a été identifiée par *siRNA* comme un facteur cellulaire essentiel pour la réplication de l'ARN du VHC (Tai et al., 2009; Reiss et al., 2011). Elle est recrutée par le domaine 1 de NS5A. Cette interaction favorise son activité de kinase lipidique, permettant d'augmenter le taux de phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) intracellulaire nécessaire à la formation du réseau membranaire (Berger et al., 2011). La formation des DMVs est inhibée par des inhibiteurs de Cyclophiline et de NS5A. Par contre les inhibiteurs de NS5B, ou de mir 122 n'empêchent pas la formation des DMVs (Chatterji et al., 2015). Par ailleurs, la réplication du cycle cellulaire du VHC est dépendante des lipides de la cellule hôte (Alvisi et al., 2011). Le VHC perturbe l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, ce qui induit une accumulation intracellulaire de lipides nécessaires à la réplication de l'ARN viral (Diamond et al., 2010).

2.6.3.3 Le mécanisme de réplication

➤ Facteurs viraux

Le mécanisme de réplication de l'ARN viral orchestré par le complexe de réplication n'est pas encore entièrement élucidé. L'environnement membranaire procuré par le « *membranous web* » serait favorable aux interactions protéines-protéines nécessaires à la réplication de l'ARN viral. L'activité hélicase/NTPase de la protéine NS3 servirait à séparer les brins d'ARN positifs et négatifs de l'ARN viral et à abolir les structures secondaires des ARN (IRES et régions X de l'extrémité 3' non codante) permettant ainsi à l'ARN polymérase NS5B d'accéder aux structures très repliées de l'ARN.

NS5A joue aussi un rôle essentiel dans la réplication du VHC, cependant sa fonction dans le cadre de la réplication de l'ARN viral est mal connue. Il a été montré que cette protéine est indispensable à la réplication du génome viral notamment via son interaction avec l'ARN viral au niveau de son domaine D1 (Tellinghuisen et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2005; Love et al., 2009). Le domaine 2 de NS5A est également indispensable à la réplication du génome du VHC, et possède des résidus essentiels à la réplication virale (Tellinghuisen et al., 2007).

➤ Facteurs de la cellule hôte

De nombreuses protéines cellulaires interviennent dans la réplication de l'ARN. En effet, des études ont montré l'importance de nombreuses protéines cellulaires dans le mécanisme de réplication de l'ARN, notamment le rôle de protéines appartenant à la famille des Immunophilines (Watashi et al., 2005; Okamoto et al., 2006).

La CypA est requise pour la réplication du VHC (Kaul et al., 2009; Chatterji et al., 2009; Yang et al., 2008). FKBP8, une protéine appartenant à la famille des *FK506-binding protein* (FKBP), et la protéine chaperonne Hsp90, formeraient un complexe avec la protéine NS5A qui aurait un rôle important dans la réplication de l'ARN viral (Okamoto et al., 2006).

2.6.4 Assemblage et sécrétion

L'association de core avec les gouttelettes lipidiques semble essentielle pour l'étape d'assemblage (Shavinskaya et al., 2007; Boulant et al., 2007). Après son clivage par la signal peptidase, core est relocalisée des membranes du RE vers les gouttelettes lipidiques (McLauchlan et al., 2002), et recouvre ensuite progressivement la surface de la gouttelette lipidique via son domaine D2 (Boulant et al., 2006). NS5A est également indispensable à l'assemblage des particules virales (Appel et al., 2008) via une interaction avec core. Une des hypothèses permettant d'expliquer le mécanisme d'assemblage de la particule virale est que l'ARN nouvellement synthétisé serait transporté, par un mécanisme non identifié, à proximité des gouttelettes lipidiques et de core via son interaction avec NS5A (Appel et al., 2008). Ceci aboutirait à l'encapsidation de l'ARN du VHC. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'incorporation des lipides et l'enveloppement de la nucléocapside (Bartenschlager et al., 2011; Tews et al., 2010). La nucléocapside nouvellement formée bourgeonne au niveau de la membrane du RE, et acquiert ainsi son enveloppe virale avec les glycoprotéines E1 et E2. Enfin, plusieurs études ont montré que la maturation et la sécrétion des particules virales sont liées à la voie de biosynthèse des VLDL (Chang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009; Gastaminza et al., 2008; Huang et al., 2007a).

2.7 Les modèles et systèmes d'études

Les progrès dans la connaissance du cycle viral du VHC ont été ralentis par l'absence de modèle de réplication de ce virus et de modèle d'infection. Le développement de ces modèles a été relativement lent, soulignant la difficulté de répliquer ce virus en culture cellulaire ou chez l'animal. Les paragraphes suivants illustrent les différents modèles d'études du VHC.

2.7.1 Les modèles d'étude *in vitro*

➤ Particules rétrovirales et pseudotypées, *HCVpp*

Le développement des particules rétrovirales pseudotypées, *HCVpp*, a permis de mieux comprendre les premières étapes de l'infection par le VHC (Bartosch et al., 2003; Drummer et al., 2003; Hsu et al., 2003). Les *HCVpp* sont constituées d'une capsidie rétrovirale entourée d'une enveloppe dans laquelle sont assemblés les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC. Les *HCVpp* ne permettent pas l'étude du cycle viral complet car elles ne sont pas répliquatives.

➤ Réplicons génomiques et sous génomiques

Le développement du système réplicon sous-génomique a permis l'étude de la réplication du VHC (Lohmann et al., 1999). Un réplicon est un acide nucléique (ARN ou ADN) capable de se répliquer de façon autonome. Le premier réplicon sous-génomique mis au point est basé sur le génotype 1b de la souche Con1. La région codant pour les protéines structurales (Core, E1, E2 et p7) n'est pas présente au sein du réplicon. On insère à la suite de l'IRES du VHC, deux éléments hétérologues, un gène de résistance à un antibiotique, la néomycine, et l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). L'ARN ainsi construit est un ARN bicistronique, contenant deux séquences IRES, l'IRES du VHC contrôle l'expression du gène de résistance à la néomycine, et celui de l'ECMV contrôle celle des protéines non structurales du VHC. La structure de ce réplicon est présentée Figure 19. Ce réplicon est transfecté dans des cellules humaines d'origine hépatocytaires (Huh-7) et sa sélection par la néomycine permet d'obtenir des clones cellulaires avec un taux de réplication élevé. Les réplicons sous-génomiques portant les protéines NS3 à NS5B se répliquent avec efficacité, la protéine NS2 n'est donc pas nécessaire à la réplication (Lohmann et al., 1999). Après plusieurs passages en culture cellulaire, des mutations d'adaptation ont été identifiées notamment dans NS5A (Blight et al., 2000). Certaines de ces mutations adaptatives peuvent augmenter le taux de répliquations jusqu'à 500 fois (Blight et al., 2000). Grâce au système réplicon, le complexe de réplication du VHC a pu être observé en insérant une GFP (*Green fluorescent protein*) à NS5A.

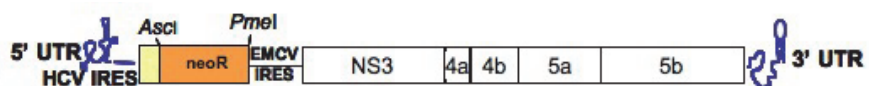


Figure 19. Représentation schématique de réplicons du VHC. Réplicon sous-génomique du VHC. Le marqueur de sélection à la néomycine est sous le contrôle de l'IRES du VHC, et les protéines virales de NS3 à NS5B sont sous le contrôle de l'IRES de l'EMCV.

➤ *Production de particules virales complète du VHC en culture cellulaire, HCVcc*

La dernière avancée majeure concerne le développement d'un système de propagation du VHC en culture cellulaire. Au cours du développement du système de réplicon sous-génomique, un clone viral a été isolé chez un patient souffrant d'une hépatite fulminante de génotype 2a. (Kato et al., 2001). Ce clone, désigné JFH1 (pour *Japanese Fulminant Hepatitis-1*), est capable de se répliquer de manière très efficace sans pression de sélection à la néomycine dans le système réplicon sous-génomique. En utilisant ce clone JFH1, trois laboratoires différents ont été capables de développer un virus complet capable de se répliquer, d'infecter de nouvelles cellules Huh7 et donc de produire des particules virales infectieuses dans le surnagent, reproduisant ainsi le cycle complet du VHC *in vitro* (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Ce système de culture cellulaire *HCVcc* basé sur la transfection de l'ARN viral JFH1 dans des cellules Huh7 produit des particules virales infectieuses capables d'infecter des cellules naïves Huh7, mais aussi des hépatocytes de chimpanzés et des souris possédant un foie chimérique susceptible à l'infection par le VHC. Ce système permet désormais d'étudier le cycle viral complet du VHC.

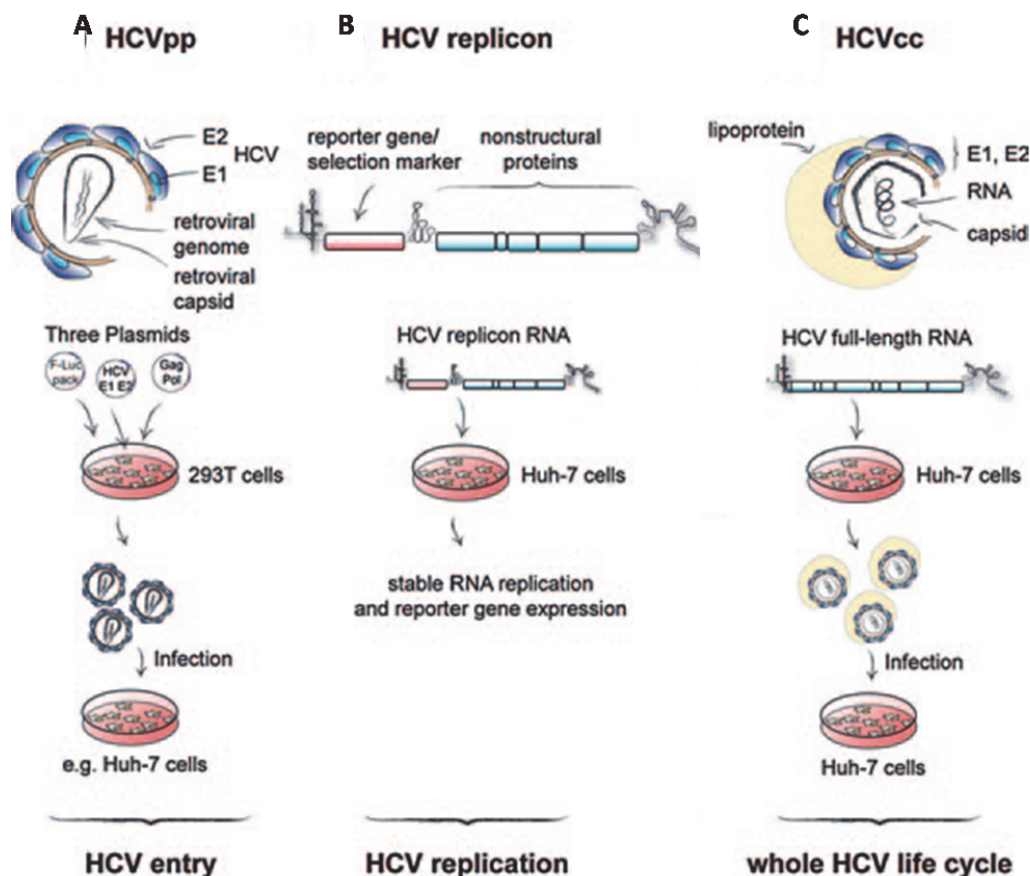


Figure 20. Modèles d'études du VHC *in vitro* permettant d'étudier différentes étapes du cycle (Steinmann and Pietschmann, 2013). A, Les premières étapes de l'infection par le VHC peuvent être étudiées avec le modèle *HCVpp*. Les pseudo-particules sont produites par transfection de 3 plasmides dans des cellules HEK-293T (le premier codant pour les protéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC, le deuxième codant les gènes gag et pol d'un rétrovirus comme le VIH, et le troisième code pour un rétrovirus contenant un gène rapporteur (luciférase). Les *HCVpp* sécrétées dans le milieu de culture vont ensuite infecter des cellules Huh-7, l'expression du gène rapporteur (luciférase) permet de quantifier l'infection. B, Le taux de réplication de l'ARN peut être quantifié avec le modèle réplicon sous-génomique. L'ARN du VHC ayant une réplication autonome est associé à un gène rapporteur (luciférase) ou un gène de résistance à un antibiotique (néomycine) remplaçant la région codant pour les protéines Core à NS2 devant un second IRES venant de l'EMCV, permettant la traduction des protéines non structurales NS3 à NS5B. Après transfection, l'ARN viral est directement traduit et le taux de réplication peut être quantifié par l'expression d'un gène rapporteur comme la luciférase. C, Le système de production des *HCVcc* permet l'étude du cycle viral complet. Le génome viral (génotype 2a de la souche JFH1) est transfecté dans des cellules Huh-7, conduisant à la traduction, la réplication de l'ARN viral et à la production de particules virales capables d'infecter de nouvelles cellules.

2.7.2 Les modèles d'études *in vivo*

➤ *Le chimpanzé*

Le VHC est capable d'infecter uniquement les primates supérieurs. Le chimpanzé fut le premier modèle animal utilisé pour étudier l'infection par le VHC. Ce modèle a permis d'identifier et cloner le VHC (Choo et al., 1989), mais aussi d'obtenir des informations importantes sur la

physiopathologie de l'infection virale. L'inoculation des chimpanzés a permis d'obtenir des informations sur les phases précoces de l'infection virale (Sakai et al., 2003), la réponse immunitaire (Bukh et al., 2010), les thérapies antivirales (Carroll et al., 2009; Forns et al., 2000). Cependant, ce modèle d'étude possède de nombreuses limites. En effet les chimpanzés infectés par le virus de l'hépatite C ne développent que très rarement une hépatite C chronique, ce qui ne permet pas d'étudier la pathogénèse du VHC chez ce modèle. De plus ce modèle est coûteux et pour des raisons éthiques, il est de moins en moins utilisé. D'autres modèles animaux existent tels que le Tupaia (*Tupaia belangeri*) et le modèle murin. Le modèle *in vivo* le plus prometteur est celui des souris transgéniques et des souris humanisées.

➤ *Le modèle des souris transgéniques*

Le développement des souris transgéniques, permettant d'insérer des gènes exprimant les protéines du VHC, a été une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions entre le virus et la cellule hôte (Lerat et al., 2002; Honda et al., 1999; Honda et al., 2000). Comme le VHC n'infecte pas les souris, des souris transgéniques repeuplées avec des cellules d'hépatocytes humains ont été développées.

➤ *Le modèle de souris humanisées*

Mercer et al ont croisé des souris transgéniques surexprimant l'«*urokinase plasminogen activator*» (uPA) (ces souris ont une atrophie hépatocellulaire) avec des souris immunodéficiente (SCID), afin de générer des souris transgéniques SCID/uPA. Des hépatocytes humains peuvent alors y être transplantés, et le foie ainsi obtenu peut être infecté par le VHC par injection de sérum humain contenant le VHC. Le VHC peut se répliquer dans le foie «humanisé» des souris (Mercer et al., 2001). Ce modèle a permis d'étudier des agents-antiviraux, les interactions virus-hôte dans un modèle *in vivo* utilisant des hépatocytes humains. Depuis, de nouveaux modèles de souris humanisées ont été développés permettant d'étudier des stratégies de vaccination, l'immunité, l'entrée du VHC (Dorner and Ploss, 2011; Vercauteren et al., 2014).

3 Les traitements contre l'infection par le VHC

Il n'existe pas de vaccin pour lutter contre l'hépatite C, le meilleur moyen pour lutter contre l'infection est la prévention. Le traitement de référence jusqu'en 2011 était basé exclusivement sur la combinaison d'interféron pegylé (PEG-IFN- α) et de Ribavirine. Ce traitement est peu efficace et possède de nombreux effets secondaires. Les traitements ont considérablement progressé ces quatre dernières années (Figure 21), les traitements actuels sont devenus très efficaces. Une thérapie sans interféron (IFN) avec une combinaison de molécules antivirales permet d'augmenter la tolérance au traitement et d'obtenir 90 % à 100 % de guérison. Cependant le diagnostic de la maladie et les traitements sont difficiles d'accès. Le coût des traitements est un frein pour leur utilisation dans les pays économiquement faibles où la prévalence de l'infection est élevée.

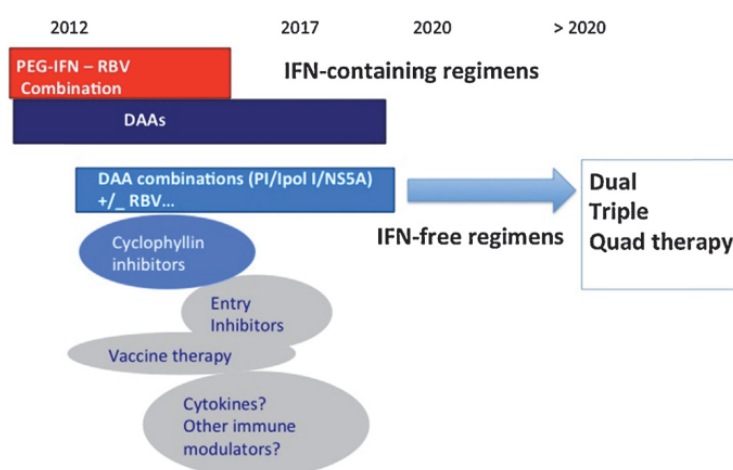


Figure 21. Progrès thérapeutique dans le traitement du virus de l'hépatite C (Pol and Corouge, 2014).

3.1 Le traitement de référence jusqu'en 2011

L'interféron a été initialement utilisé en monothérapie, son utilisation remonte à 1984. L'IFN est une protéine de la famille des cytokines, naturellement produite par les cellules du système immunitaire en réponse à la présence d'agents étrangers dans l'organisme. L'IFN a pour rôle de défendre l'organisme face aux virus et bactéries pathogènes en augmentant la réponse immunitaire. En 1990, l'association de l'IFN à la Ribavirine (RBV), un analogue nucléosidique de la guanosine, a permis d'améliorer l'efficacité du traitement. Le mécanisme d'action de la RBV n'est pas encore bien connu, la RBV possède une activité antivirale sur de nombreux virus.

La pégylation de l'IFN (fixation d'une molécule de polyéthylène-glycol à la molécule d'IFN) a également permis d'améliorer la thérapie, en augmentant la durée de vie du médicament, ce qui a permis de réduire le nombre d'injection. Ainsi, jusqu'en 2011, le traitement standard pour traiter l'infection par le VHC était basé exclusivement sur la combinaison de PEG-IFN- α , administré sous forme d'une injection par semaine, et de Ribavirine, administrée sous forme de comprimé deux fois par jour (Sarrazin et al., 2012). Ces molécules sont administrées pendant 48 semaines (pour les génotypes 1, 4, 5, et 6), ou pendant 24 semaines (pour les génotypes 2 et 3). Les patients infectés par les génotypes 2 ou 3 répondent favorablement à ce traitement dans 80 % des cas, tandis que ceux infectés par les génotypes 1 n'y répondent favorablement que dans 40 à 50 % des cas (Pawlotsky, 2006). L'efficacité du traitement chez les patients est vérifiée par l'absence d'ARN du VHC dans le sérum des patients, 24 mois après l'arrêt du traitement. Ce traitement possède de nombreux effets indésirables (fatigue, nausées, fièvre, perte de poids, dépression, symptôme grippal ...) (Pawlotsky, 2006).

Les effets secondaires et l'efficacité limitée de la bithérapie PEG-IFN- α + Ribavirine notamment pour le génotype 1 ont conduit à la recherche d'autres traitements. La résolution de structures tridimensionnelles de protéines du VHC associée au développement de cultures cellulaires *in vitro* a conduit à l'identification de nombreuses cibles virales (NS3-4A, NS5B, NS5A) pour le développement d'inhibiteurs spécifiques du VHC appelés DAAs pour *Direct Acting Antivirals* et pour le développement d'inhibiteurs ciblant des facteurs de la cellule hôte, HTAs (*Host Targeted Antivirals*).

3.2 Les antiviraux à action directe DAAs

Chaque étape du cycle viral est la cible d'inhibiteurs du VHC (Figure 22).

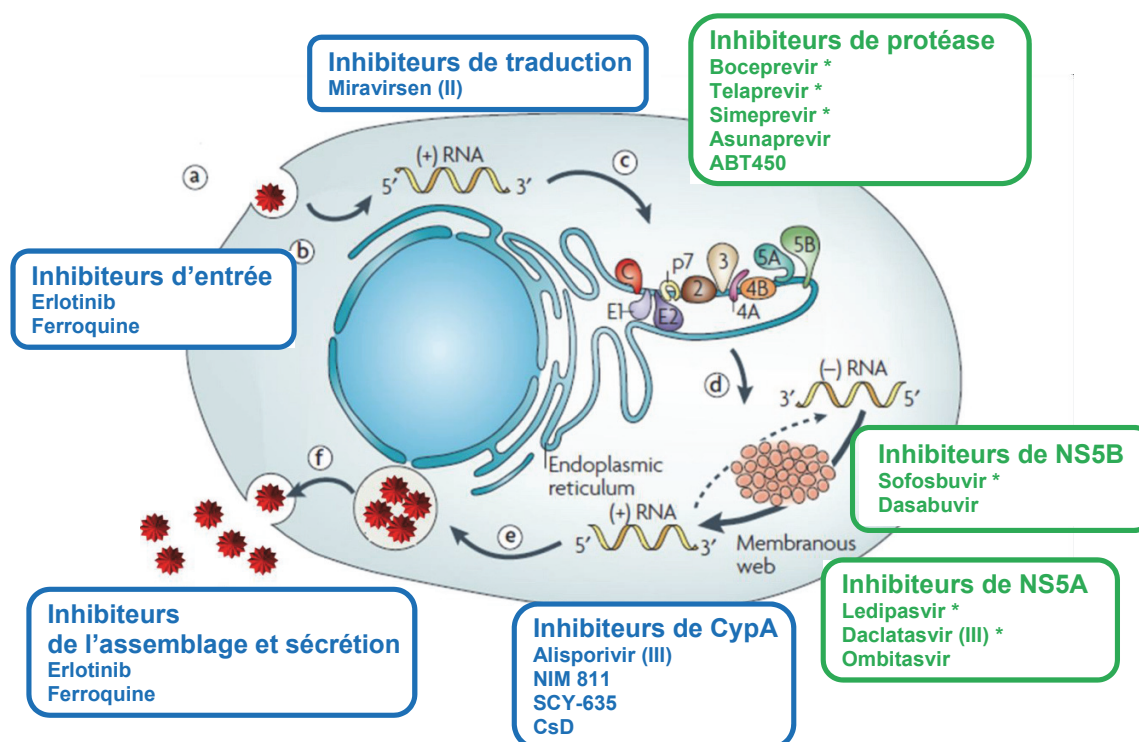


Figure 22. Cycle du VHC et exemples d'inhibiteurs du VHC. Adaptée de Moradpour et al., (2007) Les inhibiteurs avec action antivirale direct (DAAs) sont en verts, et les inhibiteurs ciblant des facteurs de la cellule hôte (HTAs) sont en bleu. * molécules autorisées sur le marché.

3.2.1 Inhibiteurs de la protéase NS3-4A

Trois inhibiteurs de la protéase NS3-4A, Bocéprévir (laboratoire Merck, 2011), Télaprévir (laboratoire Vertex, 2011) et Siméprévir (laboratoire Janssen, 2013), ont été approuvés en Europe et par l'agence américaine FDA (*Food and Drug Administration*), en combinaison avec l'interféron pégylé et la Ribavirine pour le traitement du génotype 1 du VHC. Ces molécules bloquent l'activité protéasique de NS3-4A (Poordad et al., 2011). Cette trithérapie permet d'augmenter le taux de réponse virologique soutenue (SVR) de 40 % à 70 % et de diminuer la durée du traitement de 48 semaines à 24 semaines pour la moitié des patients (Jacobson et al., 2011). Bien que ce traitement fût une avancée considérable, plusieurs difficultés existent concernant cette trithérapie. Ce traitement ne concerne que les patients infectés par le génotype 1 et provoque des effets secondaires exacerbés. De plus des mutations de résistance au Bocéprévir et Télaprévir apparaissent très rapidement, ce qui conduit à l'échec du traitement chez de nombreux patients.

Le Bocéprévir et le Télaprévir sont deux médicaments oraux de première génération, et sont devenus jusqu'en 2013 le traitement de référence pour l'infection par le VHC de génotype 1. De nombreux inhibiteurs de la polymérase NS3-4A de seconde génération sont en cours d'essais

cliniques (Zeuzem et al., 2011; Lenz et al., 2013) tel que le BI 2011335 et le TMC-435. En 2013 le Siméprevir a été approuvé par la FDA possédant une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires.

3.2.2 Inhibiteur de la polymérase NS5B

En 2013, la FDA approuve la mise sur le marché du Sofosbuvir (Sovaldi, commercialisé par les laboratoires Gilead) en combinaison de l'interféron pégylé et de la Ribavirine (Olson et al., 2015). Ce DAA est un analogue nucléotidique ciblant la polymérase NS5B. L'action du Sofosbuvir est théoriquement bien comprise : la molécule est une pro-drogue dont la métabolisation après internalisation par les cellules conduit à la libération d'un analogue d'uridine monophosphate. Cet analogue est efficacement converti en nucléotide triphosphate qui est susceptible d'être incorporé dans l'ARN viral naissant par NS5B. C'est un terminateur de chaîne d'ARN, inhibant ainsi la réplication du VHC (Ghayathri et al., 2014).

Cet inhibiteur possède une très grande efficacité et une barrière très élevée à l'apparition de résistance. Lorsqu'il est administré en combinaison avec l'interféron pégylé et/ou la Ribavirine et/ou d'autres DAAs, les taux de guérison sont de 90-100 % selon les essais cliniques. Ce traitement est actuellement administré en combinaison avec l'interféron pégylé et la Ribavirine pour traiter les génotypes 1 et 4 et en combinaison avec la Ribavirine pour traiter les génotypes 2 et 3. Cette trithérapie a permis de diminuer la durée du traitement, de 48 à 12 semaines (pour les génotypes 1, 4, 5, et 6), ainsi que les effets secondaires (Olson et al., 2015).

L'inconvénient majeur de ce traitement est le prix de vente. En effet, en France le Sofosbuvir est le traitement le plus coûteux de toute l'histoire de la sécurité sociale. Environ 10 000 patients bénéficient de ce traitement en France. Il est distribué, en France, uniquement en milieu hospitalier, remboursé à 100 % par la sécurité sociale. Le Sovaldi en combinaison à l'interféron pégylé et la Ribavirine coûte, en France, 41 000 euros pour une cure de 12 semaines. Selon des études économiques le coût pour la France serait de 2 milliards d'euros en deux ans. En raison de ce coût, le traitement va rester hors de portée de la grande majorité des personnes infectées par le VHC. En France, ce sont les malades les plus graves (c'est-à-dire ceux qui ont déjà reçu une transplantation hépatique, et les patients atteints de cirrhose du foie) qui pourront bénéficier de ce traitement. 90 % des personnes atteintes de l'hépatite C vivent dans des pays en voie de développement (Lavanchy, 2011) et n'ont accès à aucun traitement (Benkimoun, 2015).

De nombreux autres DAAs sont actuellement en cours de développement clinique en combinaison avec l'interféron pégylé et la Ribavirine, ou avec d'autres DAAs sans interféron pour améliorer la tolérance et l'efficacité du traitement.

3.2.3 Inhibiteurs de NS5A

NS5A est également une cible thérapeutique privilégiée pour le développement de molécules antivirales. Les inhibiteurs de NS5A actuellement en développement clinique se lient au niveau de son domaine 1. En octobre 2014, le Ledipasvir, un inhibiteur de NS5A est autorisé à la commercialisation par les laboratoires Gilead. Bien qu'efficace, le Ledipasvir ne peut être administré seul, il est utilisé en combinaison thérapeutique avec le Sofosbuvir. La combinaison Sofosbuvir/Ledipasvir est le premier traitement approuvé sur le marché sans interféron et Ribavirine permettant de traiter le VHC (Kowdley et al., 2014). En France il existe une autorisation temporaire d'utilisation réservée aux patients cirrhotiques.

Le Daclatasvir (Daklinza, laboratoire Bristol-Myers Squibb) est un inhibiteur de NS5A approuvé par la FDA en juillet 2015, utilisé en combinaison avec le Sofosbuvir pour traiter l'infection par le génotype 3 du VHC. La Daclatasvir est le premier inhibiteur qui a démontré son efficacité pour traiter le génotype 3 sans l'utilisation d'interféron et de Ribavirine. Cet inhibiteur a également été étudié en combinaison avec l'Asunaprevir, un inhibiteur de protéase actuellement en phase II d'essai clinique. Cette étude clinique a montré que l'administration de ces deux antiviraux, sans association à l'interféron pégylé et la Ribavirine permet d'obtenir un taux de réponse virologique soutenu de 81-91 % (Kumada et al., 2014).

Les modes d'actions des inhibiteurs de NS5A approuvés ou en cours d'essai cliniques ne sont pas encore connus. Des mutations de résistances au Daclatasvir sont apparues dans le domaine 1 de NS5A, suggérant une liaison de cet inhibiteur sur NS5A-D1. Ascher et al., (2014) ont montré par des expériences de titrations que le Daclatasvir se lie à NS5A-D1 et inhibe la liaison de l'ARN à NS5A-D1. Une autre étude, réalisée par *docking* et SAR (*Structure Activity Relationship*), suggère que le Daclatasvir se lie de manière asymétrique au niveau de la région poly-proline du domaine 1, empêchant la formation de l'homodimère NS5A. Ce mode de liaison permettrait d'expliquer l'inhibition de la formation du complexe de réplication en présence de Daclatasvir (Nettles et al., 2014).

De nombreux autres DAAs ont été développés : des inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la polymérase NS5B, des inhibiteurs de NS5A, des inhibiteurs de protéase.

Cette nouvelle génération de traitement va permettre de diminuer la durée du traitement à 12-24 semaines, d'améliorer la prise du traitement, et d'utiliser une thérapie sans interféron et Ribavirine (Kowdley et al., 2014). Ces nouveaux traitements, utilisé en combinaison orale devraient permettre de guérir 90 % des patients naïfs (des patients n'ayant encore jamais reçu de traitement) mais aussi des patients chez qui la trithérapie avec des inhibiteurs de protéase de première génération n'a pas fonctionné. Actuellement, les études cliniques de combinaisons de DAAs associent des combinaisons de 2 ou 3 DAAs de différentes classes : un inhibiteur de protéase avec un inhibiteur de NS5A, un inhibiteur de protéase avec un inhibiteur de polymérase, un inhibiteur de NS5A avec un inhibiteur de polymérase et un inhibiteur de protéase, un inhibiteur de NS5A et un inhibiteur non-nucléosidique de polymérase (Olson et al., 2015).

3.3 Les inhibiteurs des facteurs cellulaires HTAs

De plus en plus de molécules ciblant des facteurs de la cellule hôte impliqués dans le cycle de vie du VHC sont également à l'étude. En effet la variabilité génétique élevée du VHC qui facilite le développement rapide de résistance antivirale est un challenge pour le développement clinique d'inhibiteurs spécifiques du VHC. La difficulté est également d'obtenir des inhibiteurs spécifiques du VHC qui soient actifs sur tous les géotypes. Les inhibiteurs des facteurs cellulaires permettraient de limiter les mutations de résistance aux traitements et d'obtenir une thérapie géotype-indépendant.

3.3.1 Inhibition des facteurs d'entrée cellulaire

Parmi les cibles cellulaires de l'entrée virale on peut citer l'EGFR (Lupberger et al., 2011). L'EGFR un récepteur tyrosine kinase de la cellule hôte qui favorise l'interaction du co-récepteur CD81-claudin-1 et favorise la fusion entre l'enveloppe de la particule virale et la membrane endosomale de l'hôte. L'inhibiteur Erlotinib ciblant le domaine tyrosine kinase de l'EGFR empêche l'entrée virale dans le modèle *HCVpp* et le modèle des souris humanisées. Cette molécule bien que ciblant des fonctions de la cellule hôte est tolérée par l'organisme, elle est en effet déjà utilisée pour traiter certains cancers.

On peut également citer la Ferroquine, une molécule anti-paludisme prometteuse, qui inhibe l'entrée du VHC lors de l'étape de fusion. Cette molécule inhibe également la réplication virale ainsi que la transmission cellule-cellule du VHC (Vausselin et al., 2013). Cette molécule est actuellement en phase 2 d'essai clinique pour le traitement antipaludique.

3.3.2 Inhibition des facteurs cellulaires nécessaires à la traduction de l'ARN viral

Le génome viral est la cible de RNAses en raison de l'absence de coiffe méthylée en 5' et de queue poly A en 3'. miR-122 est un micro-ARN produit par les cellules qui favorise la traduction de l'ARN viral en protégeant l'extrémité 5' de la dégradation (Ploss and Dubuisson, 2012). miR-122 est donc un exemple de cible thérapeutique impliqué dans la traduction de l'ARN viral. Le Miravirsén (SPC3649), actuellement en phase II d'essai clinique, est un acide nucléique permettant d'inhiber l'action de miR-122.

3.3.3 Inhibition des facteurs cellulaires nécessaires à la réplication de l'ARN viral

La CypA est un facteur de la cellule hôte indispensable pour la réplication de l'ARN viral du VHC. Les inhibiteurs de CypA sont les HTAs dont les essais cliniques sont les plus avancés. Le cas de l'inhibiteur Alisporivir, ciblant la CypA, sera abordé à la section 3.4.

3.3.4 Inhibition des facteurs cellulaires nécessaires à l'assemblage et la sécrétion des virions

Dans le sérum des patients, le VHC est retrouvé au niveau des lipoprotéines de faible et de très faible densité pour former les particules hybrides, LVP. *In vitro*, la réplication du VHC est efficacement inhibée par des inhibiteurs de la voie de biosynthèse des acides gras et du cholestérol (Kapadia and Chisari, 2005) et la libération des particules virales peut être inhibée par la perturbation de la voie d'assemblage des VLDL (Popescu and Dubuisson, 2010; Icard et al., 2009)

De nombreux progrès ont été réalisés depuis 2011, et de nombreux essais cliniques sont en cours. Le traitement idéal du VHC devrait reposer sur l'utilisation combinée de DAAs et de HTAs permettant d'inhiber des mécanismes de réplication virale indépendants, pour lutter contre les mutations de résistances au traitement, pour améliorer l'efficacité du traitement envers tous les génotypes du VHC et pour à terme utiliser une thérapie sans interféron et Ribavirine.

3.4 Les inhibiteurs de la Cyclophiline A

La cible cellulaire la plus étudiée pour le développement de traitement contre le VHC est la CypA. Comme elle est requise quel que soit le génotype du virus et qu'elle est une protéine de l'hôte, donc peu sujette à l'apparition de mutations de résistances, elle est une cible thérapeutique digne d'intérêt.

3.4.1 La Cyclosporine A : un immunosuppresseur

La Cyclosporine A (CsA) est un peptide cyclique hydrophobe de 11 acides aminés produit par un champignon microscopique le *Tolypocladium inflatum Gams*. Cette molécule possède un effet immunosuppresseur découvert en 1972 par le laboratoire Sandoz (Tedesco and Haragsim, 2012). La CsA se lie aux Cyclophilines. La CsA inhibe l'activité PPIase de la CypA en se liant au site catalytique de l'enzyme (Mikol et al., 1993). Cependant l'inhibition de l'activité PPIase de la CypA par la CsA n'explique pas son caractère immunosuppresseur. La surface moléculaire du complexe Cyclophiline-CsA permet sa liaison à la Calcineurine (CaN) inhibant ainsi son activité phosphatase (Liu et al., 1991; Cardenas et al., 1995; Fruman et al., 1992). La CaN est une sérine/thréonine phosphatase calcium calmoduline dépendante. C'est une protéine importante pour l'activation des Lymphocytes T responsable de la réponse immunitaire. Elle a pour fonction notamment de déphosphoryler le facteur de transcription nucléaire des lymphocytes T, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) qui intervient dans la transcription du gène de l'interleukine (IL2) nécessaire à l'activation des lymphocytes T (Figure 23). Le complexe CypA-CsA se liant à la Calcineurine, celle-ci se trouve séquestrée, et la réponse immunitaire est ainsi réduite.

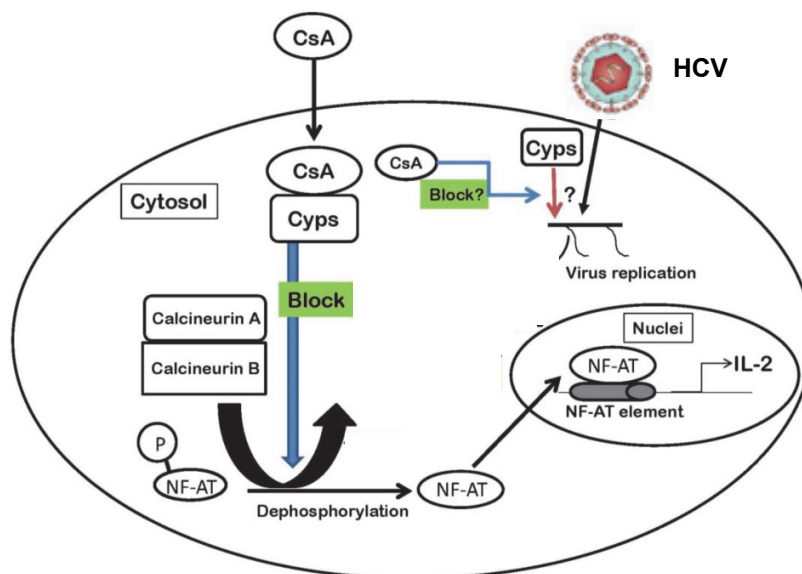


Figure 23. Inhibition de la voie de signalisation de l'IL2 par la CsA et inhibition de la réplication du VHC par la CsA. La CsA se lie à la CypA dans le cytoplasme. Ce complexe se lie à la Calcineurine et bloque son activité phosphatase. NFAT ne peut plus être déphosphorylé, transloqué dans le noyau et se fixer sur le promoteur de l'interleukine 2 nécessaire à la réponse immunitaire.

La découverte de l'activité immunosuppressive de la CsA en 1972 a permis son utilisation pour prévenir le rejet des allogreffes. Les premiers essais cliniques datent de 1978 (Starzl et al., 1981), et la mise sur le marché de cette molécule date de 1983. Depuis, chez les patients atteints d'hépatite C à un stade cirrhotique, la CsA est administrée pour prévenir le rejet des allogreffes lors des transplantations hépatiques.

3.4.2 La CsA a une activité anti-HCV

La première indication du caractère anti-VHC de la CsA date de 1988, lorsque Teraoka et al. mettent en évidence que chez des chimpanzés infectés par une hépatite « non-A non-B » les résultats histométriques des hépatocytes s'améliorent en présence de CsA. 15 ans plus tard, l'inhibition de la réplication du VHC par la CsA est mise en évidence *in vitro* dans le système réplicon du VHC (Watashi et al., 2003; Nakagawa et al., 2004). Un essai clinique réalisé chez des patients atteints du VHC transplantés, a montré que la charge virale chez ces patients diminue quand on remplace le Tacrolimus (un autre immunosuppresseur inhibant les FKBP) par la CsA (Lorho et al., 2005). L'inhibition de la CypA par la CsA empêche la réplication du VHC sans qu'une interaction avec la Calcineurine soit en jeu. La découverte que l'effet anti-VHC de la CsA soit indépendante de sa fonction immunosuppressive était prometteuse pour traiter le VHC (Tang, 2010). Des dérivés non immunosuppresseurs de la Cyclosporine A sont actuellement en phase d'essais cliniques (Hopkins and Gallay, 2012).

3.4.3 Analogues non-immunosuppresseurs de la CsA : Alisporivir, NIM 811, SCY-635, CsD

L'effet immunosuppresseur de la CsA l'empêche d'être utilisée comme molécule anti-VHC. Les chercheurs ont cherché à développer des analogues non-immunosuppresseurs de la CsA ayant une activité anti-VHC, comme Debio025 (ou Alisporivir), NIM811, SCY-635 et CsD (Figure 24). L'inhibition de la réplication du VHC par ces molécules dans des essais cliniques a été mise en évidence (Paeshuyse et al., 2006; Inoue et al., 2007; Mathy et al., 2008; Coelmont et al., 2009; Hopkins et al., 2012). L'efficacité anti-VHC des dérivés de la CsA s'est avérée plus efficace que celle de la CsA.

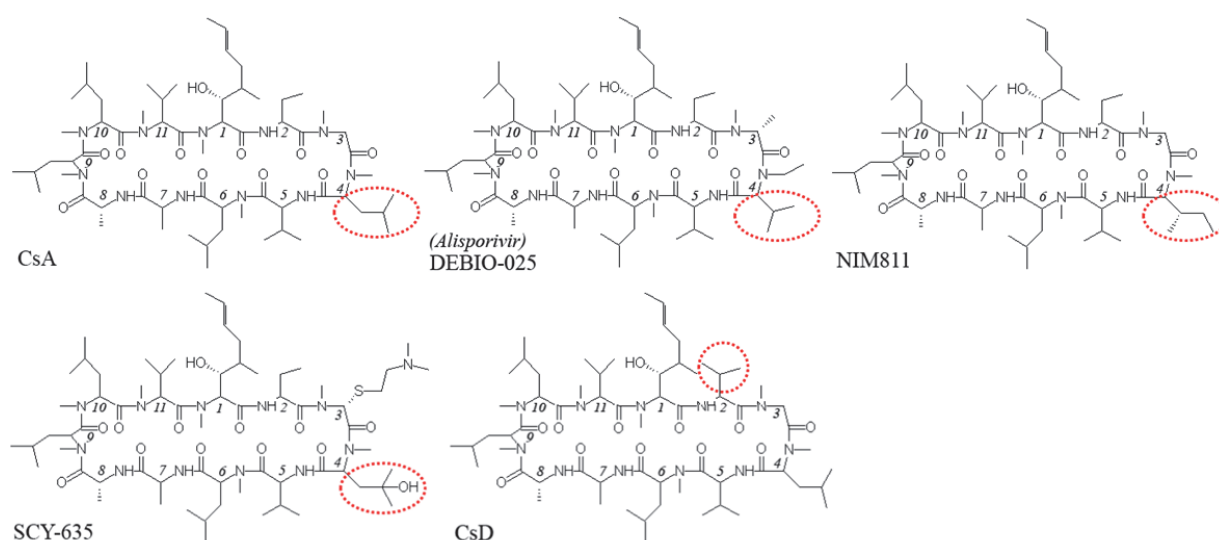


Figure 24. Structure des Inhibiteurs de Cyp inhibant la réplication du VHC. CsA et analogues non immunosuppresseur de la CsA : Debio025, NIM811, SCY635, et CsD.

L'analogue non immunosuppresseur de la CsA le plus avancé dans la recherche clinique est Debio025, développé par la société pharmaceutique Debiopharm et racheté sous le nom d'Alisporivir en 2010 par la société Novartis. Les droits de cet inhibiteur ont été récupérés par Debiopharm en janvier 2015. Les traitements anti-VHC ne font plus partie de la stratégie de Novartis. L'activité anti-VHC de cette molécule a été étudiée en culture cellulaire (Paeshuyse et al., 2006), chez le modèle des souris chimériques (Inoue et al., 2007) et chez l'homme (Flisiak et al., 2008; Flisiak et al., 2009). Cette molécule est actuellement en phase II de développement pour une thérapie sans PEG-IFN- α (Lim and Galloway, 2014). Comparé à la CsA, L'Alisporivir possède un groupement méthyl supplémentaire en position 3 (une N-méthyl-D-alanine est présente à la place d'une N-méthylglycine), et une N-éthylvaline à la place d'une N-méthylleucine en position 4 (Figure 25). L'interaction entre l'Alisporivir et la CypA a été

caractérisée par RMN au laboratoire pour mieux comprendre son caractère non-immunosuppresseur (Landrieu et al., 2010). L'interaction entre la CaN et le complexe CypA-Alisporivir est entravée par des contraintes stériques entre la chaîne latérale N-éthylvaline en position 4 de l'Alisporivir et la CaN. Avec la CsA ce n'est pas le cas, la chaîne latérale du résidu de N-méthylleucine 4 peut entrer dans une cavité hydrophobe à la surface de la CaN et ainsi former un complexe ternaire CypA-CsA-CaN (Landrieu et al., 2010).

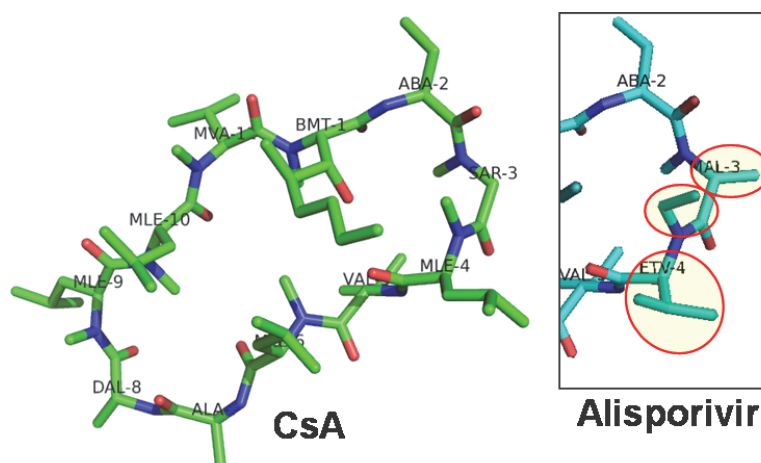


Figure 25. Différences entre la CsA et l'Alisporivir (Landrieu et al., 2010).

Les modifications structurales de l'Alisporivir par rapport à la CsA n'abolissent pas uniquement ces fonctions immunosuppressives, en effet son activité anti-réplication de l'ARN viral est environ dix fois plus efficace que celui la CsA dans un modèle cellulaire (Paeshuyse et al., 2006). De nombreuses études ont cherché à expliquer cette efficacité par la mesure des constantes thermodynamiques de dissociation des différents complexes enzymes-inhibiteurs (Copeland et al., 2006). Une méthode RMN permettant de déterminer les constantes de dissociation thermodynamiques relative entre la CsA et Alisporivir a été mise au point et a permis de montrer que ces deux molécules ont une constante de dissociation thermodynamique du même ordre de grandeur, de l'ordre de nM, ($K_{D \text{ CsA-CypA}} = 1,4 K_{D \text{ Alisporivir-CypA}}$) (Landrieu et al., 2011). La meilleure efficacité anti-VHC de l'Alisporivir ne peut donc pas s'expliquer par une affinité plus élevée de cette molécule pour la CypA. Une nouvelle méthodologie RMN, permettant de mesurer la constante cinétique de dissociation absolue (k_{off}) (Launay et al., 2013) montre que le complexe CypA-Alisporivir a un k_{off} 10 fois moins grand que le complexe CypA-CsA. Ces données sont cohérentes seulement si on considère que les constantes cinétiques d'association (k_{on}) des deux complexes présentent une différence d'un facteur 10 également. La durée de vie des complexes est différente ce qui pourrait expliquer la meilleur activité anti-VHC de l'Alisporivir.

Les inhibiteurs de la CypA non immunosuppresseurs sont prometteurs en tant que nouvelle classe d'inhibiteurs du VHC. L'analyse des résultats d'une étude clinique chez des patients à qui l'on administre l'Alisporivir en association avec la Ribavirine a montré un taux de réponse virologique soutenu de plus de 90 % (Lim and Gallay, 2014). Les mutations de résistances aux inhibiteurs de Cyclophiline sont relativement rares. Des études récentes *in vitro* ont montré que la combinaison d'Alisporivir avec un inhibiteur de NS5A (Daclatasvir ou Ledispavir) permet d'agir en synergie pour éviter l'apparition de mutations de résistance, ces résultats devront être confirmés dans des études cliniques (Chatterji et al., 2014).

La CsA et ses analogues non-immunosuppresseurs se lient aux Cyclophilines et inhibent la réplication de l'ARN du VHC. Cette découverte a permis de montrer que la Cyclophiline est essentielle pour la réplication du VHC (Ma et al., 2006; Watashi et al., 2005) et plus précisément la forme cytoplasmique, la CypA (Yang et al., 2008).

4 Le complexe ternaire NS5A-NS5B-CypA est essentiel à la réplication de l'ARN viral

Comme introduit dans la partie 2.6.3, les protéines non structurales du virus NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B, ainsi que des protéines de l'hôte comme la Cyclophiline A (CypA) sont indispensables à la réplication de l'ARN du VHC.

L'inhibition de la CypA par la CsA, ou des dérivés non immunosuppresseurs de la CsA, conduit à une inhibition de la réplication de l'ARN viral. Toutefois le rôle que joue la CypA humaine dans le processus de réplication reste à élucider. Sous pression de sélection à des inhibiteurs de Cyclophilines, des mutations de résistances ont été identifiées au sein du virus qui le rendent moins sensibles au traitement par ces inhibiteurs et donc moins dépendant de la CypA. Ces mutations de résistances sont localisées dans les domaines 2 et 3 désordonnés de NS5A et dans NS5B, soulignant l'importance de ces deux protéines non structurales (Fernandes et al., 2007; Robida et al., 2007). Ce sont celles localisées dans la protéine NS5A et plus particulièrement dans son domaine 2 désordonné qui confèrent le plus haut niveau de résistance (Fernandes et al., 2010; Goto et al., 2009; Yang et al., 2010; Liu et al., 2009b). Plusieurs études de sélections de VHC mutants résistants à la CsA ont montré que les inhibiteurs de CypA confèrent une barrière génétique élevée à l'apparition des mutations de résistance *in vitro*. Coelmont et al., en 2010, ont montré que l'apparition *in vitro*, dans le système réplicon, de mutations de résistance à l'Alisporivir nécessite en moyenne 20 semaines alors que 2 semaines suffisent avec des inhibiteurs de la protéase NS3-4A ou de la polymérase NS5B. Ceci suggère que ces mutations de résistances à la CsA ne sont pas favorables au VHC. En effet les mutations donnant le plus haut niveau de résistance sont localisées dans la région la plus conservée du domaine 2 de NS5A (région 308-327 dans la souche Con1 génotype 1b) (Yang et al., 2010). Plusieurs études ont montré en particulier que le dipeptide « Asp-Tyr » (D320-Y321 dans le génotype 1b et D316-Y317 dans le génotype 2a) localisé dans NS5A-D2 est un régulateur majeur de la vulnérabilité à la CsA et à d'autres inhibiteurs de la CypA. Les mutations Aspartate vers Glutamate ou Tyrosine vers Asparagine individuellement confèrent une résistance à la CsA pour plusieurs génotypes. Dans le système *HCVcc*, la double mutation DEYN permet au virus de se répliquer de manière beaucoup plus efficace dans des cellules *CypA-knockdown* par rapport au contrôle Wild Type (Yang et al., 2010). Ces mutations de résistances suggèrent une interaction fonctionnelle entre NS5A-D2 et la CypA. En effet, il a été montré que tous les résidus de prolines au sein de NS5A-D2 sont des sites substrats pour l'activité PPIase de la CypA (Hanouille et al., 2009b). De plus, un

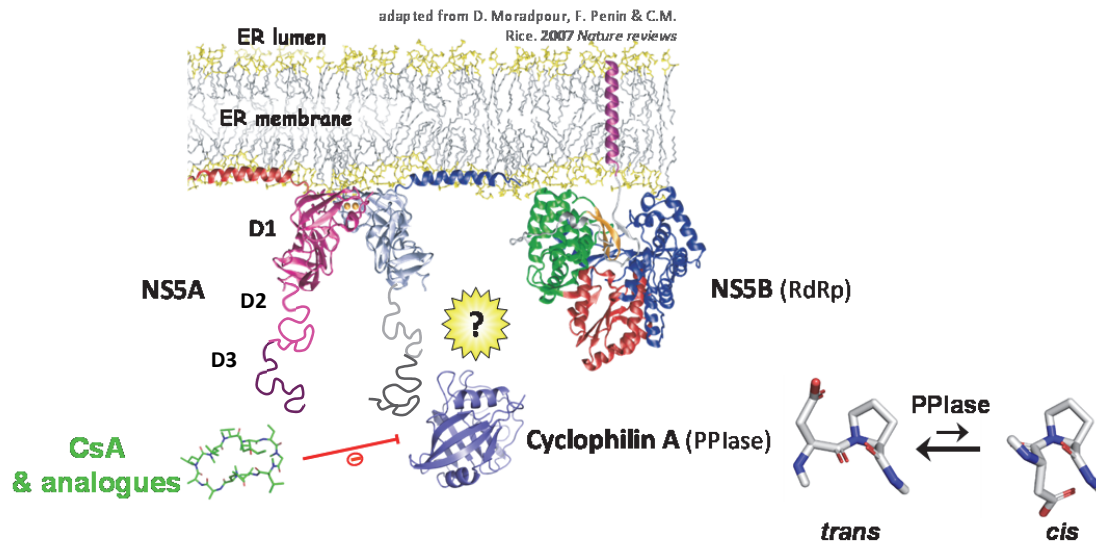


Figure 27. Schéma du complexe de réplication du VHC impliquant les protéines NS5A, NS5B et la CypA. Adapté de Moradpour et al., (2007).

5 L'infection par le VHC induit des perturbations du métabolisme cellulaire

5.1 La phosphorylation oxydative et la glycolyse aérobie

Les grandes voies de synthèse des biomolécules (acides nucléiques, acides aminés, lipides, etc) sont regroupées au sein du métabolisme central du carbone (MCC) permettant la génération d'énergie et de précurseurs métaboliques à partir du glucose. Le métabolisme du glucose est différent selon que les cellules sont en phase de prolifération ou qu'elles sont différenciées (Vander Heiden et al., 2009). Pour les cellules différenciées, le pyruvate issu de la glycolyse est utilisé dans les mitochondries en présence d'oxygène pour libérer de l'énergie sous forme d'ATP. Lorsqu'elles sont en phase de prolifération (ou lorsque les cellules sont cancéreuses), le pyruvate issu de la glycolyse va servir à produire de l'acide lactique, en conséquence, peu de pyruvate entre dans les mitochondries pour générer de l'ATP, c'est ce qu'on appelle la glycolyse aérobie, également décrit sous le nom d'effet « *Warburg* » dans les cellules tumorales. Dans ces conditions, la consommation de glucose mais également de glutamine est augmentée, le plus faible rendement énergétique de cette fermentation est compensé par une augmentation de la consommation de glucose, ce qui permet d'obtenir l'énergie et la synthèse de biomasse nécessaire aux cellules (Figure 28).

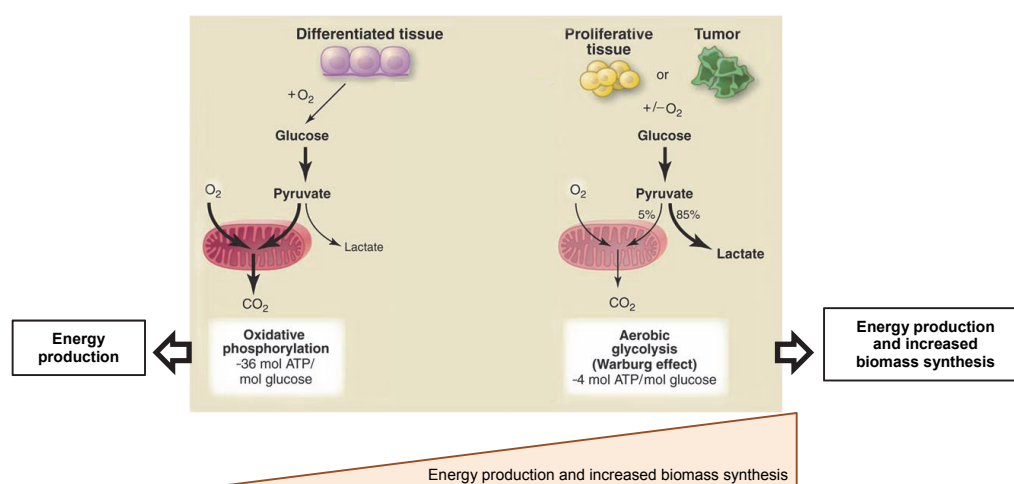


Figure 28. Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative et la glycolyse aérobie (effet *Warburg*). (Vander Heiden et al., 2009). En présence d'oxygène, les cellules différenciées métabolisent le glucose en pyruvate via la glycolyse, le pyruvate s'oxyde ensuite dans la mitochondrie et produit du CO₂ par la voie de la phosphorylation oxydative (respiration). Lorsque l'oxygène est limitant, le pyruvate est converti en lactate par la voie de la glycolyse aérobie.

5.2 Perturbations du métabolisme central du carbone par les virus

De plus en plus d'études traitent du comportement métabolique des cellules infectées par des virus. Entre les deux comportements métaboliques décrits précédemment, quel est celui adopté par les cellules infectées? Il a été montré pour de nombreux virus que l'infection des cellules induit des perturbations du métabolisme du carbone et de la glycolyse. Une liste des virus pour lesquels cela a été décrit est présentée Figure 29.

Le virus qui a été le plus décrit dans ce contexte est l'infection par le Cytomégalovirus humain (HCMV). Il a été montré que l'infection par l'HCMV induit une augmentation de la consommation de glucose mais avec un faible impact sur la production d'ATP. Le flux glycolytique est accru et le fonctionnement du cycle de l'acide citrique augmente ce qui favorise la génération de précurseurs pour la synthèse d'acides gras, d'acides aminés mais également de nucléotides nécessaires à la réplication du virus (Munger et al., 2008). Ainsi une interférence entre la réplication virale et le métabolisme bioénergétique semble être un trait commun aux infections virales.

Cytomégalovirus humain (HCMV)	(Munger et al., 2008), (Chambers et al., 2010), (Vastag et al., 2011), (Yu et al., 2011), (Terry et al., 2012)
Virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1)	(Abrantes et al., 2012)
Adénovirus 5	(Thai et al., 2014)
Virus herpès humain 8 (VVH-8)	(Delgado et al., 2010)
VIH	(Zhou et al., 2008), (Brass et al., 2008)
Virus de la Dengue (DENV)	(Fontaine et al., 2015),(Fontaine et al., 2014)
VHC	(Diamond et al., 2010) , (Ripoli et al., 2010), (Ramière et al., 2014)

Figure 29. Liste des virus pour lesquels une perturbation du métabolisme de la cellule hôte a été observée.

5.3 L'infection par le VHC induit des perturbations du métabolisme de la cellule hôte

L'infection par le VHC induit des perturbations du métabolisme glucido-lipidique, permettant au virus de se répliquer et de s'assembler (Ye, 2007). Le VHC a la particularité de détourner le métabolisme lipidique cellulaire lors de sa morphogénèse (Bartenschlager et al., 2011). La première étude protéomique réalisée sur les perturbations du métabolisme de la cellule infectée par le VHC date de 2010 (Diamond et al.). Diamond et al., ont montré que les cellules infectées par le VHC surexprimaient de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme de la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, et le cycle de l'acide citrique. Cette étude met bien en évidence que le VHC reprogramme le métabolisme de la cellule hôte pour assurer ses besoins en énergie et nutriments nécessaires à son processus répliatif.

Récemment Ramiere et al., ont mesuré les concentrations de différents métabolites chez des cellules infectées par le VHC. Ils ont pu mettre en évidence, chez des cellules Huh7 infectées par le VHC, une augmentation de la consommation de glucose associée à une augmentation de la production d'acide lactique suggérant bien une augmentation du flux glycolytique par la voie aérobie dans ces cellules. Cette augmentation de la glycolyse aérobie permettrait une augmentation de la synthèse de macromolécules telles que les acides gras au détriment de la synthèse d'ATP dans les cellules infectées, permettant ainsi la répliation virale (Ramiere et al., 2014). Une interférence entre le métabolisme de la cellule hôte et la répliation du VHC a donc été mise en évidence, cependant très peu de choses sont connues sur le mécanisme de « détournement » du métabolisme de la cellule hôte.

5.4 Mécanismes moléculaires de la perturbation du métabolisme de la cellule hôte par le VHC

Ramiere et al., ont cherché à mieux comprendre les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer ces modifications du métabolisme cellulaire. Ils ont alors étudié les interactions entre les protéines virales et les enzymes de la glycolyse en réalisant un screening par des expériences de « *protein complementation assay* ». Ils ont ainsi pu mettre en évidence que seule la protéine virale NS5A interagit avec les hexokinase humaines. L'hexokinase (HK) catalyse la première étape limitante de la glycolyse, elle phosphoryle le glucose en glucose-6-phosphate. Il existe quatre isoenzymes de l'hexokinase. Les hexokinase 1, 2 et 3 possèdent une haute affinité pour le

glucose, (le K_m est de l'ordre de 1mM), et ont un taux d'activité élevé, l'hexokinase 4, aussi appelée glucokinase (GCK) est moins active et a une affinité plus faible pour le glucose, (le K_m est de l'ordre de 10 mM). En relation avec ces paramètres cinétiques différents, ces isoenzymes ont des localisations différentes. L'HK1 est exprimée dans tous les tissus et de manière majoritaire dans le cerveau et les cellules du sang (Grossbard and Schimke, 1966; Katzen, 1967). L'HK2 est la principale isoenzyme de nombreux tissus (cœur, muscle, tissus adipeux...), son expression augmente dans les cellules cancéreuses (Wilson, 2003). L'HK3 moins abondante, est souvent localisée dans le noyau de la cellule (Wilson, 2003). La GCK est l'isoenzyme du foie et du pancréas (Wilson, 2003). Les hexokinases 1, 2 et 3 sont constituées de deux domaines, tandis que la glucokinase d'un seul. Comme le principal isoforme des cellules Huh 7 est l'HK2, Ramiere et al., ont poursuivi leur étude avec celle-ci. Ils ont confirmé l'interaction entre HK2 et NS5A par des expériences de co-immunoprécipitation réciproques. Ils ont pu montrer que l'interaction était responsable d'une modification de l'activité de l'HK2, avec une augmentation du V_{max} et une diminution du K_M de l'enzyme en présence de NS5A. NS5A serait un effecteur allostérique de l'enzyme. La modulation de l'activité de l'hexokinase par NS5A permettrait ainsi d'augmenter le flux glycolytique et serait crucial pour la réplication du VHC.

6 Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs)

6.1 Réadaptation du paradigme « structure – fonction »

Le paradigme « structure – fonction » assure que la fonction d'une protéine dépend d'une structure tridimensionnelle bien définie. Cette vision de la biologie structurale est ancrée « dans la science des protéines » déjà bien avant la première résolution par diffraction des rayons X de la structure d'une protéine, la myoglobine en 1958 (Kendrew et al., 1958). En effet, en 1893 Emil Fisher introduit le modèle « lock and key » pour expliquer la stéréospécificité qu'il a observée sur des enzymes hydrolysant la liaison β -glycosidique. Le site actif d'une enzyme est une région possédant une géométrie particulière et des groupements fonctionnels nécessaires à la reconnaissance du substrat, et à la formation du complexe enzyme-substrat. L'observation de la perte de fonction enzymatique en présence d'agents dénaturant la protéine est un argument de plus pour expliquer le paradigme structure-fonction. Au cours du 20^{ème} siècle, des dizaines de milliers de structures ont été résolues et déposées dans la PDB (Protein Data Bank), mettant en évidence la nécessité d'une structure tridimensionnelle pour expliquer le rôle fonctionnel de celles-ci. En conséquence la notion que des protéines ou des régions de protéines soient désordonnées fut difficile à admettre jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle.

En opposition à ce paradigme « *lock and key* », en 1958 Koshland proposa le modèle de l'ajustement induit, « *induced fit* », reposant sur l'hypothèse que le substrat induirait un changement de conformation du site actif de l'enzyme, montrant ainsi qu'un degré de flexibilité était nécessaire à l'activité de l'enzyme (Koshland Jr, 1958). La réadaptation du paradigme structure-fonction commença en 1998 quand Romeo et al. prédirent que plus de 15 000 protéines référencées dans la banque de données *Swiss Protein* contenaient des régions désordonnées d'au moins 40 acides aminés consécutifs (Romero et al., 1998). Peu de temps après, en 1999, Wright et Dyson admettent qu'un grand nombre de gènes coderaient pour des protéines désordonnées biologiquement actives (Wright and Dyson, 1999).

Depuis les dernières années, ces protéines sont dites intrinsèquement désordonnées (IDPs) pour désigner des protéines fonctionnelles dépourvues de structures secondaires et tertiaires stables en conditions physiologiques. L'incapacité à adopter une structure tridimensionnelle confère à ces protéines une grande flexibilité structurale, ce qui entraîne des impacts biologiques multiples.

6.2 Définition des IDPs

C'est donc à partir des années 2000 que commence la reconnaissance du rôle biologique des IDPs. Ce champ de recherche s'est considérablement accru ces dernières années mettant en évidence l'importance de ces protéines. Une banque de données en ligne DisProt a même été créée permettant de recenser les protéines désordonnées (Sickmeier et al., 2007). Les IDPs se caractérisent par un manque d'état structuré bien défini, et par une flexibilité bien plus élevée par rapport à la plupart des protéines étudiées avant les années 2000.

6.2.1 La séquence primaire des IDPs

L'état désordonné des IDPs est due à leur composition particulière en acides aminés. La séquence en acides aminés d'une protéine désordonnée est significativement différente de celle des protéines structurées. Les IDPs sont souvent riches en résidus chargés, en en proline. A l'inverse ces protéines possèdent peu de résidus hydrophobes et aromatiques qui habituellement constituent le cœur hydrophobe des protéines globulaires. Les protéines désordonnées ne possèdent donc pas les caractéristiques nécessaires (haute hydrophobicité et faible charge nette) pour le repliement en une conformation tridimensionnelle stable. Sur un graphique représentant la charge nette moyenne ($\langle R \rangle$) en fonction de l'hydrophobicité moyenne ($\langle H \rangle$), on obtient deux zones correspondant respectivement aux protéines désordonnées et aux protéines structurées, délimitées par une droite d'équation : $\langle R \rangle = 2.743\langle H \rangle - 1.109$ (Figure 30). Cette formule a été vérifiée pour plusieurs protéines (Demarest et al., 2001), montrant que le repliement d'une protéine dépend de la balance entre des interactions hydrophobes favorisant le repliement et des répulsions de charges favorisant le dépliement.

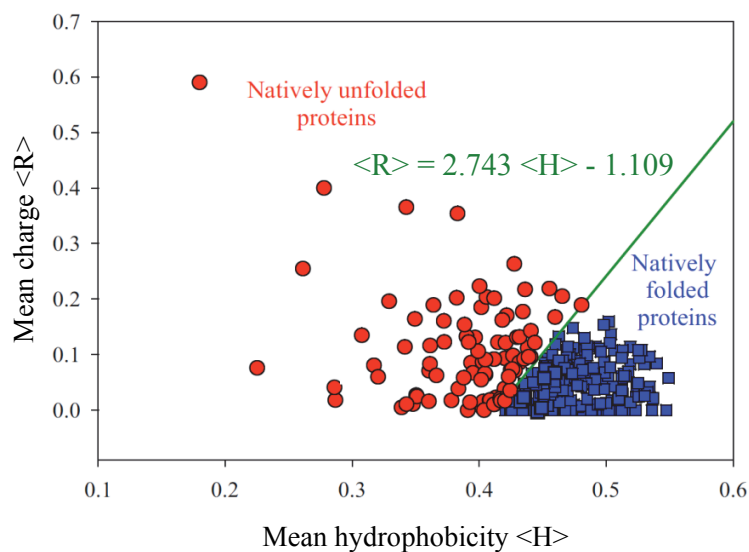


Figure 30 : Les particularités de la séquence primaire en acides aminés des protéines intrinsèquement désordonnées sont une charge nette élevée et une faible hydrophobicité. Graphique représentant la charge en fonction de l'hydrophobicité pour 275 protéines structurées (carrés bleu) et 91 protéines désordonnées (cercles rouge). Figure extraite de (Dunker et al., 2008).

Acides aminés	IDP	Protéine structurée	NS5A-D2 (JFH1)
Ala (A)	7.15	8.15	8.2
Arg (R)	4.21	4.61	6.2
Asn (N)	2.06*	4.66*	3.1
Asp (D)	5.05	5.78	7.2
Cys (C)	0.61*	1.64*	2.1
Gln (Q)	4.46	3.69	3.1
Glu (E)	14.26*	5.98*	10.3
Gly (G)	4.31	7.99	4.1
His (H)	1.51	2.33	0
Ile (I)	3.67	5.43	1.0
Leu (L)	5.44	8.37	10.3
Lys (K)	10.43	6.05	0.0
Met (M)	1.30	2.03	5.2
Phe (F)	1.66*	3.95*	2.1
Pro (P)	12.07*	4.61*	15.5
Ser (S)	6.91	6.31	6.2
Thr (T)	5.14	6.15	3.1
Trp (W)	0.32*	1.55*	<u>2.1</u>
Tyr (Y)	1.42*	3.64*	3.1
Val (V)	8.02	7.00	7.1

Figure 31. Fréquence en acides aminés pour les IDPs, les protéines structurées et NS5A-D2 (JFH1). Les acides aminés avec un astérisque sont au moins 2 fois plus présent (ou 2 fois plus absent) dans les IDPs que les protéines structurées (Tompa, 2002).

Dans le cas du domaine 2 désordonné de la protéine NS5A du VHC, la composition en acides aminés est proche de celle des IDPs (Figure 31), (Tompa, 2002). On remarque un pourcentage élevé de proline (15,5 %), au lieu de 4.61 % pour une protéine structurée.

Cette caractéristique dans la séquence primaire des IDPs a permis le développement d'outils bio-informatiques pour prédire des régions non structurées à partir de la séquence en acides aminés PONDRA (Romero et al., 1997; Li et al., 1999; Romero et al., 2001), Disopred (Jones and Ward, 2003), IUPred (Dosztanyi et al., 2005), HCA (*Hydrophobic Cluster Analysis*) (Callebaut et al., 1997). L'analyse bio-informatique du génome humain a ainsi permis de mettre en évidence qu'une large partie du protéome humain, plus de 40 %, serait constituée de protéines intrinsèquement désordonnées dans des conditions physiologiques et fonctionnelles (Li et al., 2000).

En exemple, nous présentons le degré de prédiction de désordre de NS5A-D2 (JFH1) du VHC avec le logiciel PONDRA (Figure 32). L'algorithme (VL-XT) indique globalement un domaine désordonné, à l'exception de l'extrémité N-terminal, C-terminal et de la région allant du résidu L300 à P319. Cette région comprend la région P310 à P319 qui est la région du virus la plus conservée parmi tous les génotypes du VHC (Hanouille et al., 2010).

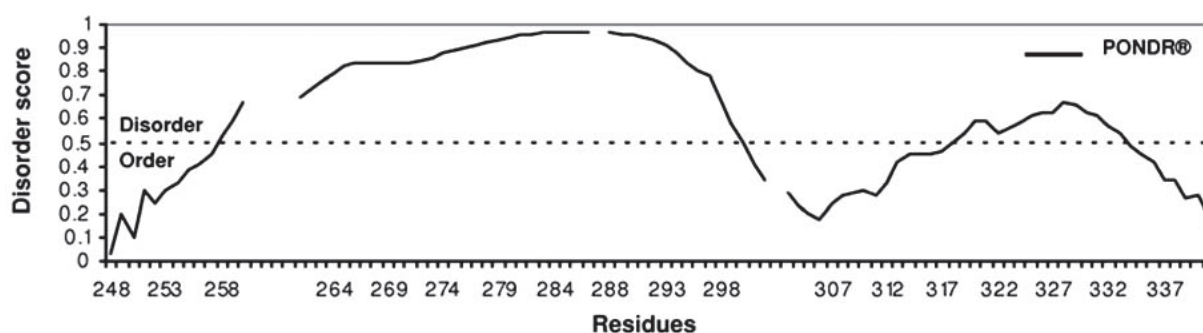


Figure 32. Résultat de prédiction de désordre réalisée avec le logiciel PONDRA tracé en fonction de la séquence primaire de NS5A-D2 (JFH1) (Hanouille et al., 2010).

6.2.2 La flexibilité des IDPs

De par leur flexibilité, les IDPs peuvent être caractérisées comme un ensemble de conformères qui s'interconvertissent les uns avec les autres en fonction du temps. Les IDPs ne possèdent pas de structure à l'état d'équilibre à l'inverse des protéines globulaires possédant un minimum énergétique correspondant à une structure repliée (Figure 33), (Fisher and Stultz, 2011). Les IDPs ont toutefois des propensions à former des structures secondaires ou tertiaires plus ou moins

stables (Baldwin and Zimm, 2000; Shortle and Ackerman, 2001). Ceci est différent de l'état « *random coil* » qui se caractérise par une absence complète de structure résiduelle au sein d'une IDP.

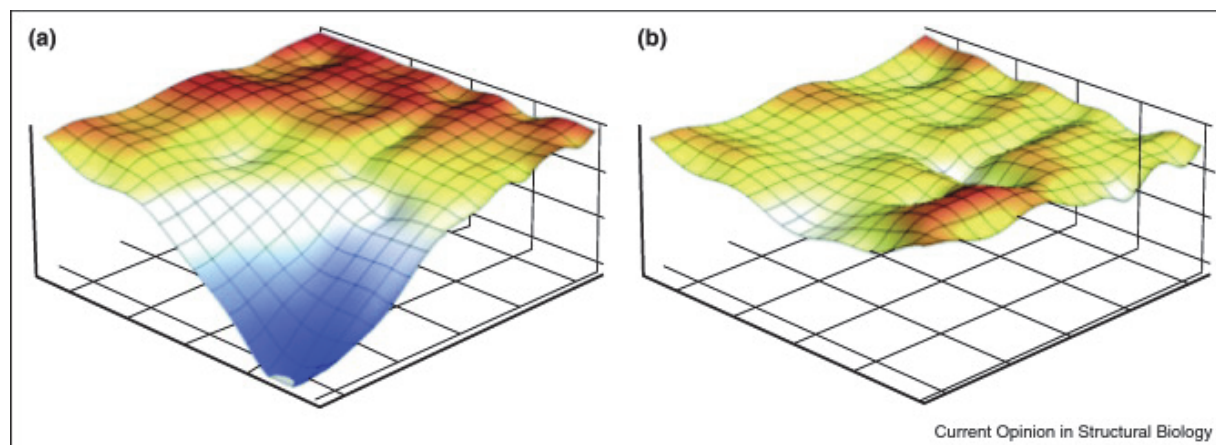


Figure 33. Profil énergétique d'une protéine repliée possédant un minimum bien défini correspondant à cet état replié (a) comparé à celui d'une protéine désordonnée qui n'en possède pas (b). Energie en fonction de l'espace conformationnel. Figure extraite de (Fisher and Stultz, 2011).

Le problème majeur dans le champ de recherche des IDPs est qu'on ne peut pas associer une structure tridimensionnelle à une fonction. Il a donc fallu réaliser une description moléculaire de l'état désordonné des protéines non structurées afin de parvenir à associer une fonction à ces protéines particulières. Une description complète des IDPs passe donc par une caractérisation de l'ensemble conformationnel. De nombreuses techniques permettent d'obtenir des informations sur cet ensemble conformationnel :

- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Cette partie sera développée au paragraphe 7

- Le Dichroïsme Circulaire (CD)

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique qui utilise des longueurs d'ondes dans l'UV lointain (far-UV 180 - 250 nm) et l'UV proche (near UV 250-320 nm) et qui est basée sur la capacité des molécules ayant une activité optique d'absorber la lumière polarisée circulairement à droite différemment de la lumière polarisée circulairement à gauche. Cette technique permet d'estimer rapidement le contenu en structures secondaires d'une protéine ainsi que l'état de repliement de la protéine. La Figure 34 montre les spectres CD typiques de protéines désordonnées et de structures secondaires (hélices α , feuillet β). Le dichroïsme circulaire utilisant des longueurs d'onde dans l'UV proche (near UV 250-320 nm) donne des informations sur

l'orientation relative des résidus aromatiques qui sont proches dans l'espace. L'utilisation combinée du far-UV et du near-UV en dichroïsme circulaire permet d'estimer le teneur en structures résiduelles au sein d'une IDP.

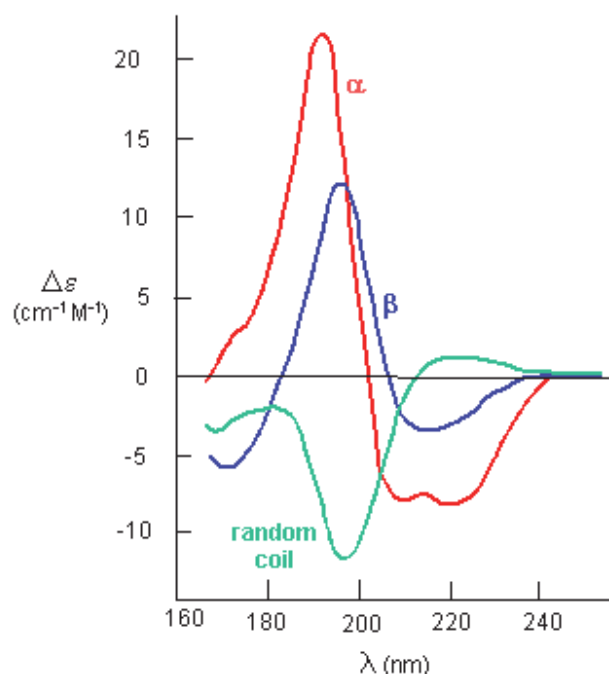


Figure 34. Courbes CD de références pour la conformation *random coil* (vert), l'hélice α (rouge) et le feuillet β (bleu). Figure extraite du site <http://biowiki.ucdavis.edu/Biochemistry/Proteins>.

Pour illustrer cette méthode, nous présentons le spectre CD de NS5A-D2 (JFH1) en Figure 35 (Hanouille et al., 2010). Le spectre CD de ce domaine donne une large bande négative à 198 nm et un épaulement dans la zone de 220-240 nm, mettant en évidence un mélange de conformation *random coil* avec la présence d'une faible quantité de structures résiduelles. Afin de mettre en évidence un éventuel repliement du domaine, le spectre CD est réalisé avec des concentrations croissantes de trifluoroéthanol (TFE), stabilisant le repliement de polypeptides en hélices (Buck, 1998), ou en augmentant la température, renforçant les interactions hydrophobes. On observe la présence d'un point isodichroïque, indiquant la présence d'un équilibre entre deux états, avec une légère diminution d'intensité de la bande à 198 nm et une légère augmentation de l'épaulement autour de 220 nm, indiquant le passage d'un état désordonné vers une structure de type hélice α . L'ajout de TFE et l'augmentation de température stabilisant les interactions hydrophobes provoque un gain d' α -hélicité.

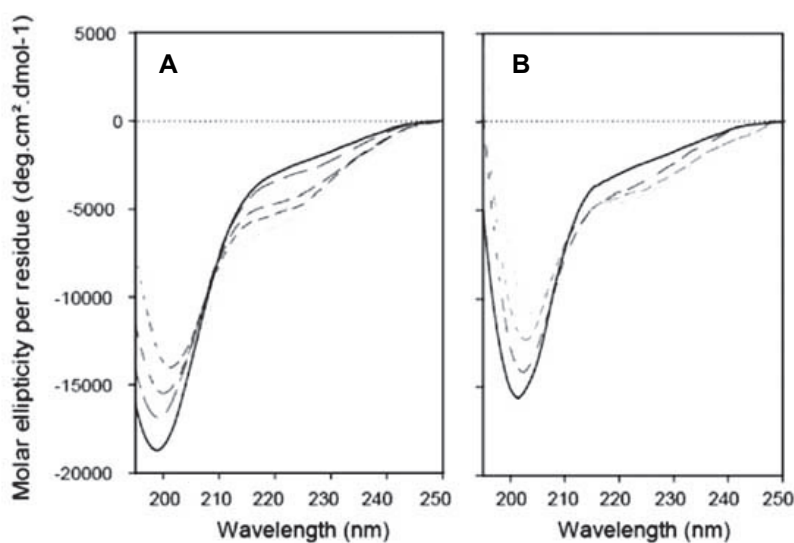


Figure 35. Analyse de NS5A-D2 par dichroïsme circulaire (Hanouille et al., 2010). A, Spectres CD de NS5A-D2 (JFH1) à 20°C en présence de concentrations croissantes de TFE : 0, 10 %, 20 %, 30 % et 40 % (respectivement ligne continue, en pointillé large, moyen et petit). B, Spectres CD de NS5A-D2 (JFH1) à différentes températures : 30°C, 40°C, 50°C, et 70°C (respectivement ligne continue, en pointillé large, moyen, et petit).

➤ La spectroscopie de Fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est basée sur la capacité qu'ont certaines molécules à absorber une énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Les protéines sont des chromophores intrinsèques par la présence d'acides aminés aromatiques (W, Y, F). Le chromophore le plus utilisé est le tryptophane, il absorbe l'énergie lumineuse à 280 nm, et la restitue entre 320 et 350 nm. La longueur d'onde d'émission dépend de l'environnement du tryptophane. S'il est dans un environnement hydrophobe, l'émission maximale est proche de 320 nm, tandis que s'il est dans un environnement polaire, la longueur d'onde d'émission est proche de 350 nm. La fluorescence intrinsèque du domaine 2 de NS5A (JFH1) présente un maximum d'émission de fluorescence à 340 nm. La perturbation d'émission de fluorescence à 344 nm en présence de 6 M de guanidine est en accord avec la présence de structures hydrophobes résiduelles autour des résidus aromatiques du domaine 2 de NS5A (Figure 36) (Hanouille et al., 2010).

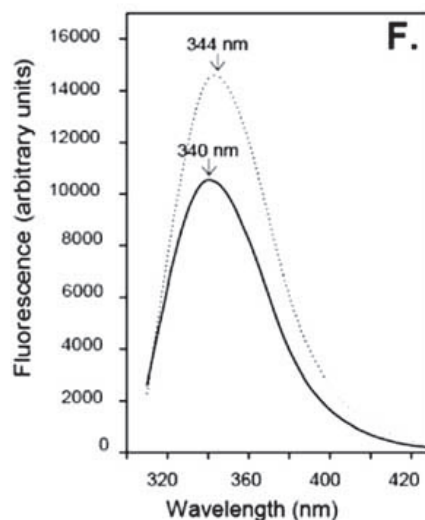


Figure 36. Spectre d'émission de fluorescence de NS5A-D2 (JFH1) en présence (ligne pointillé) et en absence (ligne continue) de 6M de guanidine (Hanouille et al., 2010).

➤ La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Cette méthode permet d'accéder aux dimensions et à la forme des protéines en solution. L'échantillon de protéine en solution est soumis à un faisceau de rayon X ; cet échantillon diffuse la radiation incidente. L'intensité du faisceau diffusé est mesurée à de très petits angles en fonction du vecteur de diffusion q ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$, où 2θ est l'angle de diffusion et λ la longueur d'onde du faisceau incident). On obtient une courbe de diffusion qui permet d'obtenir des informations structurales sur la protéine comme son rayon de giration qui est représentatif de la taille de la molécule et la fonction de distribution des distances entre les atomes (Pr).

Ces différentes techniques permettent d'avoir des informations sur l'ensemble conformationnel des IDPs. Cependant il est très difficile d'obtenir des informations sur des contacts longues distances, la durée de vie des structures secondaires résiduelles, ainsi que de connaître l'ensemble conformationnel. Une des stratégies consiste à extraire les conformations majoritaires, c'est à dire préférentielles, pour comprendre l'activité biologique des IDPs. Des approches computationnelles tels que ENSEMBLE (Krzeminski et al., 2013), Flexible-Meccano (Ozenne et al., 2012), et ASTEROIDS (Schneider et al., 2012) permettent de déterminer l'ensemble des conformations majoritaires d'une IDP basé sur des contraintes expérimentales (SAXS et paramètres RMN tels que les déplacements chimiques, les couplages dipolaires résiduels (RDC) la relaxation paramagnétique (PRE), les constantes de couplages).

6.3 Le rôle des protéines désordonnées

La flexibilité des IDPs leur permettent d'intervenir dans des mécanismes cellulaires clés finement régulés : transduction du signal, régulation du cycle cellulaire, régulation de la traduction et de la transcription, fusion membranaire (Wright and Dyson, 1999). Leur fonction est souvent réalisée via une reconnaissance moléculaire où le désordre confère des avantages, comme celui d'augmenter la vitesse de la réaction et la spécificité sans une force de liaison excessive avec leur partenaire.

Les IDPs sont impliquées dans un grand nombre de maladies tels que les cancers, comme le montrent les études réalisées sur le suppresseur de tumeur p53 (Wells et al., 2008), les maladies neurodégénératives comme Alzheimer et Parkinson, les maladies cardiovasculaires et le diabète (Uversky et al., 2008).

Les différentes fonctions des IDPs ont permis de les classer en 6 catégories (Figure 37) (Tompa, 2005).

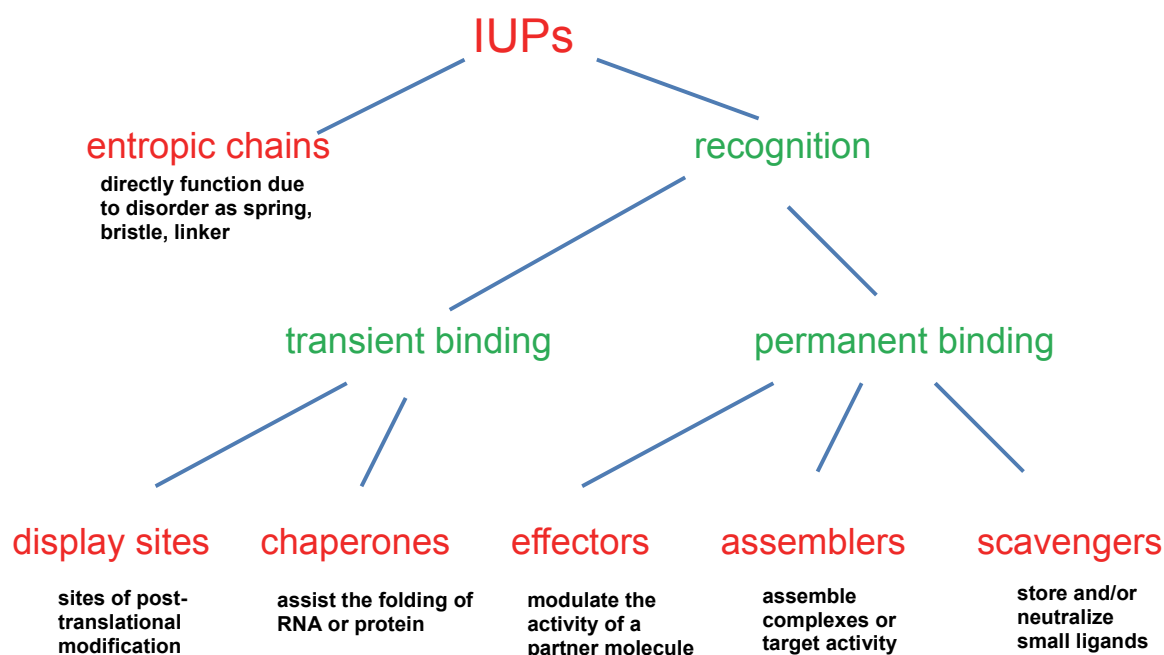


Figure 37. Classement des IDPs selon leur fonction (Tompa, 2005)

- Chaines entropiques

La première classe fonctionnelle est celle des chaînes entropiques. Cette classe comprend les linkers flexibles permettant de relier entre eux plusieurs domaines fonctionnels. Ces régions

désordonnées permettent par exemple de réguler la distance entre différents domaines adjacents. Un exemple de chaîne entropique est la protéine MAP2 (Microtubule Associated Protein 2) permettant de maintenir un espace entre les microtubules (Tompa, 2002).

La fonction des 5 autres classes se fait par reconnaissance moléculaire avec un partenaire, l'interaction peut être transitoire ou permanente.

- Interaction transitoire avec un partenaire
 - Sites de modifications post-traductionnelles

Parmi les interactions transitoires, il y a les IDPs subissant des modifications post-traductionnelles (display sites). Les enzymes, de par leur activité catalytique, ont une faible affinité pour leur substrat. La flexibilité des IDPs est un atout pour subir des modifications post-traductionnelles (MPT), car l'enzyme peut interagir de manière transitoire et spécifique avec son substrat. Les IDPs, de par leur nature désordonnée, sont très accessibles pour subir des modifications post-traductionnelles: phosphorylation, acétylation, O-GlcNAcylation, méthylation, isomérisation de la liaison X-Pro par une PPIase.

- Phosphorylation

La phosphorylation est la MPT la plus fréquente (Iakoucheva, 2004). La phosphorylation modifie par exemple, l'activité d'IDPs impliquées dans la transduction du signal et régule l'affinité de liaison des facteurs de traduction à leurs coactivateurs et à l'ADN régulant ainsi l'expression de gènes, la croissance cellulaire et la différenciation (Zor et al., 2002). Récemment Julie D. Forman Kay et son équipe ont montré que la phosphorylation peut induire le repliement d'une IDP. La phosphorylation de 4E-BP2, une protéine désordonnée qui est une des 3 isoformes neuronal de mammifère liant eIF4E, induit le repliement de cette IDP en un tonneau de 4 feuillets β . Un motif de liaison en hélice est enfoui à l'intérieur de ce tonneau, bloquant ainsi la liaison au facteur de transcription eIF4 (Bah et al., 2014).

- Isomérisation *cis/trans* d'une liaison X-Pro par une PPIase

L'isomérisation *cis/trans* de la liaison peptidique précédant un résidu de proline par une peptidyl prolyl *cis/trans* isomérase est une autre modification post-traductionnel dont on verra l'importance pour la régulation du domaine D2 de la protéine NS5A du VHC (partie 1 article et partie 2.8.3.2 des résultats).

- Chaperonne

Les IDPs chaperonnes interviennent par reconnaissance moléculaire, leur régions désordonnées se lient à d'autres protéines de façon transitoire leur permettant d'acquérir leur structure (Tompa, 2004).

- Interactions permanentes avec un partenaire
 - Effecteurs

Les effecteurs se lient de façon permanente et modifient l'activité de leur partenaire enzymatique. ils peuvent jouer le rôle d'activateurs ou d'inhibiteurs (Tompa, 2002).

- Les protéines d'assemblages

Ces protéines assemblent des complexes multi-protéiques. Ces protéines ou domaines désordonnés sont retrouvés dans l'assemblage du ribosome, du cytosquelette et d'activateurs de transcriptions comme le complexe CBP (*Human cyclic-AMP-response-element-binding-protein (CREB)-binding protein*) (Dyson and Wright, 2005).

- Les pièges à molécules

La troisième catégorie comprend les protéines de piège à molécules qui neutralisent de petits ligands. Un exemple classique est la liaison et la stabilisation du calcium par la caséine empêchant ainsi la précipitation du phosphate de calcium dans le lait (Holt et al., 1996).

6.4 Les interactions impliquant des IDPs

Leur manque de structure stable confère aux IDPs une grande adaptabilité de liaison, ce qui leur permet d'interagir avec des partenaires multiples. La fonction des IDPs passe souvent par reconnaissance moléculaire avec un partenaire. La liaison à ces partenaires est souvent réalisée grâce à la reconnaissance de petits motifs (Neduva et al., 2005; Fuxreiter et al., 2007). Ces petits motifs de reconnaissance font l'objet de nombreuses discussions dans la littérature. En effet, si ces petits motifs de reconnaissances sont abordés d'un point de vue structural, ils peuvent être dénommés « *molecular recognition element* » (MoRE) / « *molecular recognition feature* » (MoRF) (Oldfield et al., 2005) ou « *short linear motif* » (SLiM) s'ils sont abordés d'un point de vue séquentiel. En 2004, Fuxreiter et al. mettent au point le concept de « *preformed structural elements* » (PSEs) suggérant que la conformation préférentielle des IDPs dans leur état libre peut

être déterminante pour l'interaction avec un partenaire (Fuxreiter et al., 2004). Ils montrent une forte corrélation entre les conformations préférentielles des IDPs (souvent des hélices α) et la structure du complexe observée par cristallographie qui est identique à la conformation préférentielle de l'IDP libre en solution. Des études ont montré par RMN une conformation similaire d'une IDP en état libre et en état lié donnant ainsi naissance au concept de « *prestructured motifs* » (PreSMos) (Lee et al., 2012). Dans le même ordre d'idée, les régions MoREs/MoRFs sont de petites régions désordonnées qui se replient au contact d'un partenaire, il existe un logiciel de prédiction de ces régions MoRF predictor (MoRFpred) (Disfani et al., 2012). Un exemple d'application de ce logiciel est illustré Figure 38 sur NS5A-D2 (Con1).

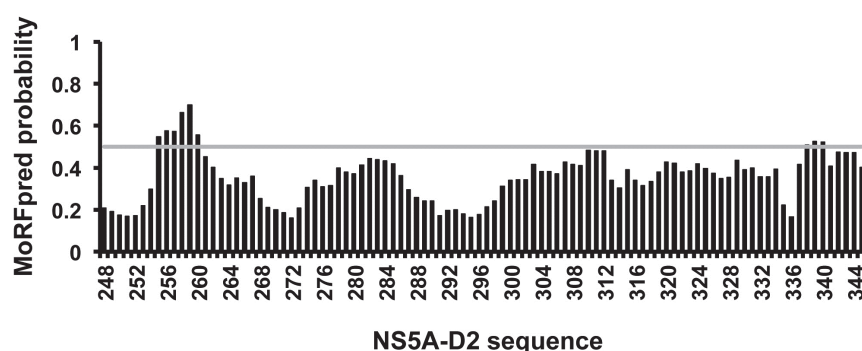


Figure 38. Prédiction de séquence MoRFs au sein de NS5A-D2 (Con1). Une probabilité MoRF supérieure à 0,5 indique la présence de séquence MoRFs. Excepté pour la région 255-260, correspondant à une tendance hélicale, aucune séquence MoRFs n'est prédite.

Bien que les IDPs soient non structurées, elles peuvent donc se replier ou adopter des structures secondaires plus ou moins stables lors de l'interaction avec un partenaire (Wright and Dyson, 2009). Dans la littérature, il existe de nombreux exemples de protéines réalisant ces transitions de type désordre/ordre au contact d'un partenaire, cependant le moment où ce repliement s'effectue est une question qui reste ouverte pour de nombreux systèmes étudiés. Deux cas extrêmes sont décrits : avant (sélection conformationnelle) ou après appariement avec le partenaire (induction de conformation) (Figure 39) (Wright and Dyson, 2009).

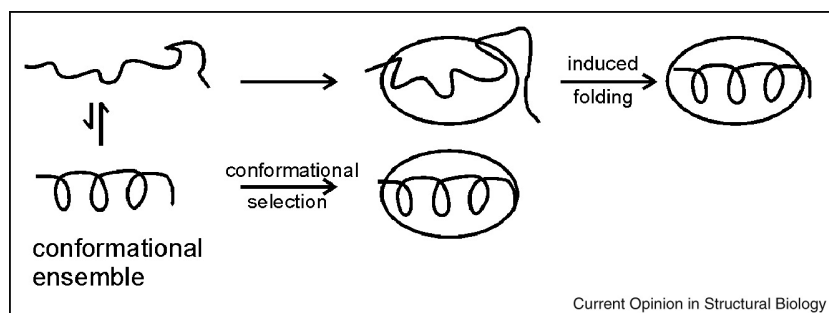


Figure 39. Schéma montrant les deux possibilités de repliements : sélection conformationnelle ou repliement après appariement (Wright and Dyson, 2009).

- Interaction par induction de conformation : la protéine dans un état entièrement dépliée se lie à son partenaire et se replie ensuite. Le repliement est induit par l'association avec le partenaire.
- Sélection conformationnelle : La protéine partenaire « sélectionne » parmi les protéines libres en solution, une conformation proche de la conformation de l'IDP en complexe avec le partenaire.
- Il existe un dernier mode d'interaction : l'interaction dynamique. Ce mode d'interaction concerne les IDPs gardant des régions plus ou moins mobiles même si elles sont impliquées dans l'interaction. Un nouveau terme est apparu pour désigner ce type de complexe, il s'agit de « *fuzzy complex* » (Tompa and Fuxreiter, 2008).

L'interaction entre le domaine désordonné (NT) de la nucléoprotéine du virus de Sendai et le domaine C-terminal de la phosphoprotéine (PX) illustre le phénomène de transition désordre/ordre lors de l'interaction avec un partenaire. L'interaction NT:PX joue un rôle essentiel pour la réplication du virus en permettant d'initier l'interaction entre la protéine virale et le génome. Des études réalisées par spectroscopie RMN ont montré que le site d'interaction du domaine NT libre en solution existe comme un équilibre 4 conformations en échange : 3 conformation en hélice et une conformation complètement désordonnée (Jensen et al., 2008). Ce site d'interaction est connu pour se replier lors de l'appariement avec son partenaire PX (Houben et al., 2007). Récemment Schneider et al., ont déterminé le mécanisme d'interaction entre ces deux partenaires. Des expériences de dispersion de relaxation en RMN ont permis de déterminer la cinétique de l'interaction, ainsi que le moment où le repliement avec le partenaire s'effectue (Schneider et al., 2015). Il s'agit d'un mécanisme en deux étapes: les différentes conformations de NT libres en solution se lient dans un premier complexe dynamique avec PX, ce complexe modifie l'équilibre conformationnel de NT en stabilisant la conformation en hélice numéro 2.

Dans une deuxième étape le complexe se stabilise entre l'hélice numéro 2 et le site d'interaction de PX (Figure 40).

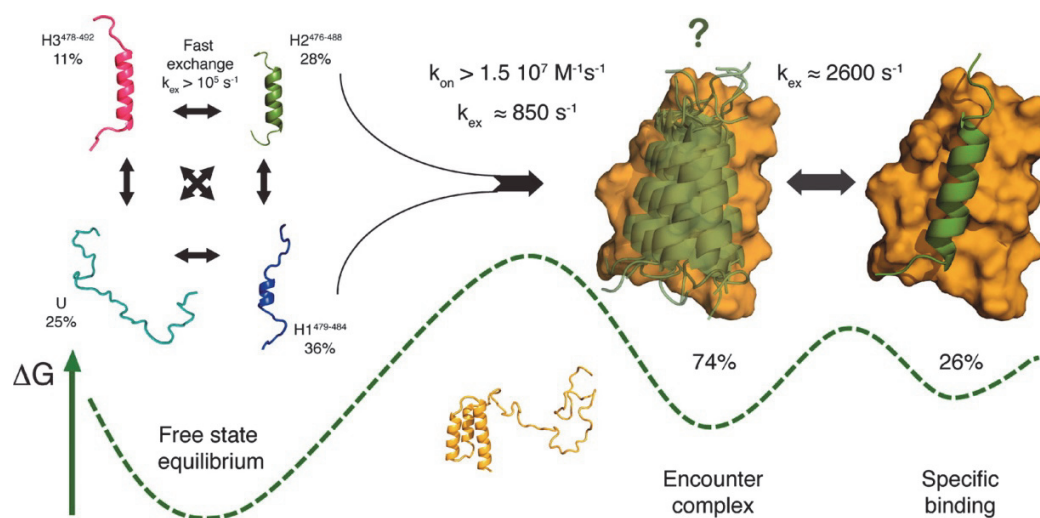


Figure 40 : Mécanisme d'interaction entre le domaine désordonné NT du virus de Sendai et la phosphoprotéine PX (Schneider et al., 2015).

6.5 Les IDPs au sein des protéines virales

De nombreuses protéines virales sont complètement désordonnées ou contiennent d'importantes régions/domaines désordonnées. Les virus tirent de nombreux avantages de la conformation flexible de ces IDPs. Cela permet aux virus de s'adapter aux changements de conditions environnementales, d'interagir avec la machinerie cellulaire tout en détournant la réponse immunitaire de la cellule hôte. Cela leur permet également de bien tolérer le taux de mutation très élevé que l'on trouve dans les génomes viraux (Alves and Cunha, 2012). Une analyse bio-informatique a révélé qu'en comparaison aux protéines de l'hôte, les protéines virales sont moins repliées et possèdent des interactions inter-résidu plus faibles (Tokuriki et al., 2009). Cette étude a également permis de conclure que l'adaptation des protéines virales au cours de l'évolution est différente de celle des protéines de la cellule hôte. En effet, l'abondance de résidus polaires, la densité plus faible de contacts dus aux forces de Van der Waals, et la résistance aux mutations ponctuelles suggèrent que les protéines virales n'ont pas évolué vers une plus grande stabilité thermodynamique, mais plutôt vers une adaptation rapide aux changements de conditions environnementales physiques et biologiques (Alves and Cunha, 2012). Une étude récente a évalué le contenu en désordre structural parmi 2278 génomes viraux de 41 familles différentes (Pushker et al., 2013). Le désordre varie considérablement entre les familles de virus (de 2,9 % à 23,1 % de résidus désordonnés) et reste globalement cohérent au sein d'une même famille. Xue

et al., ont montré que chez une vingtaine de petits virus, le désordre est de 50 % et que chez les virus de grande taille, il varie de 20 à 40 %. Certains virus possèdent un contenu en désordre de seulement 7,3 %. Le désordre est donc très hétérogène au sein des génomes viraux (Xue et al., 2012).

Une étude bio-informatique réalisée par Fan *et al* a permis d'évaluer l'état désordonné du protéome du virus de l'hépatite C. La Figure 41 montre le résultat de cette étude réalisée sur le génotype 1b du VHC. Le VHC possède 4 protéines (E1, E2, p7 et NS2) avec peu de désordre (de 0,1 à 10 % de séquence désordonnée), 4 protéines avec un désordre modéré (NS3, NS4A, NS4B, NS5B) (11-30 % de séquence désordonnée), et 2 protéines (core, NS5A) avec un important désordre (31-100 % de désordre) (Fan et al., 2014). La teneur totale en désordre de la polyprotéine du VHC est de 23,3 %, cette valeur est assez élevée sachant que toutes les protéines du VHC sont ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique par une hélice ou une région amphiphile ordonnée. La protéine du VHC contenant le plus de séquences prédites désordonnées est NS5A (51,8 % de séquence désordonnée). Ceci est dû à l'organisation particulière de cette protéine en 3 domaines : le domaine 1 possède une structure tertiaire stable, tandis que ces domaines 2 et 3 sont entièrement désordonnés (Figure 11). L'absence de conformation de NS5A-D2 et NS5A-D3 permet à ces domaines de réaliser des interactions avec des partenaires multiples, faisant de NS5A un point central (« *hub* ») pour les interactions protéiques (de Chassey et al., 2008).

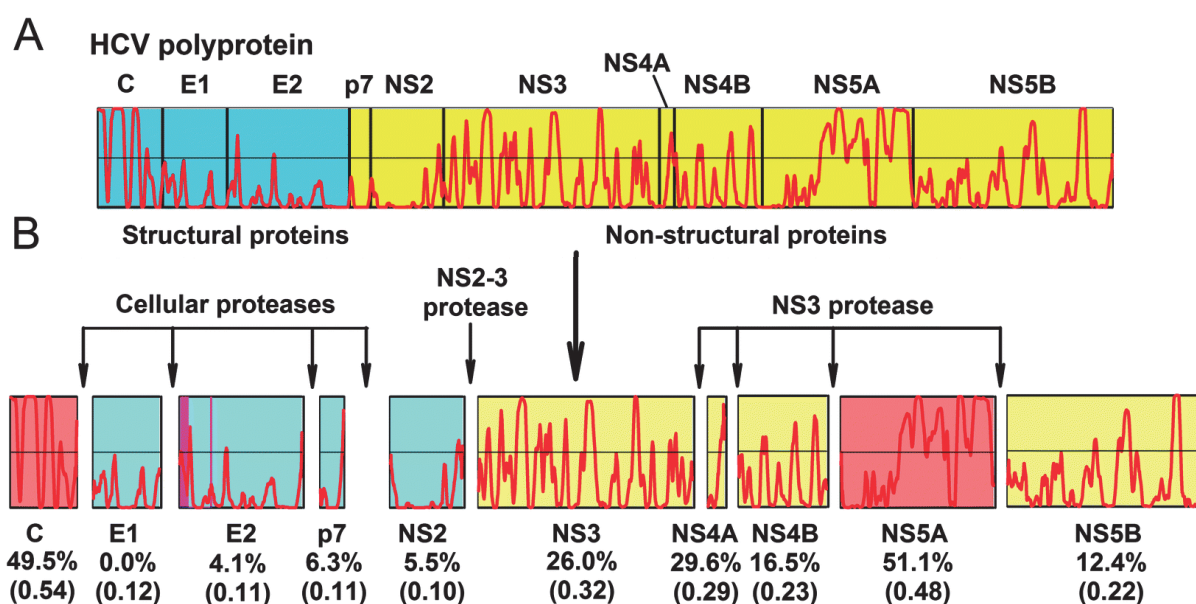


Figure 41. Carte du protéome du VHC de génotype 1b (Fan et al., 2014). (A) Polyprotéine du VHC et (B) chaque protéine viral représentées par un carré. La ligne rouge correspond à la prédiction de désordre réalisée avec le logiciel PONDR VLXTT (Romero et al., 2001). Les carrés sont colorés arbitrairement en

fonction du pourcentage de désordre (0-10 % de la séquence est désordonnée, cyan), (11-30 % de la séquence est désordonnée, jaune), (31-100 % de la séquence est désordonnée, rouge).

En conclusion, les 15 dernières années ont été témoin de l'évolution du plus grand paradigme de la biologie structurale. L'unique fonction d'une protéine n'est pas toujours déterminée par une structure ordonnée unique, de nombreuses protéines ou régions de protéines ayant une fonction biologique n'ont pas de structures tertiaires ou secondaires stables. Ces protéines intrinsèquement désordonnées sont très abondantes dans toute la nature, en particulier chez les virus, et beaucoup d'entre elles sont associées à des maladies. Une particularité des IDPs est leur très grande hétérogénéité structurale, où différentes parties de la chaîne polypeptidique peuvent adopter des structurations transitoires plus ou moins stables. La flexibilité des IDPs leur permet d'être impliquées dans de nombreux mécanismes biologiques ne pouvant pas être réalisés par des protéines possédant une structure tridimensionnelle unique.

Afin de comprendre l'activité biologique de ces protéines, il est nécessaire de caractériser ces protéines d'un point de vue structural. La RMN est une méthode bien adaptée à l'étude des protéines désordonnées, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

7 La RMN des protéines intrinsèquement désordonnées

La plupart des structures de protéines ont été réalisées par cristallographie des rayons X. En 2015, le nombre de structure de protéines déposées dans la PDB, obtenues par cristallographie des rayons X, est de 97 817 contre 11 028 obtenues par RMN. Cependant la cristallographie des rayons X n'est pas adaptée pour caractériser les protéines désordonnées car elles ne cristallisent que très difficilement voire pas du tout. Si une protéine structurée possédant des régions désordonnées cristallise, ces régions flexibles seront manquantes dans la densité électronique. La RMN présente l'avantage de pouvoir étudier les protéines en solution. Elle permet d'accéder aux fluctuations structurales dans le temps par rapport à une conformation moyenne donc à la dynamique des protéines. En effet les protéines désordonnées sont un mélange de conformères en échange dynamique, où chaque conformère est plus ou moins thermodynamiquement favorisé. En RMN nous observons un signal moyen qui est la combinaison des différents conformères en échange dynamique. La RMN est donc la technique de choix pour étudier la structure et la dynamique des protéines intrinsèquement désordonnées.

7.1 Spectre ^1H - ^{15}N HSQC et attribution des résonances

7.1.1 Spectre ^1H - ^{15}N HSQC

En RMN liquide, seuls les noyaux de spin $\frac{1}{2}$ sont détectables, notamment ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Comme l'abondance naturelle en ^{13}C (1,11 %) et ^{15}N (0,37 %) est faible, il est nécessaire de réaliser un enrichissement isotopique des protéines pour pouvoir enregistrer les signaux du carbone et de l'azote. L'étude des protéines par RMN 1D du proton est très limitée en raison de la superposition des nombreux signaux. Des séquences multidimensionnelles sont utilisées permettant de corrélérer les fréquences des différents noyaux et de réduire le recouvrement des signaux.

Le spectre ^1H - ^{15}N HSQC constitue l'« empreinte » de la protéine. C'est un spectre à deux dimensions, une dimension proton (en abscisse) et une dimension azote ^{15}N (en ordonnée), où chaque signal correspond à la corrélation entre un proton et un azote de la fonction amide d'une liaison peptidique. Typiquement chaque pic de corrélation ^1H - ^{15}N représente une fonction amide

d'un acide aminé de la protéine, seules les prolines ne sont pas visibles sur ce spectre car elles ne possèdent pas de proton amide. Des pics de corrélations correspondant aux fonctions NH, et NH₂ des chaînes latérales Trp, Asn, Gln et parfois Lys et Arg sont également présents sur ce spectre.

Le spectre ¹H-¹⁵N HSQC d'une IDP se caractérise par des fréquences de résonances très peu dispersées notamment selon la dimension ¹H. Les déplacements chimiques des proton varient sur 1 ppm pour une IDP, alors que pour une protéine structurée il varie sur environ 6 ppm. En raison de l'absence de structures secondaires stables et de liaisons hydrogènes, les protons des protéines désordonnées sont en échange avec le solvant ce qui induit une uniformisation des déplacements chimiques (Figure 42).

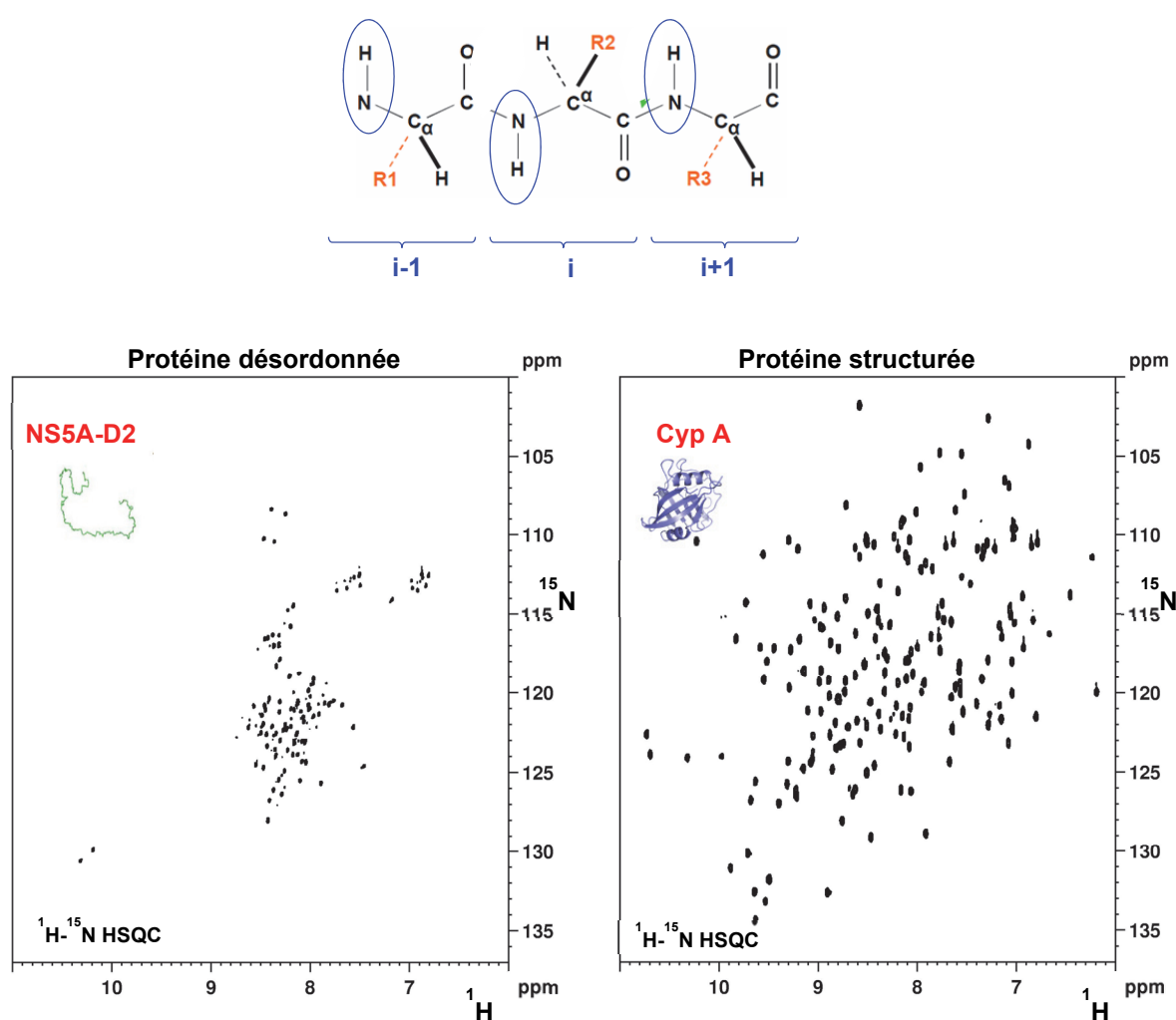


Figure 42 . Comparaison entre le spectre ¹H-¹⁵N HSQC d'une protéine désordonnée NS5A-D2 (à gauche) et une protéine structurée CypA (à droite). Chacune des résonances correspond à une fonction NH de la protéine. Les dimensions spectrales en proton et azote 15 sont identiques pour les deux spectres. On remarque une plus faible dispersion des résonances dans la dimension ¹H pour la protéine désordonnée, mais aussi légèrement pour la dimension azote.

Le premier travail à réaliser sur un spectre ^1H - ^{15}N HSQC est de faire la correspondance entre la séquence primaire en acides aminés et chaque résonance du spectre grâce à des expériences RMN en 3 dimensions. La réduction de l'étendue spectrale des protéines désordonnées pose des difficultés pour l'attribution des spectres à cause du recouvrement des résonances.

7.1.2 Attribution des résonances du spectre ^1H - ^{15}N HSQC

L'étude par RMN de protéines ne devient en général exploitable qu'à partir du moment où on dispose de l'attribution des résonances des noyaux observables (^1H , ^{15}N , ^{13}C). L'attribution des résonances du spectre ^1H - ^{15}N HSQC d'une protéine nécessite une protéine doublement marquée ^{15}N , ^{13}C . L'attribution est obtenue par une série d'expériences tridimensionnelles hétéronucléaires manipulant les spins des quatre noyaux H_N , N , C_α , C_β et C_O : HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO, HN(CA)CO, HN(Ca)NNH (Cavanagh et al., 1995). La Figure 43 relie le nom des expériences aux corrélations observées. Par exemple, l'expérience HNCO corrèle les noyaux $\text{H}_\text{N}^i - \text{N}^i - \text{C}_\text{O}^{i-1}$, l'expérience HNCACO corrèle les noyaux $\text{H}_\text{N}^i - \text{N}^i - \text{C}_\text{O}^{i-1}$ et $\text{H}_\text{N}^i - \text{N}^i - \text{C}_\text{O}^i$.

Les expériences tridimensionnelles sont interprétées par paires : HNCO et HN(CA)CO, HNCACB et HN(CO)CACB. En effet, l'expérience HNCACB permet d'observer pour chaque H_N - N du résidu i le C_α et C_β intrarésiduel et le C_α^{i-1} et C_β^{i-1} interrésiduel. L'expérience HNCOCACB avec laquelle on observe les C_α et C_β interrésiduel $i-1$ permet de discriminer les C_α et C_β du résidu i et $i-1$. La combinaison des déplacements chimiques C_α et C_β est caractéristique des acides aminés et ces deux expériences permettent d'attribuer de manière séquentielle les pics de corrélation de l'expérience ^1H - ^{15}N HSQC. Le couple HNCO et HNCACO corrèle respectivement ($\text{H}_\text{N}^i - \text{N} - \text{C}_\text{O}^{i-1}$) et ($\text{H}_\text{N}^i - \text{N} - \text{C}_\text{O}^{i-1}$; $\text{H}_\text{N}^i - \text{N} - \text{C}_\text{O}^i$). L'expérience tridimensionnelle HN(CA)NNH est utilisée afin de déterminer les déplacements chimiques azotes des résidus en position $i-1$ et $i+1$ en corrélant les noyaux H_N - N via le C_α . Toutes ces expériences sont souvent indispensables pour établir l'attribution complète du squelette peptidique de la protéine et ainsi attribuer le spectre ^1H - ^{15}N HSQC.

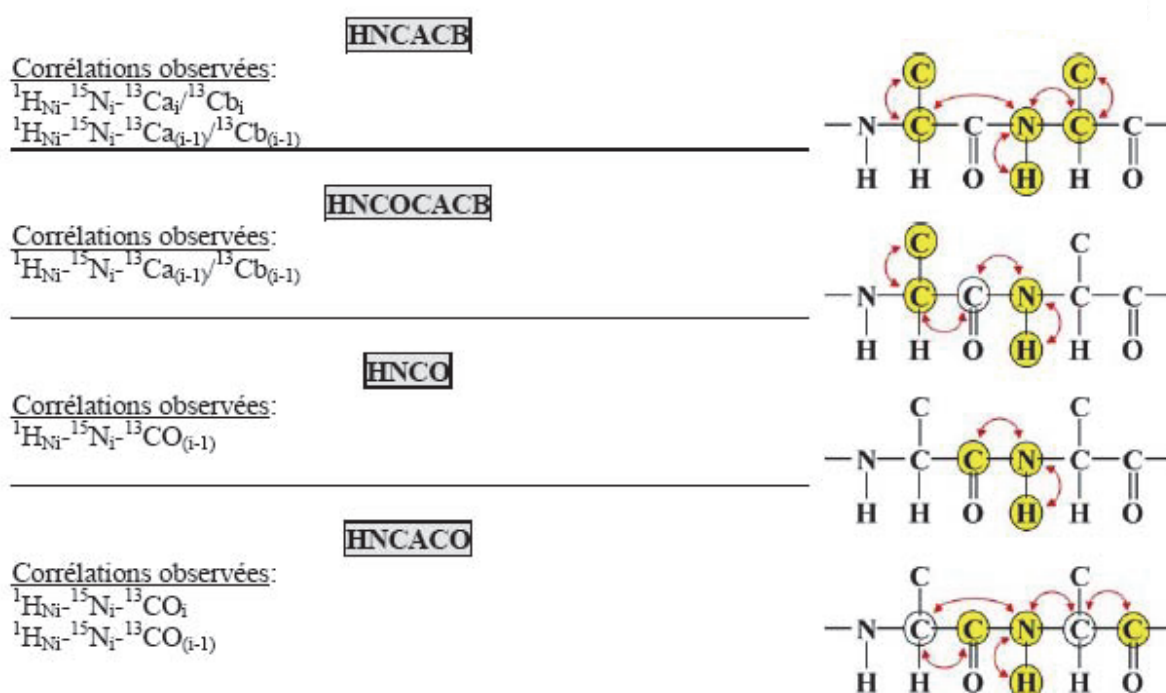


Figure 43. Stratégie d'attribution d'une protéine marquée ^{15}N - ^{13}C basée sur des expériences tridimensionnelles. Figure adaptée de Cavanagh et al., 1995.

Pour simplifier et faciliter l'attribution des spectres RMN, le laboratoire a développé un logiciel permettant une attribution plus rapide des spectres (Verdegem et al., 2008). Ce logiciel peut être défini comme « un outil d'attribution graphique et semi-automatique, qui utilise le concept des produits et sommes de plans spectraux afin d'établir les connectivités séquentielles et générer des spectres résidu-séquentiels ».

7.2 Déplacements chimiques et structures secondaires résiduelles

De par sa grande dépendance vis-à-vis de l'environnement électronique, le déplacement chimique d'un noyau est lié à plusieurs facteurs structuraux : géométrie locale des liaisons (par exemple *cis* ou *trans*), implication d'une liaison hydrogène, proximité du cycle aromatique, d'un noyau paramagnétique... Le déplacement chimique permet donc d'obtenir des informations sur l'environnement local des noyaux et sur la structure de la protéine. Pour les IDPs, le déplacement chimique mesuré rend compte de la moyenne pondérée de l'ensemble des conformères.

7.2.1 Méthode CSI Chemical Shift Index

Les noyaux H_{α} , C_{α} , C_{β} , C_O et N sont très sensibles aux structures secondaires. Des corrélations expérimentales entre déplacements chimiques et structures secondaires ont été réalisées. A cause de la grande sensibilité du déplacement chimique H_N , il est difficile de corrélérer ce déplacement chimique à la présence de structures secondaires. Wishart et al., (1991) ont montré que le déplacement chimique moyen des H_{α} de résidus impliqués dans une structure secondaire s'éloignait des valeurs *random coil*. Les valeurs *random coil* correspondent à des valeurs de références pour une conformation désordonnée des acides aminés, ce sont des valeurs moyennes mesurées sur des petits peptides. Afin d'automatiser et de rendre simple l'identification des structures secondaires d'une protéine à partir des déplacements chimiques des H_{α} , Wishart a développé un algorithme appelé *Chemical Shift Index* (CSI) ou index de déplacement chimique. Lorsque le déplacement chimique des carbones fut disponible, cet algorithme fut étendu aux C_{α} , C_{β} , C_O (Wishart and Sykes, 1994). Le principe est d'associer à chaque résidu un nombre (-1, 0, +1) en fonction de l'écart de déplacement chimique de son C_{α} ou C_O par rapport au déplacement chimique du même acide aminé en conformation *random coil* :

0 si le déplacement chimique observé est compris dans un intervalle autour du *random coil*

+1 si le déplacement chimique observé est plus grand que la borne supérieure de l'intervalle

-1 si le déplacement chimique observé est plus petit que la borne inférieure de l'intervalle

Une succession de 4 ou plus d'index « +1 » non interrompue par un « -1 » est une hélice α . Une succession de 3 ou plus de « -1 » non interrompue par un « +1 » est un brin β . Les autres régions sont en conformation *random coil*.

La procédure est identique pour les H_{α} en inversant le signe des indices (4 « -1 » = hélice α ; 3 « +1 » = brin β). Le cas des C_{β} est différent car ce noyau ne peut être corrélé à l'identification des hélices α . Pour le C_{β} , une succession de 4 ou plus d'index « +1 » non interrompue par un « -1 » est un brin β . Les hélices polyprolines de type II ont des valeurs de CSI similaires aux brins β .

Cette méthode a été développée pour les protéines structurées, pour les protéines désordonnées d'autres méthodes ont été mises en place. En effet par définition les protéines désordonnées ne possèdent pas de structures secondaires stables, elles ont des propensions intrinsèques à former des structures secondaires. La méthode *secondary structure propensity* (SSP) est plus adaptée à l'analyse de structures secondaires résiduelles au sein de protéines désordonnées.

7.2.2 Méthode *Secondary Structure propensity* (SSP)

Les déplacements chimiques ont souvent été interprétés en termes de déplacements chimiques secondaire ou *secondary chemical shift* (SCS) correspondant à la déviation du déplacement chimique expérimental par rapport aux valeurs de prédictions *random coil*. ($\Delta\delta = \Delta\delta_{\text{mesuré}} - \Delta\delta_{\text{random coil}}$). Pour les IDPs correspondant à un ensemble de conformations en équilibre, le déplacement chimique moyen mesuré peut être interprété en terme de propension à former une structure secondaire. Cependant l'interprétation de manière quantitative de l'état désordonné avec le SCS peut être difficile. Afin de contourner ce problème Marsh et al., (2009) ont développé un algorithme basé sur le SCS appelé *Secondary Structure Propensity* (SSP) qui permet une estimation quantitative de la fraction de structures secondaires au sein des IDPs. Cette méthode consiste à comparer les valeurs de déplacements chimiques mesurées expérimentalement par rapport aux valeurs *random coil* en combinant le déplacement chimique de plusieurs noyaux (C_{α} , C_{β} , C_{O} , H_N , N , H_{α}) d'un acide aminé, en un seul score SSP. Le score SSP est moyenné sur 5 résidus. Un score SSP positif indique une tendance hélicale, un score SSP négatif indique une conformation étendue ou en feuillet. La valeur du score SSP correspond à la fraction ou pourcentage pouvant adopter une conformation hélicale, étendue, ou en feuillet.

7.2.3 Méthode ncIDP (*neighbor corrected Intrinsically Disordered Protein*)

La méthode ncIDP, développée par Tamiola et al., (2010), permet de prédire avec précision le déplacement chimique d'acides aminés d'après la séquence primaire d'une protéine désordonnée. A la différence des méthodes décrites précédemment utilisant des valeurs de références *random coil* déterminée à partir de petits peptides, Tamiola et al., ont mis au point une table, un inventaire, de déplacements chimiques (N , H_N , H_{α} , C_{O} , C_{α} , C_{β}) à partir d'une collection de 14 protéines désordonnées. A partir de cet inventaire, ils ont obtenu des prédictions de déplacement chimiques dites ncIDP (*neighbor corrected Intrinsically Disordered Protein*) pour chaque acide aminé, corrigées par rapport aux résidus voisins en $i-1$ et $i+1$. Ces valeurs permettent de prédire avec précision les déplacements chimiques d'acides aminés d'après la séquence primaire de la protéine car le modèle calcule l'influence de chaque acide aminé en $i-1$ et $i+1$. Contrairement à l'analyse SSP, il s'agit d'une analyse position par position sans moyenne. Des écarts élevés entre les valeurs expérimentales et celles prédites par la méthode ncIDP sont indicatifs de structuration tandis que des écarts faibles sont indicatifs de régions désordonnées.

7.3 Détermination des angles diédraux ϕ et ψ

7.3.1 Prédications des angles diédraux ϕ et ψ à partir des déplacements chimiques

La structure 3D des protéines est définie par les angles diédraux, ϕ , ψ , et ω permettant de décrire la conformation du squelette peptidique de chaque résidu. Les angles dièdres ϕ et ψ du résidu i sont définis respectivement par les angles de torsion autour des liaisons $\text{CO}_{i-1}-\text{N}_i-\text{C}\alpha_i-\text{CO}_i$ et $\text{N}_i-\text{C}\alpha_i-\text{CO}_i-\text{N}_{i+1}$. Le troisième angle ω décrivant la liaison peptidique est en général plan en conformation *cis* ou *trans* (Figure 44). Le diagramme de Ramachandran (Figure 45), une représentation graphique de l'angle diédral ψ en fonction ϕ , permet d'analyser la conformation du squelette peptidique des protéines. Les résidus qui sont dans une hélice α sont caractérisés par des valeurs de ϕ comprises entre -30° et -90° , et celles de ψ entre -80° et 0° . Pour les feuillets β , ϕ est compris entre -90° et -180° et ψ compris entre 90° et 180° .

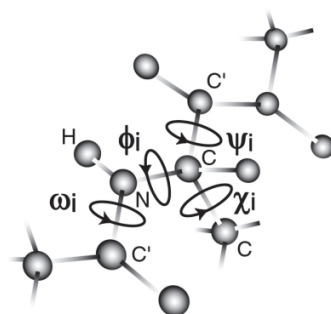


Figure 44. Définition des angles dièdres du squelette peptidique (ϕ , ψ , et ω) (Figure extraite du cours du Dr. Nathalie Sibille).

Cornilescu et al., (1999) ont poursuivi l'étude de Wishart sur la relation entre déplacements chimiques d'une protéine et structures secondaires. Ils ont mis en évidence que la séquence ainsi que les déplacements chimiques de la protéine permettent de prédire les angles dièdres du squelette peptidique de la protéine. Le programme TALOS + (Shen et al., 2009) utilise une base de données contenant les déplacements chimiques $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, ^{13}CO , $^1\text{H}_\alpha$ et ^{15}N de protéines de structures cristallographiques connues permettant de prédire de manière empirique les valeurs des angles dièdres ϕ et ψ d'une protéine à partir de sa séquence primaire et de ses déplacements chimiques ($^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, ^{13}CO , $^1\text{H}_\alpha$ et ^{15}N).

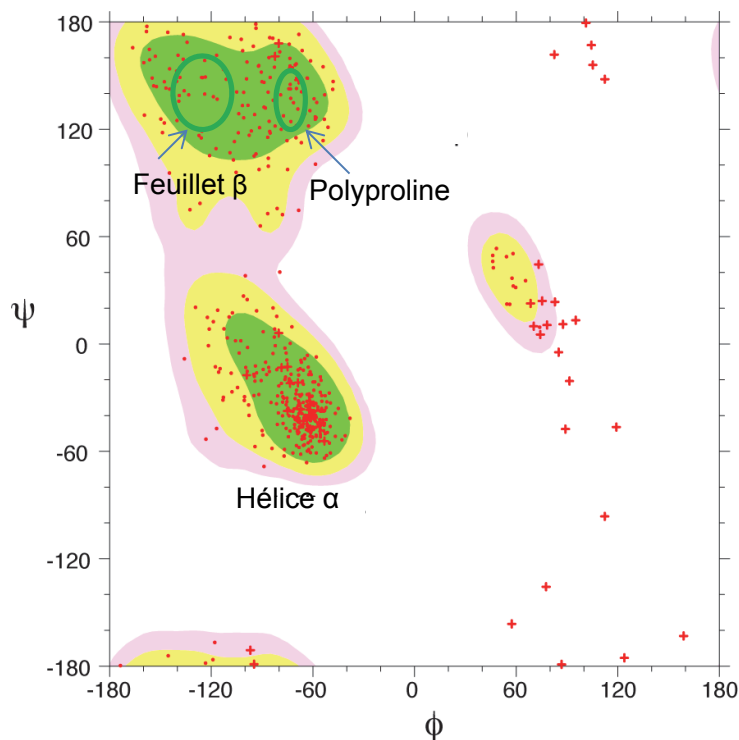


Figure 45. Diagramme de Ramachandran d'une protéine. Les régions colorées sont des régions de bases énergie.

7.3.2 Détermination de l'angle ϕ à partir des constantes de couplages ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$

La constante de couplage ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ est caractéristique de l'angle ϕ . Des expériences 3D HNHA (Vuister and Bax, 1993) donnant des corrélations intrarésiduelles entre le groupement NH et H α du squelette peptidique permettent d'obtenir les valeurs des constantes de couplages ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$. Ces valeurs sont obtenues en calculant le ratio d'intensité du proton amide et du H α , à partir de cette équation :

$$\frac{IH_{\alpha}}{IH_N} = -\tan^2(2\pi J\xi)$$

IH_{α} et IH_N sont l'intensité des signaux, ξ la durée de la période d'évolution du couplage homonucléaire utilisée lors de l'acquisition des données et J la constante de couplage scalaire. Il est possible d'estimer la valeur absolue de l'angle diédral en utilisant la relation de Karplus qui relie la constante de couplage ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ à l'angle diédral ϕ . De manière générale les constantes de couplage 3J entre deux noyaux quelconques séparés de trois liaisons formant un angle dièdre θ sont reliés par l'équation de Karplus (Karplus, 1959) :

$$3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C$$

7.4 Les contraintes de distances NOE

L'utilisation de l'Effet Overhauser Nucléaire (NOE) fournit des informations importantes sur les structures secondaires, et sur le repliement tertiaire des protéines. L'effet NOE permet d'obtenir des contraintes de distances entre protons proches dans l'espace, typiquement séparés d'une distance de moins de 5-6 Å. Cet effet NOE apparaît lorsque deux protons assez proches dans l'espace se transmettent de l'énergie à travers l'espace par une interaction de type dipôle-dipôle, il s'agit d'un couplage dipolaire entre deux protons à travers l'espace. Des spectres de corrélation dipolaire NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) sont utilisés, permettant d'obtenir des « *cross peak* », ou pic NOE, mettant en évidence le couplage dipolaire entre deux protons proches dans l'espace. L'intensité de pics NOE est directement reliée à la distance internucléaire telle que :

$$I \propto \frac{1}{r^6}$$

Dans les cas des protéines structurées, il est d'usage d'utiliser l'effet NOE pour déterminer leur structure tridimensionnelle. A partir des spectres NOESY, une liste de contraintes de distance interatomique NOEs est obtenue et peut être utilisée dans un protocole de modélisation sous contraintes.

Très souvent l'observation de l'effet NOE n'est pas très adaptée à l'étude des protéines désordonnées. L'effet NOE étant existant à moins de 6 Å, des contraintes de distances entre protons suffisamment proches dans l'espace, et appartenant à des résidus éloignés dans la séquence primaire de la protéine, ne sont pas observables la plupart du temps dans les IDPs. Une autre méthode permettant de déterminer des contacts longues distances est souvent utilisée pour les IDPs, il s'agit de la relaxation paramagnétique (PRE, *Paramagnetic Relaxation Enhancement*).

7.5 La relaxation paramagnétique

Pour les IDPs, les contacts NOEs à longue distance peuvent être très difficiles à observer, car les structures transitoires sont très faiblement peuplées. Par contre, des informations à longue distance peuvent être obtenues par l'utilisation d'une sonde paramagnétique.

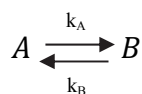
La méthode consiste à attacher sur une cystéine de la protéine un groupement possédant un radical libre, par exemple un groupement nitroxyde. Dans l'état oxydé (paramagnétique), le groupement nitroxyde possède un électron libre qui augmente la relaxation transversale R2 du signal. Sur un spectre ^1H - ^{15}N HSQC, on observe alors une augmentation de la largeur de raie et une diminution de l'intensité des pics correspondant aux acides aminés suffisamment proches dans l'espace de l'électron non apparié. Aucun effet n'est observé lorsque le groupement nitroxyde est réduit (diamagnétique). Les contacts transitoires à longues distances sont observés grâce à cette diminution d'intensité sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC.

Comme le rapport gyromagnétique de l'électron est 660 fois plus important que celui du proton, cette méthode permet de caractériser des interactions longues distances pour des noyaux séparés d'une distance dans l'espace pouvant aller jusqu'à 20 Å.

7.6 L'échange chimique en RMN

Le déplacement chimique d'un noyau est très sensible à l'environnement physico-chimique. Ainsi le déplacement chimique d'un noyau change lorsque son environnement chimique est modifié. Dans une protéine ceci peut arriver pour différentes raisons, échange entre différentes conformation, isomérisation *cis/trans* d'une liaison peptidique, liaison à un partenaire, réactions chimiques... Durant ces processus les noyaux sont en échange entre différents environnements chimiques, ce qui conduit au phénomène « d'échange chimique ».

Si on considère un noyau en échange entre deux conformations A et B :



k_A et k_B sont les constantes cinétiques de formation de B et A respectivement, la constante d'échange entre A et B est définie par $k_{\text{ex}} = k_A + k_B = k_A/P_B = k_B/P_A$, où P_A et P_B représentent les populations de A et B respectivement. ω_A et ω_B sont les déplacements chimiques de A et B et $\Delta\omega = \omega_B - \omega_A$ est la différence de déplacement chimique entre A et B. En fonction des valeurs de la constante d'échange, k_{ex} , et de la différence de déplacement chimique $\Delta\omega$ entre les deux conformations A et B, on aboutit à différents régimes d'échanges. Les résonances correspondant aux conformations A et B sont modifiées en fonction du type de régime d'échange (Figure 46) :

- Echange lent : $k_{ex} \ll \Delta\omega$: on observe sur le spectre RMN deux résonances ω_A et ω_B
- Echange intermédiaire : $k_{ex} \sim \Delta\omega$: on observe sur le spectre RMN un élargissement de la largeur de pic
- Echange rapide : $k_{ex} \gg \Delta\omega$: on observe sur le spectre RMN un pic dont la position dépend du ratio des populations de A et B

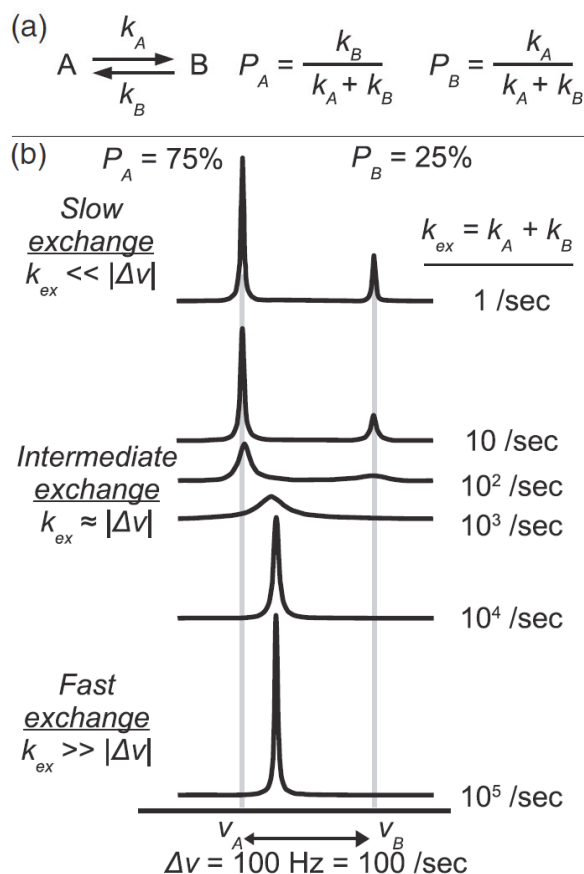


Figure 46. L'échange chimique en RMN (Kleckner and Foster, 2011). Exemple d'un échange entre deux conformations A et B sur un spectre RMN 1D, où la population de A (P_A) est de 75 % et la population de B (P_B) de 25 %. Le taux d'échange (k_{ex}) entre ces deux conformations augmente de haut en bas.

Ces différents régimes d'échanges peuvent être étudiés grâce à différentes expériences RMN présentées dans le paragraphe suivant.

7.7 Etude de la dynamique des protéines par RMN

De nombreuses techniques RMN ont été développées permettant de détecter les mouvements au sein des protéines. Ces mouvements ont lieu à différentes échelles de temps, et pour chacune d'elles, il est possible d'associer une expérience RMN permettant de caractériser ces mouvements

(Figure 47). La RMN peut être utilisée pour étudier la dynamique des protéines sur des échelles de temps allant de la picosecondes à plusieurs minutes.

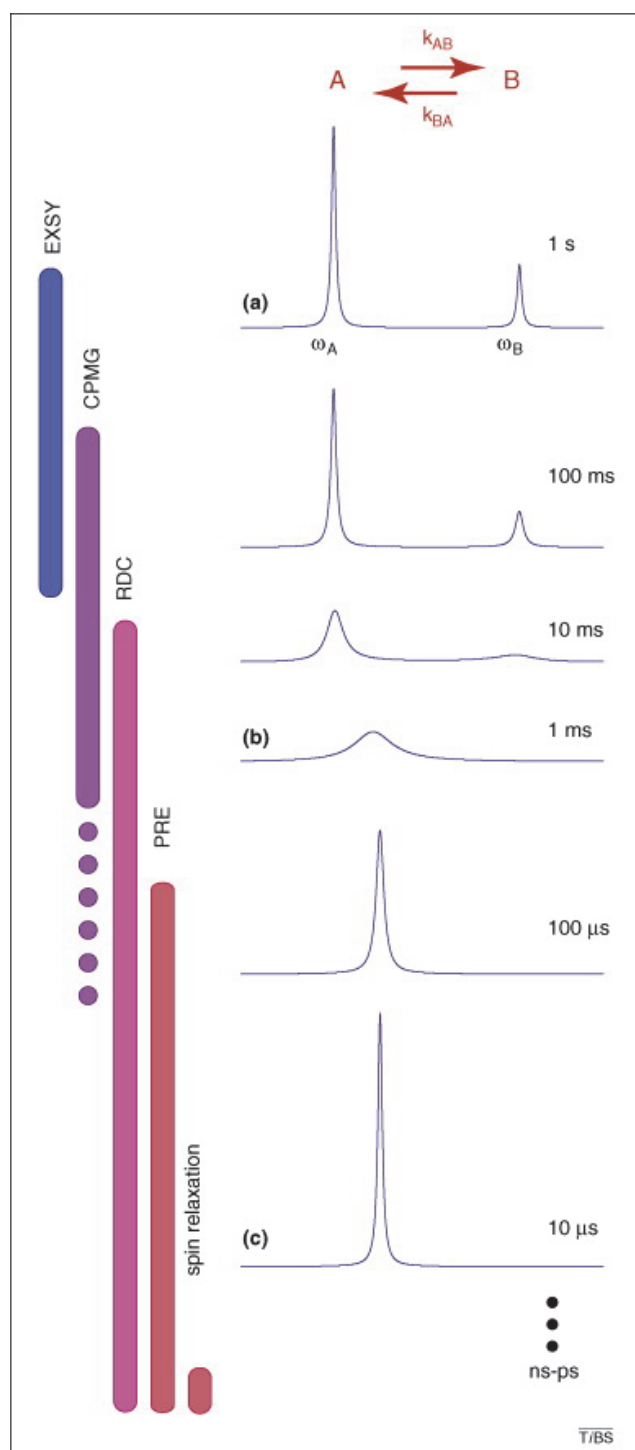


Figure 47. Expériences de dynamique utilisées en RMN et échelles de temps associées (Mittermaier and Kay, 2009).

L'échange entre deux conformations A et B permet d'illustrer la sensibilité de la RMN aux différentes échelles de temps des mouvements moléculaires. Un spectre 1D est illustré pour un noyau en échange entre deux environnements chimiques, dans un ratio 3:1 et associé aux déplacements chimiques ω_A et ω_B respectivement ($\Delta\omega = \omega_B - \omega_A = 100\text{Hz}$ = différence en déplacement chimique). Le temps indiqué sur la droite correspond à $k_{ex} = (k_{AB} + k_{BA})$. **(a)** Lorsque la vitesse d'échange est plus lente que la différence en déplacement chimique $k_{ex} \ll \Delta\omega$, les pics séparés peuvent être observés pour les deux états. Des expériences EXSY peuvent être utilisées pour déterminer la cinétique d'échange entre A et B. **(b)** Lorsque la vitesse d'échange est à peu près la même que la différence en déplacement chimique $k_{ex} \sim \Delta\omega$, il y a un élargissement du pic. L'échange peut être mesuré par des expériences CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill). **(c)** Lorsque l'échange est plus rapide que la différence de déplacement chimique $k_{ex} \gg \Delta\omega$, on observe un seul pic fin, dont la position dépend du ratio de population entre les deux conformations A et B. Dans ces conditions, les mouvements s'effectuent à une échelle de temps proche de la fréquence de Larmor (de l'ordre de la ns). Ces mouvements influencent la relaxation du signal RMN, qui est lié au temps de corrélation τ_c de la molécule. La dynamique de ces mouvements est détectable par des expériences de relaxation, elles permettent de mesurer la vitesse à laquelle le signal RMN retourne à l'équilibre. De plus des expériences de couplages dipolaires résiduels (RDC), de relaxation paramagnétique (PRE) donnent également des informations sur la dynamique des protéines.

7.7.1 Les paramètres de relaxation, R1, R2 et l'effet nOe hétéronucléaire

A l'équilibre, la magnétisation des noyaux de l'échantillon RMN est alignée avec le champ magnétique du spectromètre RMN. Après une perturbation de l'alimentation par une impulsion radiofréquence, la magnétisation retourne à l'équilibre. La vitesse de retour à l'équilibre de la magnétisation est gouvernée par la dynamique interne de la molécule sur une échelle de temps allant de nanoseconde à la picoseconde (Figure 47 (c)). Ces mouvements sont liés au temps de corrélation de la molécule τ_c ; pour une protéine en solution, c'est le temps moyen dont une protéine a besoin pour accomplir une rotation d'un radian. Trois vitesses de relaxations, R1, R2, et l'effet nOe hétéronucléaire peuvent être mesurées en RMN. C'est celle du noyau d'azote 15 qui est mesurée. Les relaxations ^{15}N R1, ^{15}N R2 et l'effet nOe hétéronucléaire sont liées aux mouvements des vecteurs ^{15}N - ^1H , et à la rotation globale, le τ_c de la molécule.

La relaxation longitudinale R1 (aussi appelée relaxation dans la direction z) correspond au retour de l'aimantation à l'équilibre parallèle au champ magnétique B_0 .

La relaxation transversale R2 (aussi appelée relaxation dans le plan xy) correspond à la perte de magnétisation dans le plan xy. Cette relaxation est due à la perte de cohérence entre les spins.

L'effet nOe hétéronucléaire ^1H - ^{15}N correspond à un échange d'aimantation entre les spins ^1H et ^{15}N en interaction dipolaire. Il traduit l'amplitude des mouvements entre ces deux spins sur une échelle de temps très rapide.

La mesure de ces paramètres de relaxation R1 et R2 s'effectue typiquement par des séries de spectres ^1H - ^{15}N HSQC enregistrées avec un temps de relaxation variable, l'intensité du pic en fonction du temps de relaxation est mesurée ce qui permet d'extraire le taux de relaxation (Figure 48).

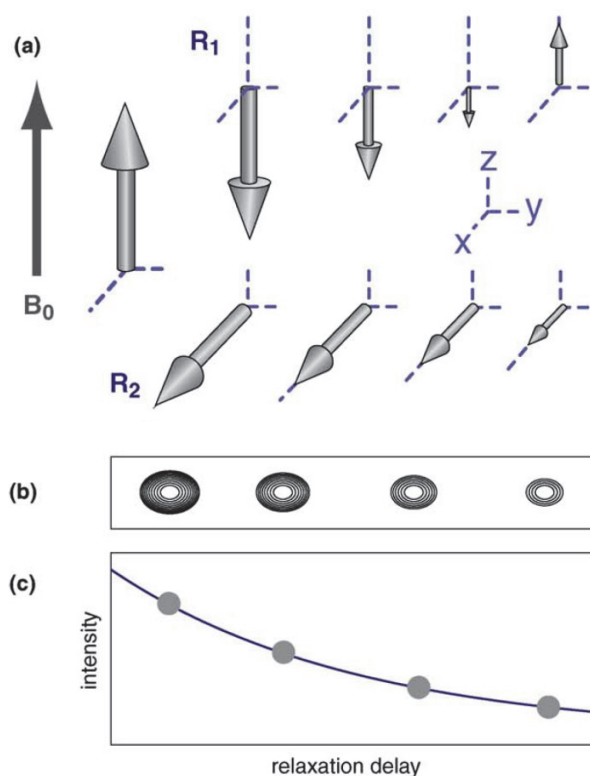


Figure 48. Mesure des paramètres de relaxation. (Mittermaier and Kay, 2009). **(a)** Retour à l'équilibre de la magnétisation après une impulsion radiofréquence RF. La diminution de la magnétisation dans le plan transversal (x,y) et l'évolution de la magnétisation longitudinale parallèle à B_0 sont caractérisées par des vitesses de relaxation R_2 et R_1 respectivement. **(b,c)** Diminution de l'intensité des pics en fonction du temps de relaxation de l'expérience RMN.

La valeur du paramètre R_2 est directement liée à la largeur de raie des pics sur le spectre. Plus la protéine est flexible, plus la largeur de raie et la valeur du paramètre R_2 diminuent. La relaxation transversale R_2 est en effet plus lente pour les protéines désordonnées que pour les protéines structurées. Ceci se traduit sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC par des largeurs de raies plus fines pour les protéines désordonnées.

La relaxation longitudinale R_1 et transversale R_2 traduisent des mouvements du vecteur ^{15}N - ^1H sur une gamme de temps de l'ordre de la picoseconde. Pour la relaxation transversale R_2 , il existe également une contribution du Chemical Shift Anisotropy (CSA) et il peut exister un mécanisme supplémentaire, dont le mouvement est sur une échelle de temps plus lente que la picoseconde. Ce mécanisme correspond à l'échange entre plusieurs états conformationnels de la protéine dans une gamme de temps de la μs - ms . Il peut donc y avoir une contribution supplémentaire au paramètre de relaxation R_2 , s'il existe un échange entre plusieurs conformations. La relaxation transversale peut alors s'écrire de manière simplifiée : $R_2^{\text{app}} = R_2 + R_2^{\text{échange}}$. Ceci se traduit sur le spectre par une largeur de raie plus importante ce qui est illustré sur la Figure 47 **(b)**.

Afin de déterminer s'il existe un échange entre plusieurs conformations sur l'échelle de temps μ s-ms, des expériences de type CPMG peuvent être utilisées.

7.7.2 Les mesures CPMG

Des mesures de dispersions de relaxations, appelées aussi mesures CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), peuvent être appliquées à des systèmes où l'échange conformationnel a lieu sur une échelle de temps de l'ordre de 100 ms – 0,1 ms. L'échange conformationnel sur cette échelle de temps induit un élargissement du pic, et une augmentation la vitesse de relaxation (Figure 47 **(b)**). Pour mesurer la dispersion de relaxation, des pulses de refocalisation sont appliqués lors de l'évolution de magnétisation qui varie de manière aléatoire à cause de l'échange. L'effet des pulses de refocalisation est illustré Figure 49 (a-c). La phase du signal est tracée en fonction du temps, la pente représente le déplacement chimique. Chaque pulse de refocalisation change la direction de l'évolution du signal. A cause de l'évolution aléatoire du déplacement chimique (pente), chaque noyau suit une trajectoire différente ce qui provoque un déphasage de la magnétisation, un pic de faible intensité sur le spectre RMN, et un paramètre de relaxation élevé. Lorsque le nombre de pulses de refocalisation augmente, il y a moins de déphasage, ce qui conduit à des valeurs de R2 plus faibles. Les données CPMG sont souvent représentées par des graphiques de la valeur R2 en fonction de la fréquence du pulse CPMG (ν_{CPMG}), Figure 49 (e) (Mittermaier and Kay, 2009). Si la valeur du R2 diminue en fonction de la fréquence du pulse CPMG, cela signifie qu'il existe un échange sur une échelle de temps de l'ordre de la μ s-ms. S'il s'agit d'un échange entre deux conformations, il est possible à partir de cette courbe d'extraire la vitesse d'échange k_{ex} et la différence en déplacement chimique entre ces deux conformations: $\Delta\omega$.

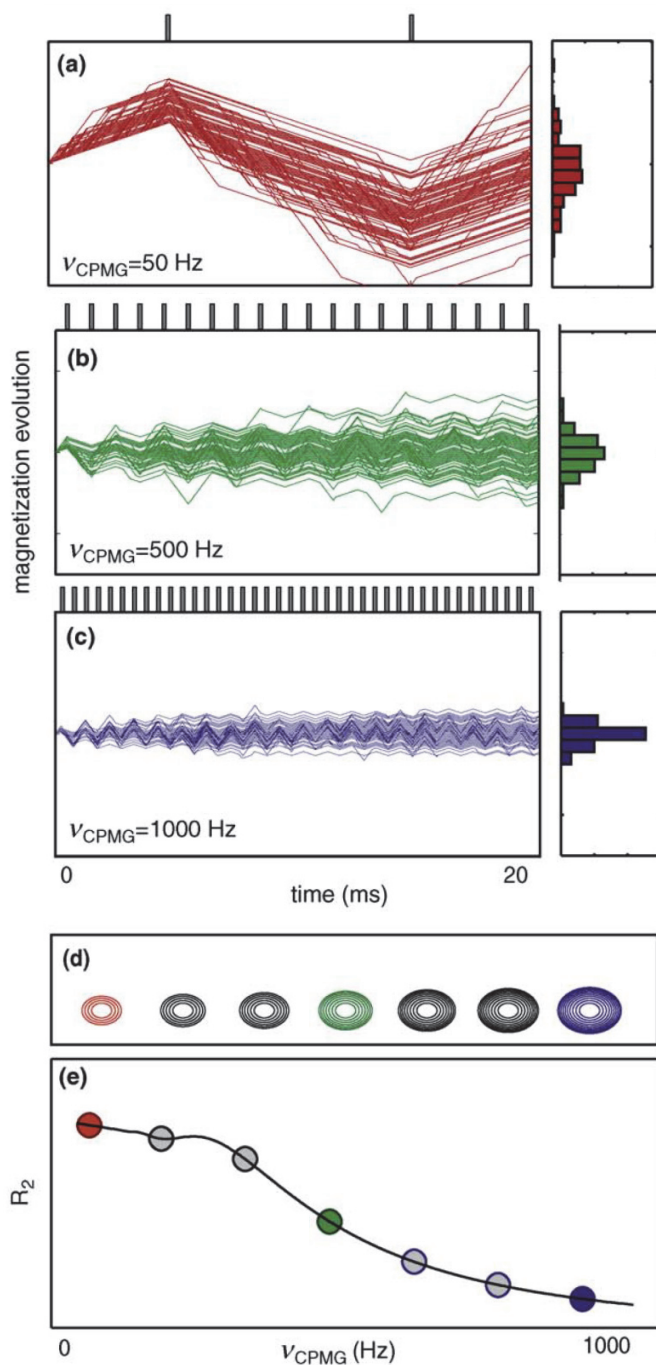


Figure 49. Expériences de dispersions de relaxations CPMG. (Mittermaier and Kay, 2009) (a-c) Simulation du signal de la trajectoire d'un ensemble de noyaux en échange entre deux environnements avec des déplacements chimiques différents. Le délai de relaxation est de 20 ms, les barres verticales au-dessus de chaque panneau représentent les pulses de refocalisation appliqués pendant le délai de relaxation de 20 ms. (d) Augmentation de l'intensité des pics lorsque la fréquence des pulses de refocalisation augmente. (e) Taux de relaxation R_2 calculé en fonction de la fréquence du pulse CPMG ν_{CPMG} .

7.7.3 Mesure d'un échange lent entre deux conformations : EXSY

Les expériences de type EXSY (*Exchange Spectroscopy*) permettent d'étudier les échanges lents (de 0,1 à 10 s) sur l'échelle de temps de la RMN. C'est-à-dire lorsque les différentes conformations sont directement visibles sur le spectre RMN (Figure 47 (a)). Si on reprend l'exemple d'un noyau en échange lent entre deux conformations A et B, $k_{\text{ex}} \ll \Delta\omega$, ceci se

traduit sur le spectre par deux fréquences de résonances, dont l'intensité des pics est proportionnelle à la quantité de noyaux en conformation A et B. Les expériences de type EXSY sont une variante des expériences de corrélation multidimensionnelle. Par exemple, dans une expérience de corrélation multidimensionnelle ^1H - ^{15}N HSQC, la magnétisation est transférée du ^1H vers le ^{15}N , la magnétisation ^{15}N est enregistrée, la magnétisation retourne sur le ^1H et le déplacement chimique proton est détecté. Dans l'expérience EXSY correspondante (expérience ^1H - ^{15}N z-exchange), un délai T est inséré entre la période de détection de déplacement chimique ^{15}N et ^1H (Farrow et al., 1994). Lorsque $T=0$, on observe deux pics correspondant aux états A et B. Lorsque $T > 0$, certains noyaux qui étaient initialement dans la conformation A s'échangent en conformation B pendant le délai T, ce qui donne un pic d'échange à la fréquence du déplacement chimique ^{15}N de A et à la fréquence de déplacement chimique ^1H de B, et inversement pour le changement de conformation de B en A. L'intensité des pics d'échanges (AB et BA) augmente en fonction du délai T (Figure 50 (c)). Pour des délais plus longs, l'intensité de tous les pics (AA, BB, AB et BA) diminue à cause de la relaxation du signal. Une série de spectres RMN est enregistrée avec des délais T variant de 0 à 1 s en fonction des différents systèmes étudiés. On peut alors déterminer la constante d'échange entre A et B, k_{exch} , à partir des courbes d'intensité en fonction du délai T (Figure 50 (c)).

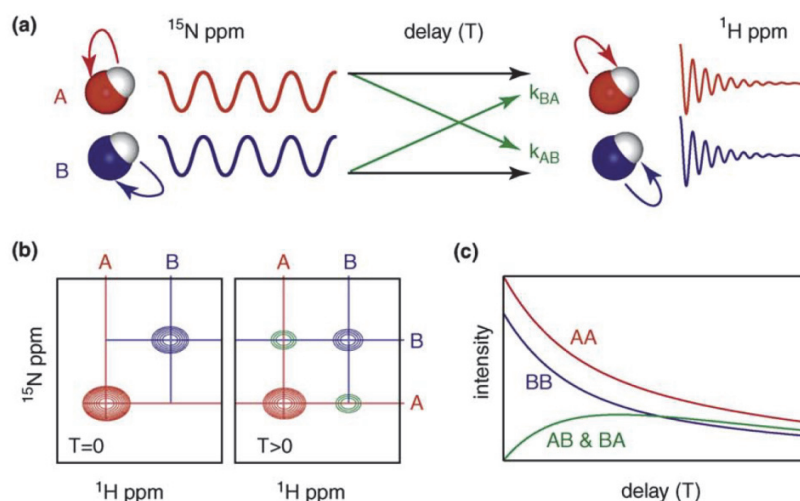


Figure 50. Expérience ^1H - ^{15}N z-exchange. (Mittermaier and Kay, 2009) (a) Représentation schématique de la séquence d'impulsion d'une expérience ^1H - ^{15}N z-exchange. (b) Spectre ^1H - ^{15}N z-exchange, les pics rouges et bleus correspondent aux conformations A et B, et les pics verts sont les pics d'échanges entre les conformations A et B dues au délai T. (c) Intensité des pics en fonction du délai permettant d'extraire le k_{exch} .

L'expérience ^1H - ^{15}N z-exchange est typiquement utilisée pour mesurer l'activité des enzymes PPIase.

7.8 Etude d'activités enzymatiques par RMN

7.8.1 Etude de l'activité PPIase

L'activité PPIase, correspondant à l'isomérisation *cis/trans* de la liaison peptidique précédant un résidu de proline, est une modification post-traductionnelle non covalente qui ne modifie pas la protéine chimiquement, et qui est par conséquent difficile à caractériser par les techniques classiques de biochimie.

7.8.1.1 Identification de PPIases par couplage avec la chymotrypsine

Le premier test permettant de détecter une activité PPIase a été mis au point en 1984 par Fisher Bang et al. Dans ce test, la chymotrypsine reconnaît spécifiquement la conformation *trans* d'une liaison X-pro d'un peptide modèle X-Pro-Phe-pNA (X étant un acide aminé et pNA, la para-nitroaniline) et libère par coupure le groupement pNA coloré, l'absorbance est mesurée en fonction du temps. En présence d'une PPIase, l'interconversion *cis/trans* de la liaison X-Pro du peptide modèle s'accélère et l'absorbance augmente plus rapidement. Ce test permet de détecter une activité PPIase et de déterminer la spécificité d'une PPIase concernant le résidu X. L'inconvénient majeur de cette méthode est d'utiliser un substrat modèle.

7.8.1.2 Caractérisation de l'activité PPIase par RMN

La RMN permet de mesurer l'activité PPIase d'une enzyme directement sur le substrat d'intérêt. La RMN est le seul outil qui permet une caractérisation à la fois spécifique, cinétique, structurale et quantitative de l'activité PPIase. L'isomérisation *cis/trans* des prolines étant relativement lente (de l'ordre de la minute) sur l'échelle de temps de la RMN, il est possible d'observer directement les deux conformations sur un spectre ^1H - ^{15}N HSQC. Les outils permettant l'étude de l'activité d'isomérisation sont notamment les expériences de type EXSY, décrite précédemment (7.7.3). Il est possible d'observer l'échange entre les conformères correspondants à une proline en *cis* ou en *trans* soit dans des expériences homonucléaires $^1\text{H}/^1\text{H}$ soit dans des expériences hétéronucléaires ^1H - ^{15}N z-exchange. Pour les spectres homonucléaires EXSY, il peut être difficile d'attribuer les résonances si la protéine est désordonnée, à cause du trop grand recouvrement des signaux dans la dimension ^1H . Les spectres ^1H - ^{15}N z-exchange permettent d'attribuer les pics plus facilement. Le taux d'échange chimique k_{exch} (c'est-à-dire le taux d'isomérisation *cis/trans* d'une liaison peptidyl prolyl en présence d'une PPIase) est déterminé en mesurant les intensités des pics

correspondant aux deux conformères *cis* et *trans* et des pics d'échanges. Il est possible de prendre en compte uniquement l'intensité du pic d'échange *trans-cis* (I_{tc}) et l'intensité du pic *trans* (I_{tt}). k_{exch} est une fonction du temps de mélange, délai T , qui est déterminé par cette Equation :

$$\frac{I_{tc}}{I_{tt}} = \frac{-pc + pc \times e^{(K_{\text{exch}} \times T)}}{pc + pt \times e^{(K_{\text{exch}} \times T)}}$$

Les populations d'un acide aminé en conformation *cis* et *trans*, représentées par pc et pt respectivement sont déterminées à partir des intensités relatives de cet acide aminé qui ressent une proline à proximité en conformation *cis* et en conformation *trans*. T est le temps de mélange, c'est-à-dire le temps pendant lequel on laisse l'échange se faire (il correspond au temps d'évolution du système dans la séquence d'impulsion RMN). Cette équation est une version simplifiée de l'équation utilisée par (Bosco and Kern, 2004). Le k_{exch} est déterminé sur des résidus possédant une hétérogénéité de populations, avec une forme majoritaire et une forme minoritaire. Ces formes minoritaires s'expliquent par la présence d'une proline à proximité qui est en équilibre *cis/trans*. La méthode consiste à mesurer I_{tc}/I_{tt} pour un résidu donné situé à proximité d'une proline en fonction d'un temps de mélange croissant. Ceci permet de déduire le k_{exch} d'une liaison peptidique X-Pro à partir de l'équation précédente (Figure 51).

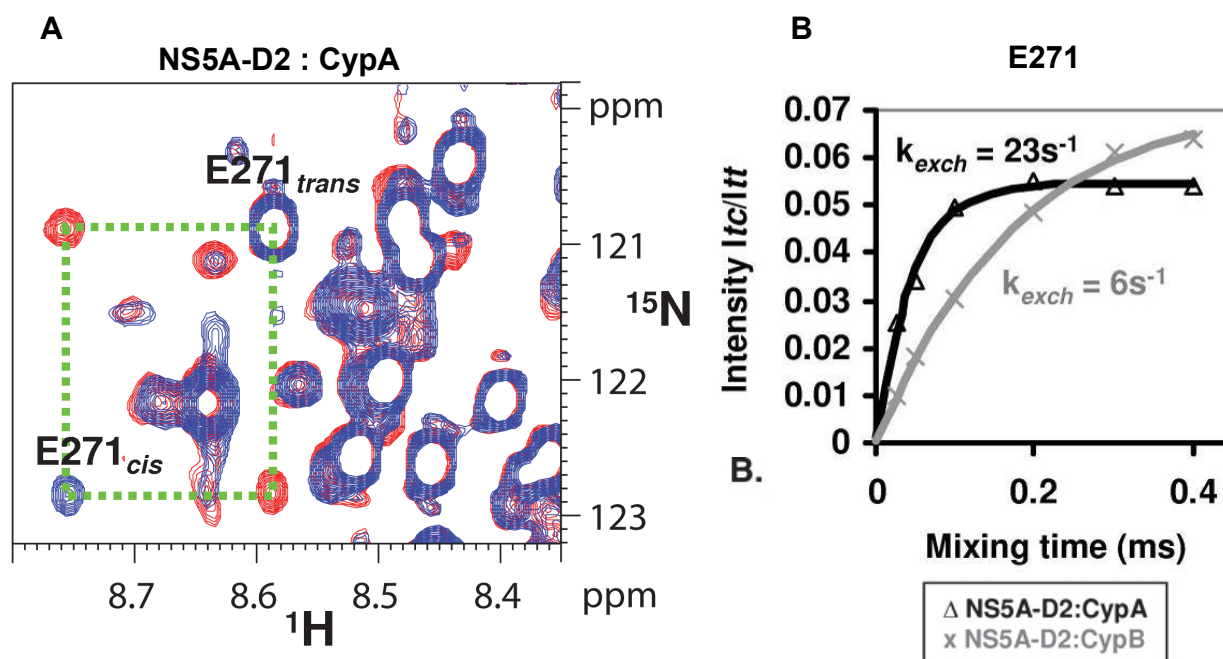


Figure 51. Isomérisation *cis/trans* de liaisons peptidiques X-Pro de NS5A-D2 par la CypA (Hanouille et al., 2009b). A, Spectre ^1H - ^{15}N z-exchange (centré sur les résonances E271 majoritaire et E271 minoritaire) enregistré avec un temps de mélange de 0.88 ms en bleu et 100 ms en rouge sur ^{15}N -NS5A-D2 avec des quantités catalytiques de CypA en ratio (10 : 1). Les résonances RMN de NS5A-D2 (*trans* et pics d'échanges) du résidu E271 sont connecté par une ligne en pointillé verte. B, Détermination du k_{exch} d'une liaison peptidique X-Pro en présence de CypA.

La RMN permet de déterminer si la liaison peptidique précédant un résidu de proline est en conformation *cis* ou *trans*. Sur des spectres ^1H - ^1H NOESY, il existe des contacts NOE caractéristiques d'une proline en conformation *cis* ou *trans*. Un contact NOE entre le H_δ des prolines et le H_α du résidu $i-1$ est caractéristique d'une liaison peptidique en conformation *trans*. Un contact NOE entre le H_α des prolines et le H_α du résidu $i-1$ est caractéristique d'une liaison peptidique en conformation *cis*. (Wuthrich, 1986). Les déplacements chimiques ^{13}C des prolines sont également caractéristiques d'une liaison X_{aa} -Pro en conformation *cis* ou *trans* (Schubert et al., 2002). Il a été remarqué qu'une proline en conformation *cis* induit une modification du déplacement chimique $^{13}\text{C}_\gamma$ vers les hauts champs et une modification du déplacement chimique $^{13}\text{C}_\beta$ vers les bas champs. Ainsi, la différence de déplacement chimique $\Delta\delta_{\beta\gamma} = \delta(^{13}\text{C}_\beta) - \delta(^{13}\text{C}_\gamma)$ est caractéristique d'une liaison X_{aa} -Pro en conformation *cis* ou *trans*. Statistiquement, pour une conformation *trans*, $\Delta\delta_{\beta\gamma}$ est de l'ordre de 4.5 ppm, et pour une conformation *cis* $\Delta\delta_{\beta\gamma}$ est de l'ordre de 9.64 ppm. Il est également possible de se baser uniquement sur le déplacement chimique du $^{13}\text{C}_\beta$. Si $\delta(^{13}\text{C}_\beta) \sim 32$ ppm, la liaison X_{aa} -Pro est en conformation *trans*. Si $\delta(^{13}\text{C}_\beta) \sim 34$ ppm la liaison X_{aa} -Pro est en conformation *cis*.

7.8.2 Etude de cinétique enzymatique par RMN

L'étude des cinétiques enzymatiques est importante pour déterminer les mécanismes de réactions enzymatiques. La RMN est une technique intéressante qui permet de quantifier à la fois le substrat et le produit de la réaction, mais elle nécessite de grandes quantités d'échantillons par rapport aux autres méthodes standard comme les dosages UV, ou la fluorescence.

La RMN permet de déterminer les mécanismes de réactions enzymatiques tels que les paramètres cinétiques d'une enzyme K_M et V_{max} , l'effet d'inhibiteurs ou activateurs de la réaction. L'hydrolyse du sucrose en glucose et fructose par l'invertase permet d'illustrer l'utilisation de la RMN pour étudier les mécanismes de réactions enzymatique (Exnowitz et al., 2012). Des expériences proton en une dimension enregistrées au cours du temps permettent de suivre la disparition du sucrose et l'apparition de l' α -glucose, du β -glucose, du β -fructopyranose et du β -fructofuranose (Figure 52).

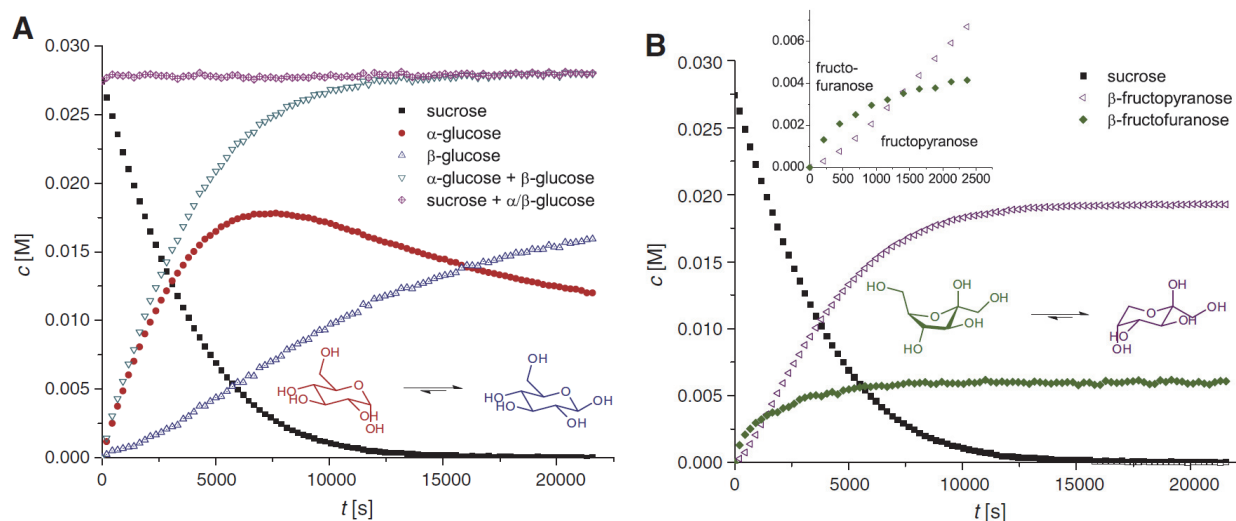


Figure 52. Caractérisation par RMN de l'hydrolyse du sucrose par l'invertase. (Exnowitz et al., 2012) La concentration initiale en sucrose est de 27.4 mM. Chaque point correspond à une expérience 1D proton. Le signal des protons anomères H1 de l' α - et du β -glucose (A) et le H1 du β -fructopyranose et H5 du β fructopyranose (B) isolé sur les spectres RMN sont intégrés, permettant de quantifier l'apparition du produit. La somme de la concentration totale en glucose et de la concentration en sucrose est tracée en fonction du temps (A) permettant de vérifier la stabilité du signal RMN au cours du temps.

Parfois les spectres 1D proton ne permettent pas de quantifier avec précision l'évolution du substrat et du produit de la réaction enzymatique à cause des trop nombreuses superpositions des signaux sur les spectres. Pour contourner ce problème, Richter and Berger (2013) ont mis au point une méthode RMN permettant de suivre la cinétique de phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate par l'hexokinase de levure. Cette méthode permet également de déterminer la spécificité de phosphorylation de l'hexokinase de levure vis-à-vis des anomères α et β du glucose. La méthode RMN est une expérience de corrélation 2D ^1H - ^{13}C utilisant un filtre pour le spin ^{31}P . Cette expérience, nommée HCP, permet de détecter uniquement les paires ^1H - ^{13}C d'une molécule phosphorylée. Le spectre HCP du glucose-6-phosphate possède 3 signaux : correspondant au C6, C5 α et C5 β du glucose-6-phosphate (Figure 53 A). Pour étudier la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate par l'hexokinase de levure, des spectres HCP sont enregistrés au cours du temps. Les signaux du C5 α , C5 β et du C6(α + β) sont intégrés permettant de suivre la cinétique de phosphorylation des 2 anomères du glucose (Figure 53 B).

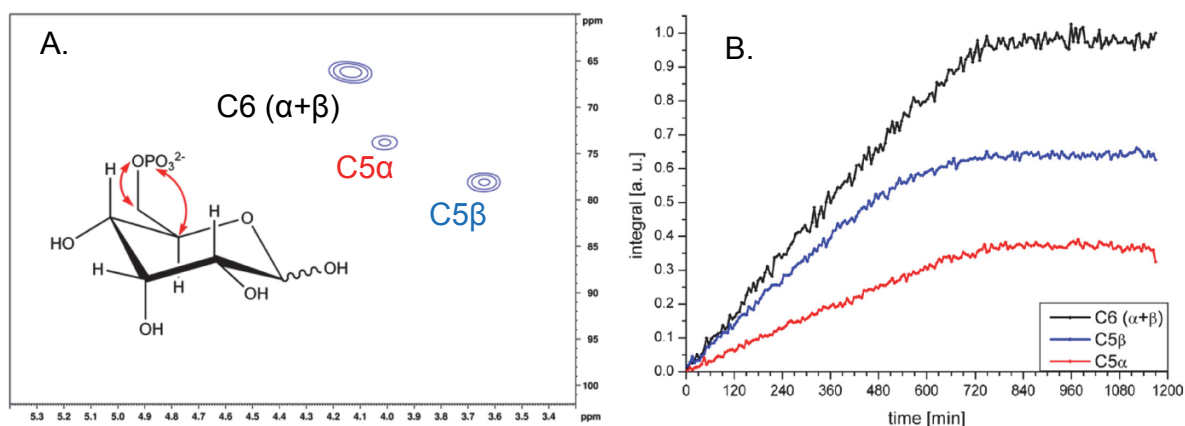


Figure 53. Etude par RMN de la phosphorylation du glucose par l'hexokinase de levure. Richter and Berger (2013). A, Spectre HCP du glucose-6-phosphate obtenu par phosphorylation du glucose par l'hexokinase, les signaux correspondent aux C6 ($\delta_c= 66$ ppm) C5 α ($\delta_c= 74$ ppm) et C5 β ($\delta_c= 78$ ppm) du glucose-6-phosphate. B, Intégration relative des signaux du C5 α (rouge), C5 β (bleu) et C6 ($\alpha+\beta$) (noir) sur les spectres HCP lors de la phosphorylation du glucose par l'hexokinase.

Il est possible de déterminer les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique (K_M et V_{max}) en mesurant la vitesse initiale de celle-ci à différentes concentrations en substrat à partir de l'équation de Michaelis-Menten :

$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Cependant mesurer la vitesse initiale de la réaction par RMN à différentes concentrations en substrats (et par d'autres techniques analytiques) est une procédure demandant beaucoup de temps et d'échantillon. Une autre approche consiste à analyser uniquement une courbe cinétique à une seule concentration en substrat (Exnowitz et al., 2012). Pour cela l'équation de Michaelis-Menten est intégrée puis transformée en utilisant la fonction de Lambert W, définie comme la fonction inverse de xe^x , c'est-à-dire $W(x) + \ln\{W(x)\} = \ln(x)$. L'équation obtenue est une concentration du substrat (ou du produit) en fonction du temps :

$$[S] = K_m \cdot W \left\{ \frac{[S_0]}{K_m} \exp \left(\frac{[S_0]}{K_m} - \frac{V_{max} \cdot t}{K_m} \right) \right\}$$

En utilisant cette approche mathématique, Richter and Berger ont pu déterminer les paramètres cinétiques de l'hexokinase de levure vis-à-vis des anomères α et β du glucose en utilisant une seule courbe cinétique à une seule concentration en substrat. Ils trouvent une affinité de l'hexokinase pour le β -glucose 4 fois supérieure par rapport à l' α -glucose et une V_{max} deux fois supérieure pour l' α -glucose par rapport au β -glucose.

Objectifs

Il est maintenant bien établi que la protéine NS5A joue un rôle essentiel dans l'infection par le virus de l'hépatite C directement au niveau de la réplication du virus, et indirectement en perturbant certaines voies métaboliques de la cellule hôte favorisant ainsi la réplication du VHC. Cependant sa/ses fonction(s) précise(s) reste(nt) à déterminer. NS5A est ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique via une hélice amphipathique, elle est composée de trois domaines cytoplasmiques : D1, D2 et D3. NS5A-D1 possède une structure tertiaire bien définie qui a été caractérisée par cristallographie et interagit avec l'ARN viral. NS5A-D2 et NS5A-D3 ont quant à eux été caractérisés par RMN dans notre laboratoire et sont intrinsèquement désordonnés. Ces domaines ne possèdent donc pas de structures tertiaires stables mais existent comme un ensemble dynamique de conformères en solution. NS5A est la protéine du VHC qui possède le plus grand pourcentage de désordre, ce qui lui permet d'interagir avec un nombre important de partenaires cellulaires (>100). Dans ce contexte, NS5A ainsi que ses interactions avec les facteurs de l'hôte, constitue une cible thérapeutique prometteuse. L'objectif est de mieux comprendre la fonction du domaine 2 de la protéine NS5A à la fois dans le cadre de la réplication de l'ARN viral et dans le cadre de son implication dans les perturbations du métabolisme de la cellule hôte.

La CypA est également une cible thérapeutique intéressante pour lutter contre le VHC, des dérivés non immunosuppresseurs de la CsA, tels que l'Alisporivir sont actuellement en phase II de développement clinique pour une thérapie sans interféron. L'étude de la liaison de l'Alisporivir à la CypA par cristallographie aux rayons X constitue un objectif permettant d'apporter une explication moléculaire au caractère non immunosuppresseur de l'Alisporivir.

Les modes d'actions des propriétés anti-VHC de ces inhibiteurs de CypA restent à élucider. Par pression de sélection à la CsA (ou Alisporivir) des mutations de résistance apparaissent dans les domaines 2 et 3 de NS5A et dans NS5B ce qui suggère une interaction fonctionnelle entre ces protéines virales et la CypA humaine. Les mutations de résistances ayant un effet prépondérant sont celles qui apparaissent dans le domaine 2 de NS5A. *In vitro*, il a été montré par RMN au laboratoire que NS5A-D2 interagit directement avec la CypA et que ce domaine est un substrat pour son activité PPIase. L'étude de l'interaction moléculaire de la CypA avec NS5A-D2 a permis de mettre en évidence une séquence (³⁰⁴GFPRALPAWARPDYNPPLVE³²³) au sein de ce domaine qui a une importance particulière pour l'interaction. Elle correspond à la région la plus conservée du domaine avec notamment 3 proline (en gras), parmi les 15 du domaine, strictement

conservées parmi tous les génotypes du VHC. C'est également au sein de ce site que se situent des mutations de résistances, D316E, D316E/Y317N, à la CsA ou à ses dérivés. Ces mutations de résistances permettent au VHC de se répliquer avec une dépendance réduite à la CypA et confèrent également au virus un niveau de résistance bien plus élevé à la CsA et à l'Alisporivir.

Les objectifs de ma thèse sont de mieux comprendre le rôle du domaine 2 de NS5A et de la CypA dans le cadre de la réplication du génome du VHC. NS5A-D2 est un acteur essentiel au sein du complexe de réplication bien que sa fonction reste mal définie. La séquence particulière d'interaction de NS5A-D2 avec la CypA (³⁰⁴GFPRALPAWARPDYNPPLVE³²³) où des mutations de résistances à des inhibiteurs de CypA ont été identifiées semble jouer un rôle clé dans le processus de réplication du génome du VHC. La RMN sera utilisée comme outil pour réaliser une analyse structurale et fonctionnelle de cette séquence particulière au sein de NS5A-D2. Les objectifs sont également de mieux comprendre les mécanismes moléculaires correspondant aux mutations de résistances à la CsA et à ses analogues non immunosuppresseur. Nous étudierons par RMN les conséquences structurales et fonctionnelles des mutations de résistances D316E et DEYN. Ceci permettra d'étudier le rôle de NS5A-D2 et de la CypA car ces mutations de résistances font le lien entre ces deux protéines.

Au cours de ma thèse nous avons travaillé sur deux souches différentes du VHC, la souche Con1, et la souche JFH1. La souche Con1 appartient au sous génotype 1b, c'est le sous-génotype du virus le plus répandu dans les cas d'infection en Europe et en Amérique du Nord. La souche JFH1, du sous-génotype 2a, est la seule capable de se répliquer efficacement en culture cellulaire. La première partie de ce travail sera consacrée à l'étude du domaine 2 de NS5A de la souche Con1 du VHC, une caractérisation structurale et fonctionnelle de NS5A-D2 à l'aide d'un modèle peptidique sera réalisée. Dans une deuxième partie, nous étudierons les conséquences structurales et fonctionnelles des mutations de résistances aux inhibiteurs de la CypA dans le domaine 2 de NS5A de la souche JFH1 du VHC. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec les laboratoires du Dr. François Penin (IBCP, UMR5086-Université de Lyon) et du Pr. Ralf Bartenschlager (Dept of Molecular Virology, University of Heidelberg).

Dans une troisième partie nous étudierons l'interaction entre NS5A-D2 et NS5B par RMN du fluor. Cette interaction semble cruciale sur le fonctionnement de NS5B et pourrait réguler la dynamique d'ouverture/fermeture de NS5B. Nous présenterons 2 stratégies différentes utilisées pour réaliser un marquage de NS5A-D2 au fluor permettant de réaliser des expériences de titrations entre ces deux protéines.

La quatrième partie de ce travail concerne l'étude du complexe CypA-Alisporivir par cristallographie aux rayons X. La structure tridimensionnelle du complexe CypA-Alisporivir permettra d'expliquer le caractère non immunosuppresseur de cette molécule.

Enfin, une cinquième partie sera consacrée à l'étude de la régulation du métabolisme de la cellule hôte par NS5A. Un nouveau partenaire cellulaire de NS5A a récemment été identifié : l'hexokinase 2 humaine. Il est maintenant bien établi que le métabolisme glucidique et lipidique de la cellule hôte est impliqué dans la réplication du VHC. Il a été montré que l'enzyme intervenant dans la première étape limitante de la glycolyse, l'hexokinase 2 humaine, interagit avec NS5A. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Pr. Patrice André et du Dr. Olivier Diaz (Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon) nous étudierons également les relations structurales et fonctionnelles entre NS5A et l'hexokinase 2 humaine.

Résultats

1 Caractérisation moléculaire d'un petit motif structural au sein du domaine 2 désordonné de NS5A

1.1 Résumé

Cette introduction résume les travaux qui font l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Biological Chemistry* intitulé: « A Proline-Tryptophan Turn in the Intrinsically Disordered Domain 2 of NS5A Protein is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication » (section 1.2).

Ces travaux ont été réalisés sur NS5A-D2 de la souche Con1 du VHC (245-341). Il a été montré que NS5A-D2 est globalement désordonné avec toutefois la présence de régions qui ont tendance à se structurer en hélices α . Notre étude avec notamment, l'analyse des déplacements chimiques secondaires par la méthode ncIDP a permis de mettre en évidence la présence d'un petit motif structural au sein de NS5A-D2 (Con1) centré au niveau des résidus W316 et A317.

Le motif structural au sein de NS5A-D2 a été caractérisé à l'aide d'un modèle peptidique afin de réduire la complexité des spectres. Le peptide de NS5A-D2 (Con1) (pepD2(Con1)) utilisé est un peptide de 20 résidus correspondant au site d'interaction avec la CypA : ³⁰⁸KFPRAMP~~I~~WARPDYNPP~~L~~LE³²⁷. Ce site d'interaction de 20 résidus correspond à la séquence la plus conservée du domaine parmi tous les génotypes du VHC (Figure 54A).

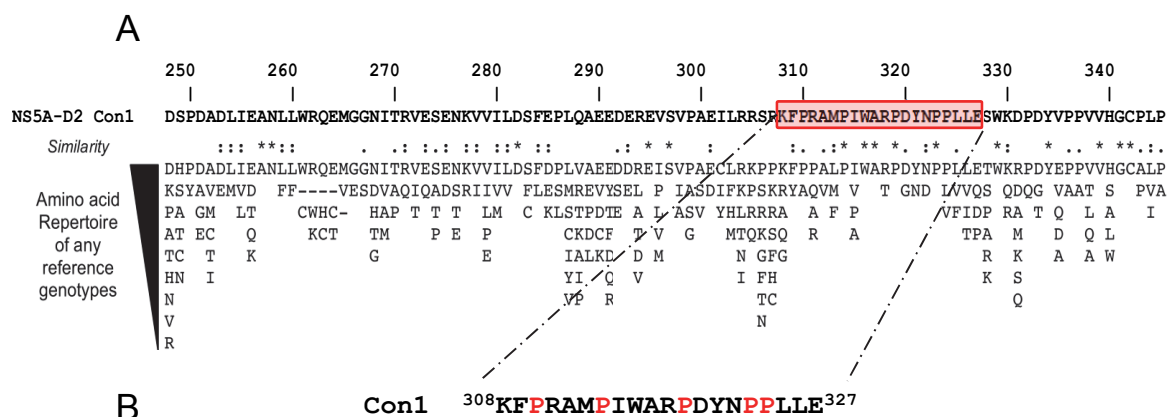


Figure 54. Séquence en acides aminés de NS5A-D2 (248-345) de la souche Con1 (génotype 1b). A, La région surlignée en rouge correspond au site d'interaction avec la CypA. En dessous la séquence est comparée avec tous les autres génotypes et sous-types du VHC avec le logiciel ClustalW (Thompson et al., 1994). Les tirets correspondent à des délétions d'acides aminés. De haut en bas on retrouve la fréquence dans l'ordre décroissant des acides aminés. La convention de ClustalW indique les résidus

strictement conservés (*); les résidus fortement conservés (;); et les résidus similaires (.). Le site d'interaction avec la CypA correspond à la séquence la plus conservée parmi tous les géotypes du VHC. B, Séquence du peptide de D2 Con1 (pepD2 Con1) utilisé pour réaliser l'analyse structurale et fonctionnelle de la microstructure. Ce peptide de 20 résidus contient 5 prolines indiquées en rouge

Afin d'obtenir des données RMN expérimentales pour caractériser la conformation locale particulière de NS5A-D2 nous avons produit par voie recombinante chez *Escherichia Coli* ce peptide de 20 résidus marqué en ^{15}N et en ^{13}C . Les résultats de cette partie sont détaillés dans la section (1.3). Ceci a permis de compléter les données expérimentales obtenues précédemment avec ce peptide non marqué produit par synthèse chimique par la société Gencust. Voici les différentes expériences RMN utilisées sur ce peptide de 20 résidus marqués ^{15}N ^{13}C et non marqué:

- Des spectres ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HMQC, HNCACB, HNCOCACB, HNCO, HNN ont été utilisés afin d'obtenir les déplacements chimiques ^1H , ^{15}N et ^{13}C .
- Des spectres TOCSY et NOESY nous ont permis d'obtenir tous les déplacements chimiques protons et des contacts NOE permettant d'obtenir des contraintes de distances.

Toutes les données expérimentales obtenues par RMN sur ce peptide ont été utilisées dans un protocole de modélisation sous contraintes expérimentales, réalisé en collaboration avec le laboratoire du Dr. François Penin (IBCP, Lyon). Le modèle structural obtenu par RMN est centré sur la séquence $^{314}\text{PIWA}^{317}$, il forme un *turn* hydrophobe où la chaîne latérale du tryptophane W316 interagit avec le cycle de la proline P314. Un petit motif structural, *PW-turn*, a donc été mis en évidence au sein d'un domaine désordonné : NS5A-D2.

Ce motif structural a permis de mieux comprendre la conservation de séquence des résidus impliqués dans le motif. En effet la P314, le W316 et l'A317 sont strictement conservés parmi tous les géotypes du VHC et sont directement impliqués dans la formation de la microstructure (Figure 54A). A l'inverse l'isoleucine I315 n'est pas un résidu conservé, il existe une certaine variabilité parmi tous les géotypes du VHC à cette position, qui peut s'expliquer par la structure du motif puisque la chaîne latérale de l'isoleucine n'est pas directement impliquée dans la stabilisation de la microstructure, elle est dirigée vers l'extérieur du motif. Parmi tous les géotypes du VHC il n'y a jamais de glycine à cette position 315. De plus, des recherches dans la PDB ont montré que la présence d'une glycine à cette position n'était pas favorable à la présence de la microstructure. Nous avons donc muté ce résidu d'isoleucine 315 en glycine en espérant que cette mutation I315G casse le motif structural. Les analyses RMN réalisées sur le domaine mutant NS5A-D2 I315G ainsi que sur le peptide de 20 résidus (K308-E327) muté en I315G montrent bien que cette mutation ponctuelle casse la microstructure.

Cette mutation I315G a permis de montrer que le motif structural a une importance fonctionnelle puisque dans le test cellulaire de réplication sous-génomique de l'ARN viral, réalisé en collaboration avec le Pr. Bartenschlager (Department of Molecular Virology, Heidelberg, Germany), la mutation I315G abolit la réplication de l'ARN viral à un niveau comparable à celui du témoin négatif où l'ARN polymérase virale est non fonctionnelle. Cette microstructure est donc strictement requise pour la réplication de l'ARN viral.

Afin de comprendre par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) le motif structural intervient dans la réplication de l'ARN viral, nous avons cherché à savoir s'il a une importance pour l'interaction avec la CypA puisque ce motif est localisé au centre de la zone d'interaction avec la CypA. Nous avons effectué des expériences de titration sur la CypA ^{15}N par ajouts croissants de peptides pepD2(Con1) WT ou I315G non marqués. La comparaison des constantes de dissociation (K_D) montre que l'affinité entre le peptide et la CypA est plus faible en présence de la mutation I315G, le motif est donc impliqué dans l'interaction avec la CypA.

Toujours dans le but d'évaluer l'importance fonctionnelle du motif structural au sein de NS5A-D2, nous avons analysé l'activité PPIase de la CypA directement sur les résidus de prolines localisés dans la région (308-327) de NS5A-D2. Des expériences d'échanges Ca_zN_z permettant d'étudier l'activité PPIase de la CypA directement sur les résidus de prolines ont été enregistrées de manière comparative sur les peptides, doublement marqués ^{15}N ^{13}C , pepD2-WT et pepD2-I315G. Cette analyse a permis de montrer que l'isomérisation *cis/trans* de la proline P314 catalysée par la CypA est plus rapide lorsque le motif structural est absent (mutant I315G). Ceci suggère que ce serait plutôt la liaison du motif structural à la CypA qui serait important pour la réplication du génome viral plutôt que l'isomérisation *cis/trans* de la proline P314.

1.2 Article

A Proline-Tryptophan Turn in the Intrinsically Disordered Domain 2 of NS5A Protein Is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication*

Received for publication, February 10, 2015, and in revised form, June 16, 2015. Published, JBC Papers in Press, June 17, 2015, DOI 10.1074/jbc.M115.644419

Marie Dujardin^{‡§}, Vanesa Madan^{¶1}, Roland Montserret^{¶**1}, Puneet Ahuja^{‡§2}, Isabelle Huvent^{‡§}, Helene Launay^{‡§3}, Arnaud Leroy^{‡‡}, Ralf Bartenschlager[¶], François Penin^{¶**}, Guy Lippens^{‡§}, and Xavier Hanouille^{‡§4}

From the [‡]CNRS, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576, [§]Université Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France, [¶]CNRS, Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, IBCP, LabEx Ecofect, UMR 5086 and ^{**}Université Lyon 1, F-69367, Lyon, France, the [¶]Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, University of Heidelberg, D-69120, Heidelberg, Germany, and the ^{‡‡}EA4529 and InstruL2, UFR de Pharmacie, Université Paris-Sud, F-92296 Châtenay-Malabry, France

Background: The intrinsically disordered domain 2 of NS5A is required for HCV replication.

Results: We characterized a short structural motif in the domain 2 of NS5A.

Conclusion: This structural motif in NS5A-D2 is essential for RNA replication.

Significance: This work provides a molecular basis for further understanding of the function of the intrinsically disordered domain 2 of HCV NS5A protein.

Hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 5A (NS5A) and its interaction with the human chaperone cyclophilin A are both targets for highly potent and promising antiviral drugs that are in the late stages of clinical development. Despite its high interest in regards to the development of drugs to counteract the worldwide HCV burden, NS5A is still an enigmatic multifunctional protein poorly characterized at the molecular level. NS5A is required for HCV RNA replication and is involved in viral particle formation and regulation of host pathways. Thus far, no enzymatic activity or precise molecular function has been ascribed to NS5A that is composed of a highly structured domain 1 (D1), as well as two intrinsically disordered domains 2 (D2) and 3 (D3), representing half of the protein. Here, we identify a short structural motif in the disordered NS5A-D2 and report its NMR structure. We show that this structural motif, a minimal Pro³¹⁴-Trp³¹⁶ turn, is essential for HCV RNA replica-

tion, and its disruption alters the subcellular distribution of NS5A. We demonstrate that this Pro-Trp turn is required for proper interaction with the host cyclophilin A and influences its peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity on residue Pro³¹⁴ of NS5A-D2. This work provides a molecular basis for further understanding of the function of the intrinsically disordered domain 2 of HCV NS5A protein. In addition, our work highlights how very small structural motifs present in intrinsically disordered proteins can exert a specific function.

Hepatitis C virus (HCV)⁵ is a small single-stranded RNA virus that chronically infects 130–170 million people worldwide. It thereby constitutes a serious global health challenge, because infection can lead to severe liver diseases such as chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (1). The HCV genome encodes for 10 mature proteins: the structural proteins Core, E1, and E2; the viroporin p7; and the nonstructural (NS) proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B. NS proteins are involved in polyprotein processing and viral genome replication (2). Because of increased molecular knowledge about the HCV life cycle, the treatment of HCV infection has been largely improved in recent years, with the approval of efficient direct acting antivirals targeting the viral protease NS3/4A, the RNA polymerase NS5B, and the NS5A protein (3–5). Future HCV regimens will most probably include a combination of direct acting antivirals and/or host-targeted antivirals to treat all HCV genotypes and to increase the genetic barrier to resistance mutations (6). In this respect, NS5A is of particular interest because it is the target of efficient direct acting antivirals (*e.g.* daclatasvir) (7) and its interaction

* The work was supported by French National Agency for Research Grant ANR-11-JSV8-005 and French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis Grant A02007-2 and A02011-2. The NMR facility was supported by the European Community, the CNRS (TGIR RMN THC, FR-3050), the Universities of Lille1 and Lille2, the Région Nord-Pas-de-Calais (France), and the Institut Pasteur de Lille. This work was also supported by Mapping 128 Project ANR-11-BINF-003 (to F. P. and R. M.) and Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants TRR83 and TP13 (to R. B.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

The atomic coordinates and structure factors (code 2M5L) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>).

NMR assignment of the backbone atoms (¹H^N, ¹⁵N^H, C α , C β , C') of the domain 2 of NS5A (Con1 strain) and NMR assignment of the peptide PepD2-WT (residues 308–327 of the domain 2 of NS5A, Con1 strain) have been deposited in the Biological Magnetic Resonance Data Bank under accession codes 19055 and 19059, respectively.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: AstraZeneca R&D Mölndal, Pepparedsleden 1, Mölndal, SE-431 83, Sweden.

³ Supported by Postdoctoral Fellowship ANR-11-JSV8-005 from the French National Agency for Research.

⁴ To whom correspondence should be addressed: CNRS, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576, Université Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: 33-3-20-43-65-66; Fax: 33-3-20-43-65-55; E-mail: xavier.hanouille@univ-lille1.fr.

⁵ The abbreviations used are: HCV, hepatitis C virus; Cyp, cyclophilin; HSQC, heteronuclear single quantum correlation; HMQC, heteronuclear multiple-quantum correlation; IDP, intrinsically disordered protein; IDR, intrinsically disordered region; MoRF, molecular recognition feature; PPIase, peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase; PW turn, proline-tryptophane turn; TOCSY, total correlation spectroscopy; PDB, Protein Data Bank.

with the human cyclophilin A (CypA), an essential peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) (8, 9), is also targeted by the most advanced host-targeted antiviral (alispovir) (10, 11).

NS5A is a multifunctional but still enigmatic protein. Despite a lack of known enzymatic activity, the protein is essential for HCV genome replication (12), is involved in the production of new virions (13), and has been shown to modulate numerous viral and host processes (14). NS5A is a multidomain phosphoprotein (15) anchored via an N-terminal helix in the endoplasmic reticulum (16). The cytoplasmic part of NS5A is composed of a well structured domain 1 (D1) and two intrinsically disordered domains (D2 and D3) that exist as highly dynamic interconverting conformers. NS5A-D1, which is the target of daclatasvir (7, 17), contains a zinc finger motif and possesses RNA binding properties (18). Crystallographic studies revealed that this domain could adopt at least three different homodimeric conformations (19–21), underscoring the multifunctionality of the protein. By using several biophysical techniques such as NMR spectroscopy, circular dichroism, and gel filtration chromatography, NS5A-D2, which is essential for viral RNA replication (12), and NS5A-D3, which is involved in production and assembly of new virions (13, 22), were shown to be mainly disordered (23–25). In this respect, NS5A is the HCV protein with the highest percentage of its primary sequence predicted to be disordered (26). *In vitro*, both NS5A-D2 and -D3 have been shown to directly interact with the host CypA and to be substrates of its PPIase enzymatic activity (27, 28).

Intrinsically disordered proteins or regions (IDPs/IDRs) have been involved in numerous human diseases such as cancer, neurodegenerative diseases and diabetes (29). The functions attributed to IDPs/IDRs are most often related to interactions with proteins or nucleic acids in regulatory and signaling networks (30, 31). IDRs are abundant in RNA viruses (26, 32, 33), allowing them to minimize their genome while keeping multiple biological functions. IDRs indeed can establish numerous interactions (thereby acting as hub proteins), can cope with high mutation rates (caused by error-prone RNA-polymerases), can evade host immune system, and can adapt to different environments (inside and outside the cell). Whereas it is now well recognized that IDPs/IDRs are functional despite the lack of three-dimensional fold, the identification of the features that carry the function(s) remains challenging (34). Whether short linear motifs (35) or small residual structures (*e.g.* MoRFs, molecular recognition features (36); PreMos, pre-structured motifs (37)) that fold upon binding would carry the functions in IDRs is still under debate (34). To date, these features cannot be identified or even predicted in all of these proteins/domains. Current knowledge of IDPs/IDRs features is still limited and must be improved to decipher their multiple functionalities.

Here we report the identification as well as the molecular and functional description of a short stable structural motif in the intrinsically disordered NS5A-D2 and show its essential role in HCV RNA replication. This motif, a Pro³¹⁴–Trp³¹⁶ turn denoted PW turn, pre-exists in the isolated protein domain prior to binding to any potential target. Using NMR spectroscopy, we determined the structure of this PW turn, which explains the sequence conservation in this region, as well as the absolute requirement for these peculiar residues in the RNA

replication process. We show that this NS5A-D2 PW turn is directly involved in the binding of host CypA (27) and that it influences the CypA PPIase activity regarding residue Pro³¹⁴.

Experimental Procedures

Production and Purification of HCV NS5A-D2—The domain 2 of the HCV NS5A WT protein from Con1 strain (euHCVdb; GenBankTM accession number AJ238799, genotype 1b) was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells using a pT7.7 expression vector containing the synthetic coding sequence. The resulting recombinant domain 2 of HCV NS5A (NS5A-D2 WT; residues 245–341) has extra M- and -LQHHHHHH extensions at the N and C termini, respectively. The NS5A-D2 I315G mutation was introduced in the WT plasmid by site-directed mutagenesis using the following forward and reverse primers: 5'-CGT GCA ATG CCG GGC TGG GCC CGT CCG GAT TAC AAC C-3' and 5'-GGT TGT AAT CCG GAC GGG CCC AGC CCG GCA TTG CAC G-3'. To produce ¹⁵N- or ¹⁵N,¹³C-labeled NS5A-D2 (WT or I315G) the cells were grown at 37 °C in a M9-based semi-rich medium (M9 medium supplemented with [¹⁵N]-NH₄Cl (1 g/liter), D-[¹³C₆]-glucose (2 g/liter) (for ¹³C labeling only), Isogro [¹⁵N], or [¹³C,¹⁵N] powder growth medium (1 g/liter, 10%; Sigma-Aldrich). At an A_{600 nm} of 0.8, the protein production was induced with 0.4 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside, and cells were harvested by centrifugation at 4 h postinduction. Following cell lysis and subsequent removal of cell debris by centrifugation, the resulting supernatant was heated at 75 °C for 15 min and then cooled down on ice. Precipitated material was removed by centrifugation. The clarified supernatant, which contains soluble NS5A-D2, was submitted to Ni²⁺ affinity chromatography (HisTrap column, 1 ml; GE Healthcare Europe). Following SDS-PAGE analysis, selected fractions containing NS5A-D2 were pooled and dialyzed against 30 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6.8, 50 mM NaCl, 1 mM THP (Tris(hydroxypropyl)phosphine), 2 mM EDTA. The protein was concentrated up to 200–400 μM using a Vivaspin 15 concentrator (cutoff, 5 kDa) (Satorius Stedim Biotech, Aubagne, France), filtered at 0.2 μ, flash frozen in liquid nitrogen, and then stored at –80 °C. Protein concentration was estimated based on UV absorbance at A_{280 nm}.

Production and Purification of CypA—The production and purification of both unlabeled and ¹⁵N-labeled CypA were performed as previously described in Hanouille *et al.* (27).

Unlabeled and Doubly ¹⁵N,¹³C-labeled Peptides—Unlabeled synthetic peptides, PepD2-WT (KFPRAMPPIWARPDPYNPPLLE) and PepD2-I315G (KFPRAMPGWARPDPYNPPLLE), corresponding to residues 308–327 of NS5A-D2 Con1 were obtained from GenCust (Luxembourg). The purity was checked by reverse phase HPLC and mass spectrometry as >95%. ¹⁵N,¹³C-labeled PepD2-WT and PepD2-I315G peptides were produced in *E. coli* BL21(DE3) using a modified pET32a expression vector (Novagen). Briefly, the peptides were each produced at the C terminus of a fusion protein harboring a N-terminal histidine tag, the thioredoxin protein, and a linker containing both a thrombin (LVPRGS) and a chemical (DP) cleavage sites. Recombinant bacteria were grown in [¹⁵N,¹³C]-M9-based semi-rich medium (see above), and protein production was induced by isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside.

Resonance Data Bank under accession code 19059, and the coordinates of the NMR structure have been deposited in the Protein Data Bank under accession code 2M5L.

Circular Dichroism Spectroscopy—Circular dichroic spectra were recorded at 293 K with a model CD6 spectropolarimeter (Jobin Yvon-SPEX-Horiba). In the far ultraviolet region (200–250 nm) measurements were made in a 10- μm -path length quartz cell. In the near ultraviolet region (250–320 nm) measurements were made in a 1-mm-path length quartz cell. Spectra were acquired with a step of 0.5 nm. To compare the signal of both samples, the concentration of the samples (1.6 mM) were determined and adjusted precisely by two methods: their absorbance at 280 nm and the integration of their $^1\text{H-NMR}$ signal relatively to a standard. Baseline runs were made prior to each sample run, and the baseline was subtracted to obtain the final spectrum. Near and far UV intensities were expressed in terms of specific ellipticity (per decimole of amino acid residue), $[\theta]_{\text{MRW}} = [\theta]/N$, where N is the total number of amino acids.

Fluorescence Spectroscopy—Steady state fluorescence of the Trp residue was measured at 293 K on a PTI fluorescence spectrometer (PTI Monmouth Junction, NJ). To excite specifically the Trp residue, the excitation was set at 295 nm, and the emission scanned from 305 to 500 nm (0.5-nm stepwise). The excitation and emission slit widths were set to 2 and 4 nm, respectively. Excitation and emission polarizers were used to measure the steady state fluorescence anisotropy (excitation and emission set at 295 and 350 nm, respectively) on 125 μM peptide samples in 1-cm-path length cells. We determined for these wavelengths a G factor of 1.19.

Plasmid Constructs—All nucleotide and amino acid numbers refer to the HCV Con1 strain. Plasmids encoding the subgenomic luciferase reporter replicon (pFK_i389LucNS3-3'_Con1_ET_ δ g) and the nonreplicative mutant (pFK_i389LucNS3-3'_NS5B_GND_Con1_ET_ δ g) have been described previously (45). Single amino acid substitutions in NS5A-D2 were generated by PCR-based site-directed mutagenesis and, after restriction with BclI and XhoI, the fragment was inserted into the pFK_i389LucNS3-3'_Con1_ET_ δ vector. All constructs were verified by nucleotide sequence analysis.

In Vitro Transcription, Electroporation of HCV Replicons, and Replication Assay—The protocol used for generation and electroporation of HCV RNAs has been described elsewhere (46). For transient replication assays, 400 μl of single cell suspensions of (10^7 cells/ml) Huh-7 cells were mixed with 5 μg *in vitro* transcribed subgenomic replicon RNA and transfected by electroporation. After transfection, cells were resuspended in 41 ml of complete DMEM, and 1.5 ml of cell suspension was seeded in duplicate in 12-well plates. To measure luciferase activity, the cells were washed with PBS and lysed 4, 24, 48, 72, and 96 h after electroporation by addition of 350 μl of lysis buffer (0.1% Triton X-100, 25 mM glycylglycine, pH 7.8, 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA, and 1 mM DTT). Cells were immediately frozen at -70°C , and after thawing, 100 μl of lysate was mixed with 360 μl of assay buffer (25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM adenosine triphosphate, and 15 mM K_2PO_4 , pH 7.8). Luciferase activity was measured for 20 s in

a luminometer (Lumat LB9507; Berthold, Freiburg, Germany) after addition of 200 μl of luciferin solution (200 mM luciferin, 25 mM glycylglycine, pH 8.0). Replication efficiency was determined by normalizing the relative light units of the different time points to the respective value obtained at 4 h.

Immunofluorescence Analysis—All nucleotide and amino acid residue numbers refer to the Con1 genome (GenBankTM accession number AJ238799). The pTM NS3-5B ET Con1 vector allowing the expression of the HCV nonstructural proteins NS3 to 5B containing the replication-enhancing mutations ET (E1202G, T1280I in NS3 and K1846T in NS4B) was used to insert the I315G and P314A mutations into the NS5A domain 2 coding region. To generate pTM NS3-5B ET/I315G or ET/P314A, the XhoI/SpeI fragments from constructs pFKI389Luc/NS3-3'/Con1/ET/dg/I315G or P314A were inserted into the XhoI/SpeI-digested pTM NS3-5B ET Con1 plasmid. Nucleotide sequences of all constructs were verified by sequence analysis (GATC, Konstanz, Germany). Details about cloning strategies are available upon request.

Huh7-Lunet/T7 cells (1×10^5) were seeded onto glass coverslips in 24-well plates 1 day before prior to transfection. Cells were transfected with pTM-NS3-5B-based expression vectors by using the TransIT LT1 transfection reagent (Mirus Bio LLC, Madison, WI) according to the providers' instructions. Immunofluorescence staining for detection of NS5A was performed as described elsewhere (47). Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, washed three times with PBS, and permeabilized with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ digitonin for 5–10 min. Cells were incubated in blocking solution (3% BSA in PBS) for 30 min and subsequently in 1% BSA/PBS containing primary antibodies for 1 h at room temperature. NS5A was detected by using a NS5A-specific monoclonal antibody (9E10, generous gift from Charles M. Rice) at a final concentration of 1:10,000. The nuclei were stained with DAPI for 1 min. The cells were washed and mounted with Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), and pictures were acquired with a Leica SP2 confocal laser scanning microscope using a 63 \times objective.

Results

Identification of Nondisordered Residues in NS5A-D2—The ^1H , ^{15}N HSQC spectrum of NS5A-D2 (Con1 strain) displays a narrow $^1\text{H}_\text{N}$ chemical shift dispersion limited to 1 ppm, as expected for a mainly disordered domain (Fig. 1A). All the backbone amide resonances, except for the 12 proline residues, were assigned (Biological Magnetic Resonance Data Bank accession code 19055) with the product plane method (40). Two resonances corresponding to Trp³¹⁶ and Ala³¹⁷ in the main CypA binding site (27) are unusually upfield shifted (Fig. 1B). Indeed, comparison of experimental ^1H and ^{15}N chemical shifts with their corresponding neighbor-corrected IDP values (ncIDP) (48) singles out the Trp³¹⁶ residue (Fig. 1D). Amino acid sequence analysis with a MoRFs predictor does, however, not reveal any peculiarity for these residues (data not shown). Secondary structure propensity analysis (Fig. 1C), based on experimental $^{13}\text{C}\alpha$ and $^{13}\text{C}\beta$ chemical shifts, shows the presence of two residual α -helices in NS5A-D2 (residues 250–267 and 299–305), in agreement with the results of Feuerstein *et al.*

A Structural Motif in NS5A-D2 Essential for RNA Replication

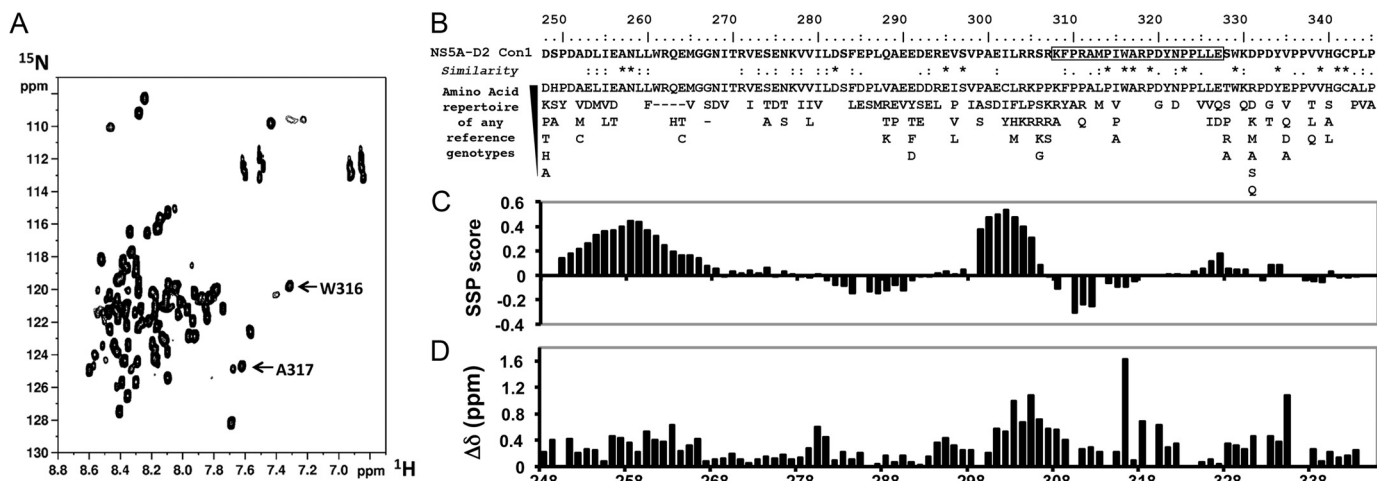


FIGURE 1. **NMR analyses of HCV NS5A-D2.** *A*, ^1H , ^{15}N HSQC spectrum of NS5A-D2. *B*, NS5A-D2 amino acid sequence (residues 248–345) from HCV Con1 strain (genotype 1b). Underneath is the amino acid repertoire deduced from ClustalW multiple alignments of reference sequences from all confirmed genotypes and subtypes. The *black box* corresponds to the PepD2-WT peptide encompassing the CypA binding site. *C*, secondary structure propensity analysis of the $^{13}\text{C}\alpha$ and $^{13}\text{C}\beta$ NMR chemical shift of NS5A-D2. Values close to 0 correspond to fully disordered residues, whereas positive and negative scores represent helical propensities and extended regions, respectively. *D*, deviations of combined ^1H , ^{15}N chemical shifts of NS5A-D2 compared with neighbor-corrected IDP chemical shift library.

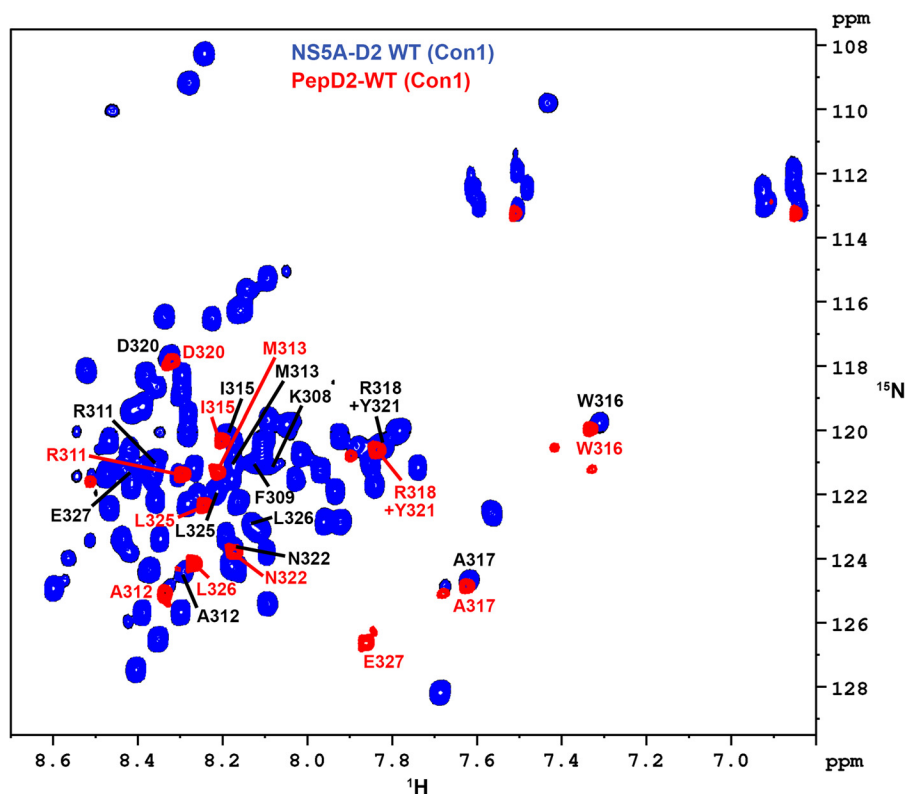


FIGURE 2. **NMR comparison of HCV NS5A-D2 and PepD2-WT.** Superimposition of ^1H , ^{15}N HSQC NMR spectra of ^{15}N -labeled NS5A-D2 (*blue*) and PepD2-WT ($^{308}\text{KFRAMPPIWARPDYNPPLLE}^{327}$, residues 308–327 of NS5A-D2) (*red*). The spectra were acquired on a 600MHz NMR spectrometer. Assignments of NS5A-D2 and PepD2-WT resonances are indicated as *black* and *red* labels, respectively (according to the full-length NS5A protein numbering). Assignments of NS5A-D2 and PepD2-WT have been deposited in the Biological Magnetic Resonance Data Bank with the accession codes 19055 and 19059, respectively. Beyond the two N- and C-terminal residues, PepD2-WT resonances match with the corresponding resonances in NS5A-D2.

(49), but does not highlight residual structure for Trp³¹⁶ or Ala³¹⁷. Nonetheless, residues Trp³¹⁶ and Ala³¹⁷ are strictly conserved over all HCV genotypes (Fig. 1*B*), underscoring their importance.

NMR Structural Model of the Proline-Tryptophane Turn in NS5A-D2—To further characterize this particular region, centered on WTrp³¹⁶ and Ala³¹⁷, a peptide encompassing NS5A

residues 308–327 was chemically synthesized and designated PepD2-WT. The ^1H , ^{15}N HSQC spectrum of this peptide overlaps with that of the full-length NS5A-D2, demonstrating that it behaves similarly as the corresponding region in the full-length NS5A-D2 (Fig. 2). Homo- and heteronuclear NMR experiments recorded on both unlabeled and doubly ^{15}N , ^{13}C -labeled pepD2-WT allowed us to measure several parameters such as

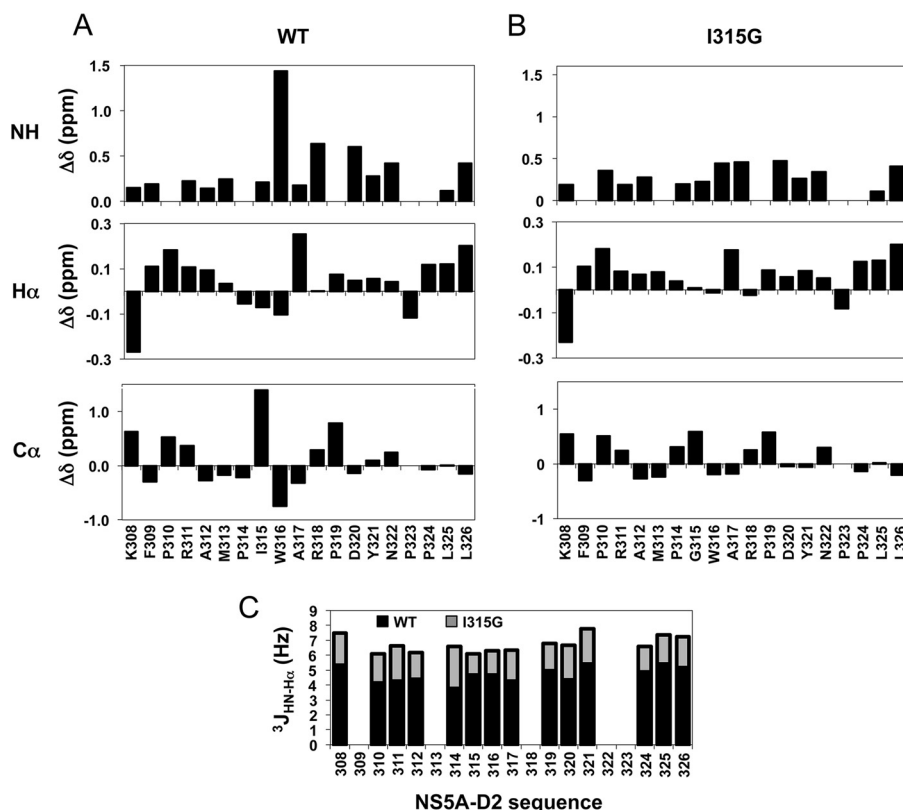


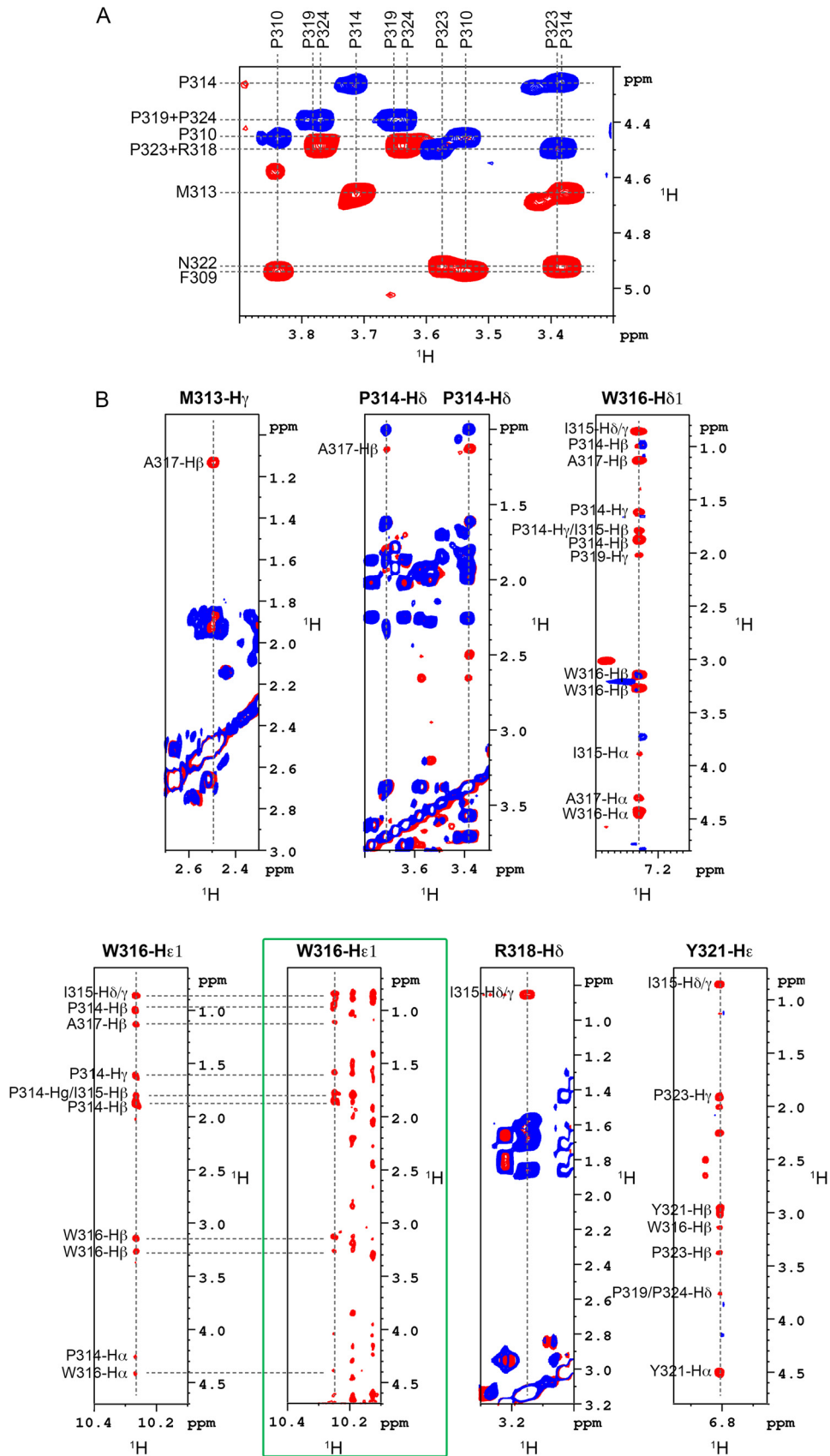
FIGURE 3. NMR chemical shifts and coupling constant analyses of PepD2-WT and PepD2-I315G. A and B, the deviations between experimental and calculated random coil chemical shift values were plotted for PepD2-WT (A) and PepD2-I315G (B). The theoretical random coil values were calculated using the neighbor-corrected intrinsically disordered protein chemical shift library (48) from the amino acids sequence of both peptides. The neighbor-corrected IDP analyses were performed for combined NH, H α , and C α chemical shifts and showed that a small region around residue Trp³¹⁶ exhibits unexpected chemical shifts for a disordered protein. C, The ³J_{HN-H α} coupling constants (Hz) of PepD2-WT (in black) and PepD2-I315G (in gray), which are related to the backbone dihedral angle ϕ are plotted along the peptide sequences.

¹H, ¹⁵N, ¹³C chemical shifts (Biological Magnetic Resonance Data Bank accession code 19059) and NOE contacts (Figs. 3 and 4) that have been used as experimental constraints for three-dimensional structure calculation. The final set of 28 low energy structures that fulfill the experimental restraints displays a well defined small structural motif (from Met³¹³ to Ala³¹⁷) in PepD2-WT (Fig. 5 and Table 1; PDB code 2M5L), whereas the N and C termini remain highly flexible. The most characteristic feature of this motif corresponds to the interaction of Trp³¹⁶ side chain with the Pro³¹⁴ residue, as shown by the following selected NOE cross-peaks: Trp³¹⁶-H δ 1/Pro³¹⁴-H β - γ and Trp³¹⁶-He1/Pro³¹⁴-H β - γ (Fig. 4B). The same NOE contacts made by Trp³¹⁶-He1 were also identified in spectra of full-length NS5A-D2, further validating the PW turn as a structural feature of NS5A-D2 (Fig. 4B). The aromatic side chain of Trp³¹⁶ adopts a near perpendicular orientation relative to the cyclic Pro³¹⁴ residue. This hydrophobic interaction between Pro³¹⁴ and Trp³¹⁶ results in a turn that is also constrained by contacts between the side chain of Ala³¹⁷ with these of Pro³¹⁴ and Met³¹³, as shown by the NOE contacts Met³¹³-H γ /Ala³¹⁷-H β and Pro³¹⁴-H δ /Ala³¹⁷-H β (Figs. 4B and 5). Residues Pro³¹⁴, Trp³¹⁶, and Ala³¹⁷ are strictly conserved among all HCV genotypes (Fig. 1B) and have been shown to be crucial for viral replication (12). In contrast, position 315 is quite variable because residues Ile, Val, Pro, and Ala are observed in different genotypes. This is consistent with the side chain of Ile³¹⁵ point-

ing outward the PW turn and being not directly involved in its stabilization. In the PDB database, we found that the sequence P[IVPA]WA (taking into account all existing residues at position 315 for the different HCV genotypes) is present in 100 entries corresponding to 89 unique proteins. In 36 of them, this sequence adopts a similar PW turn structure as identified here in NS5A-D2. For example, similar PW turn structures were found in: triosephosphate isomerase from *Staphylococcus aureus* MRSA252 (PDB code 3M9Y, sequence PIWA); triosephosphate isomerase of *Tenebrio molitor* (PDB code 219E, sequence PVWA); urocanase from *Geobacillus stearothermophilus* (PDB code 1X87, sequence PAWA); and triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei* (PDB code 1ML1, sequence PPWA). Moreover, this structural motif is involved in the function of the triosephosphate isomerases (see “Discussion”) (50). These data strongly suggest a functional role for the turn in NS5A-D2.

Mutation I315G Is Incompatible with the PW Turn—When extending our search in the PDB database to the sequence PXWA, where X is any amino acid, we noted that the structural PW turn is largely disfavored when the (*i* + 1) position relative to the proline is either an aromatic or a glycine residue. Indeed the PW turn fold was found in 0 of 14, 0 of 12, 1 of 5, and 2 of 21 entries (unique protein) for residue X being Tyr, Phe, Trp, or Gly, respectively. To investigate whether a Gly at this position would be incompatible with the turn formation, a peptide with

A Structural Motif in NS5A-D2 Essential for RNA Replication



A Structural Motif in NS5A-D2 Essential for RNA Replication

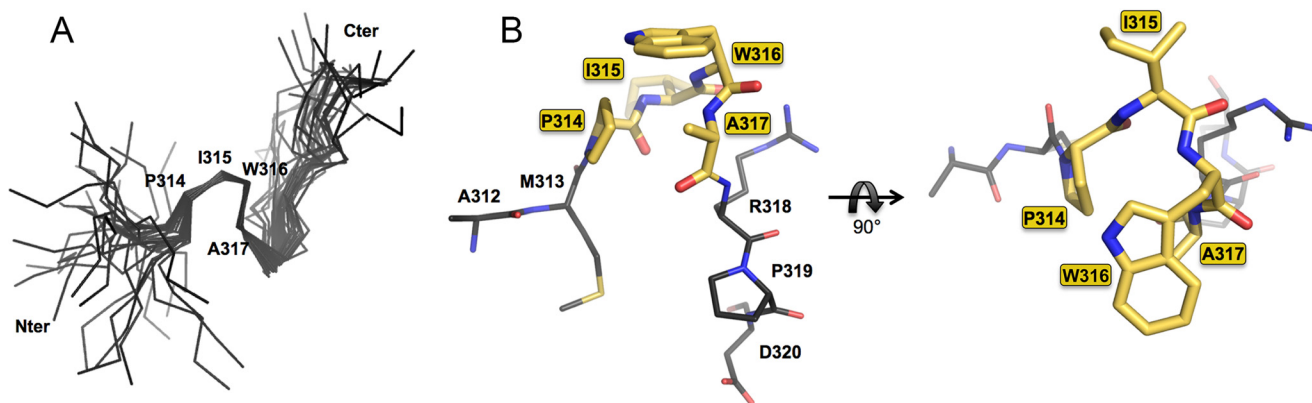


FIGURE 5. **A PW turn in the intrinsically disordered HCV NS5A-D2.** A, superimposition of C α traces of the 28 final structures of PepD2-WT (308–327) showing the well defined small structural motif from Pro³¹⁴ to Ala³¹⁷. B, structure of the PW turn motif (in yellow) identified in NS5A-D2 (in gray) in stick representation.

TABLE 1

Statistics of the NMR structure model calculations of PepD2-WT (308–327) Con1

	NS5A-D2 (308–327)
NMR experimental constraints	
Distance restraints NOE	
Intraresidue	0
Sequential	87
Medium range	28
Long range	6
Total distance restraints	121
Dihedral angle constraints	
ϕ angles	10
Ψ angles	10
Statistics for the final X-PLOR structures	
Number of structures in the final set	28
X-PLOR energy (kcal·mol ⁻¹)	-5.5 ± 9.9
NOE violations	
Number > 0.5 Å	None
Root mean square deviation (Å)	0.084 ± 0.007
Dihedral angle violations	
Number > 5°	≤1
Root mean square deviation (°)	1.95 ± 0.61
Deviation from idealized geometry	
Angles (°)	0.66 ± 0.02
Improper (°)	0.382 ± 0.014
Bonds (Å)	0.0036 ± 0.0002
Root mean square deviation (Å)	
Backbone (C', C α , N)	
Residues 314–317	0.25 ± 0.10
All residues	4.20 ± 1.10
All heavy atoms	
Residues 314–317	0.51 ± 0.25
All residues	5.49 ± 1.07
Ramachandran statistics ^a	
Residues in most favored regions (%)	51.9
Residues in allowed regions (%)	44.2
Residues in generously allowed regions (%)	1.4
Residues in disallowed regions (%)	2.5

^a Non-proline, non-glycine, and non-end residues (364 residues).

the I315G mutation was produced. Differences between the PepD2-WT and PepD2-I315G were pronounced, with significant changes for the amide proton of Trp³¹⁶ and Ala³¹⁷ and for all ring protons of Pro³¹⁴ (Fig. 6). The NMR chemical shift (¹H, ¹⁵N, and ¹³C) values for the peptide PepD2-I315G were indeed

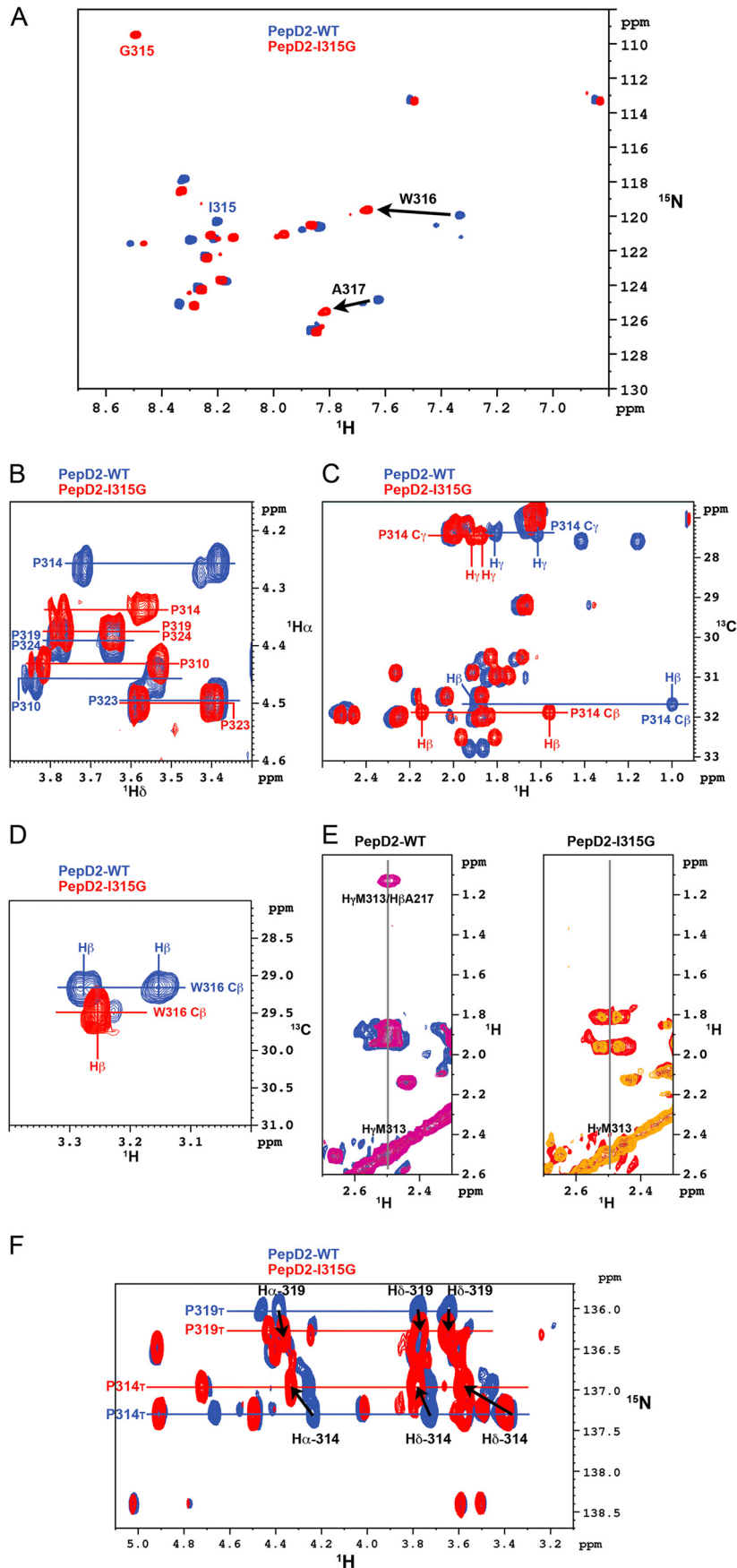
close to random coil values (Figs. 3 and 6). The characteristic NOE contact between H γ -M313 and H β -A317 is absent in the ¹H, ¹H NOESY spectrum of PepD2-I315G, confirming that the PW turn is not present despite the presence of the crucial Pro³¹⁴ and Trp³¹⁶ residues. Moreover, far and near UV circular dichroism and fluorescence spectroscopy analyses revealed a marked difference between the two peptides, notably with a different relative orientation of the aromatic residues and a reduced anisotropy (*i.e.* more compact shape) for PepD2-WT, arguing again for a loss of the PW turn structure in the I315G mutant (Fig. 7). The I315G mutation therefore provides an efficient means to evaluate the functional role of the turn while intervening minimally with the primary sequence.

The PW Turn Is Essential for HCV RNA Replication—Because NS5A-D2 has been shown to be essential for viral replication, we compared RNA replication efficiency of NS5A WT and the I315G mutant by using a subgenomic (NS3-NS5B, Con1) replicon and Huh-7 cells. As illustrated in Fig. 8, the sole mutation I315G in NS5A almost completely abolished viral replication that was close to the background as determined with the replicon encoding an inactive NS5B RNA-polymerase (GND mutant). The replication levels corresponding to the I315G and P314A mutations, respectively, were similar. Note that in the I315G mutant, residues Pro³¹⁴ and Trp³¹⁶, which have been previously identified as crucial for replication (12, 51), are unaffected. Hence, the short PW turn structural motif in the mainly disordered NS5A-D2 domain plays an essential role for HCV RNA replication.

Impact of Mutations I315G and P314A in NS5A Domain 2 on Subcellular Distribution of NS5A—To evaluate the impact of I315G and P314A mutations on the subcellular localization of NS5A, we expressed mutant NS3-5B polyproteins in Huh7/Lunet T7 cells and performed immunofluorescence assays using specific NS5A antibodies. First, expression of wild type

FIGURE 4. **Definition of the structural element identified in NS5A-D2.** A, isomeric state of proline residues in PepD2-WT. The figure corresponds to the superimposition of ¹H, ¹H TOCSY (in blue) and ¹H, ¹H NOESY (400-ms mixing time) (in red) spectra recorded on PepD2-WT (1 mM) and centered on the proline H α /H δ region. The NOE cross-peaks between the H δ of all proline residues (*i.e.* Pro³¹⁰, Pro³¹⁴, Pro³¹⁹, Pro³²³, and Pro³²⁴) and the H α of their respective *i* - 1 residue indicate that all the proline residues are mainly in *trans* conformation. B, typical NOE contacts that define the structural element identified in NS5A-D2. Each panel corresponds to the superimposition of ¹H, ¹H TOCSY (blue) and ¹H, ¹H NOESY (400-ms mixing time) (red) spectra recorded on PepD2-WT at 600 MHz. These NOE contacts have been used as experimental distance constraints to calculate the structure of PepD2-WT. The green box highlights the NOE contacts recorded on the full-length ¹⁵N-labeled NS5A-D2 domain via a ¹⁵N NOESY HSQC experiment. The NOE pattern in the full-length domain is similar to that of the PepD2-WT peptide.

A Structural Motif in NS5A-D2 Essential for RNA Replication



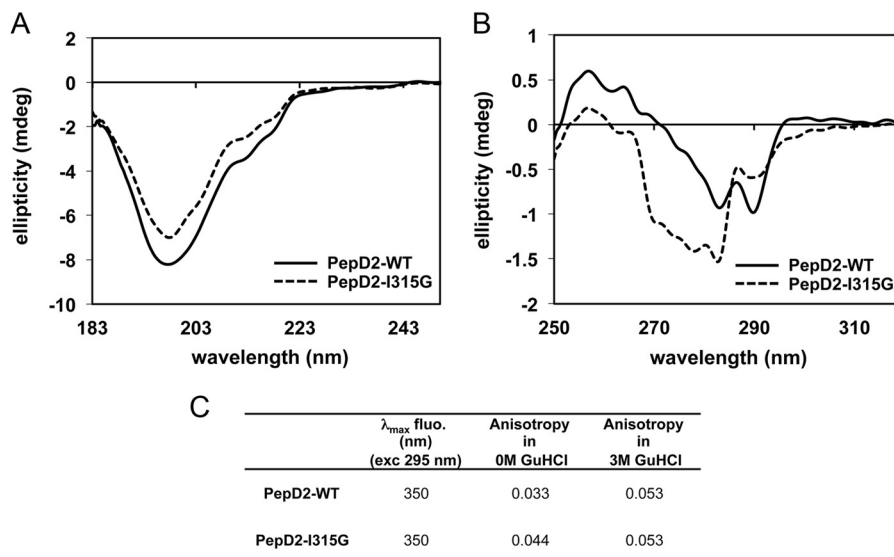


FIGURE 7. CD and fluorescence spectroscopy analyses of PepD2-WT and I315G mutant. *A* and *B* correspond to far and near UV CD analyses of PepD2-WT (plain black lines) and PepD2-I315G (dashed gray lines). *A*, the far CD spectra of both peptides are significantly different in intensity even though the concentrations were adjusted precisely (see “Experimental Procedures”). A small difference in shape is observable. *B*, the near UV CD spectra of both peptides are also very different in intensity and shape. The tryptophan (Trp³¹⁶), tyrosine (Tyr³²¹), and phenylalanine (Phe³⁰⁹) may all contribute to the CD signal in the 260–280-nm region (71). The spatial arrangement of these groups in the protein determines the sign and intensity of the CD bands in the near UV (71). Therefore, the near UV CD spectrum of a protein or a peptide reflects its conformation. From this CD analysis, we concluded that the aromatic residues Phe³⁰⁹, Trp³¹⁶, and Tyr³²¹ have different relative orientations in PepD2-WT and PepD2-I315G. This result is consistent with the presence or absence of a structural motif. *C*, tryptophan fluorescence spectroscopy. When excited at 295 nm, both peptides display a maximum of emission at 350 nm, in agreement with the expected exposition of their single Trp residue to the water solvent. The anisotropy observed for the PepD2-WT (0.033) was significantly inferior to that observed for the PepD2-I315G (0.044). Because both peptides are small (20 residues) and have the same size, the fluorescence anisotropy of their single Trp reflects their global motions in solution. The PepD2-WT peptide is thus more compact in solution than the PepD2-I315G peptide. When measured in the presence of 3 M guanidine HCl, the anisotropy of both peptides became higher and equivalent (0.053). These results are consistent with the presence of a local structuration in PepD2-WT in the absence of guanidine.

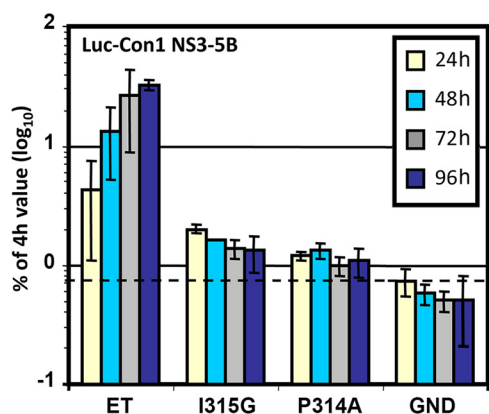


FIGURE 8. Effect of the I315G substitution on HCV RNA replication. NS3–5B subgenomic Con1 replicons containing cell culture adaptive mutations (E1202G, T1280I, and K1846T) designated *ET* (45) and additional mutations I315G or P314A in NS5A or a defective polymerase mutant (*GND*) were electroporated into Huh-7 cells. The cells were lysed at the given time points, and the luciferase activities were determined. The data were normalized to the respective 4-h value reflecting transfection efficiency. Mean values of quadruplicate measurements of two independent experiments are shown. The error bars indicate standard deviations. The horizontal dashed line indicates the background.

and NS5A mutants was analyzed by Western blot. Detection of comparable amounts of NS5A indicated no initial effect of mutations on polyprotein cleavage (Fig. 9A). NS5A localization pattern in cells expressing NS3–5B WT is characterized by a dispersed distribution of dot-like structures, similar to that described in replicon cells (47) (Fig. 9B, left column). Interestingly, expression of mutations disrupting the structural motif in NS5A domain 2 resulted in an increased number of cells exhibiting altered distribution of the viral protein (Fig. 9B, right column). This altered phenotype correlated with a strong accumulation of large structures where NS5A is present, reminiscent of the cluster distribution in cells treated with NS5A and Cyp inhibitors (46, 52, 53). Notably, the proportion of cells with the cluster phenotype varied from 24 to 67% for I315G and P314A mutants, respectively, compared with 5% for WT (Fig. 9C). Therefore, disruption of the structural motif by mutation I315G or P314A results in a higher abundance of a clustered NS5A distribution.

The PW Turn Is Required for Proper Interaction with Host CypA—Because the structural motif is located in the CypA binding site (8, 27, 51) and CypA is a mandatory host factor for HCV replication, we investigated the possibility that the structural PW turn element was involved in the binding of CypA.

FIGURE 6. NMR comparison of PepD2 WT and I315G mutant. *A*, overlay of ^1H , ^{15}N HSQC NMR spectra of ^{15}N -labeled PepD2-WT (blue) and PepD2-I315G (red) showing the consecutive perturbations for Trp³¹⁶ and Ala³¹⁷. *B*, overlay of ^1H , ^1H TOCSY spectra of PepD2-WT (blue) and PepD2-I315G (red) centered on the H δ of proline residues. *C*, overlay of ^1H , ^{13}C HMQC spectra of PepD2-WT (blue) and PepD2-I315G (red) centered on the C β and C γ of proline residues. *D*, overlay of ^1H , ^{13}C -HMQC spectra of PepD2-WT (blue) and PepD2-I315G (red) centered on the H β of Trp³¹⁶. *E*, overlay of ^1H , ^1H TOCSY (blue or red) and NOESY (violet or orange) spectra corresponding to PepD2-WT (left) and PepD2-I315G (right). *F*, I315G-induced chemical shift perturbations on proline resonances of PepD2 (residues 308–327). The figure corresponds to the superimposition of two-dimensional ^1H , ^{15}N -H α (C α)N NMR spectra of PepD2-WT (in blue) and PepD2-I315G (in red).

A Structural Motif in NS5A-D2 Essential for RNA Replication

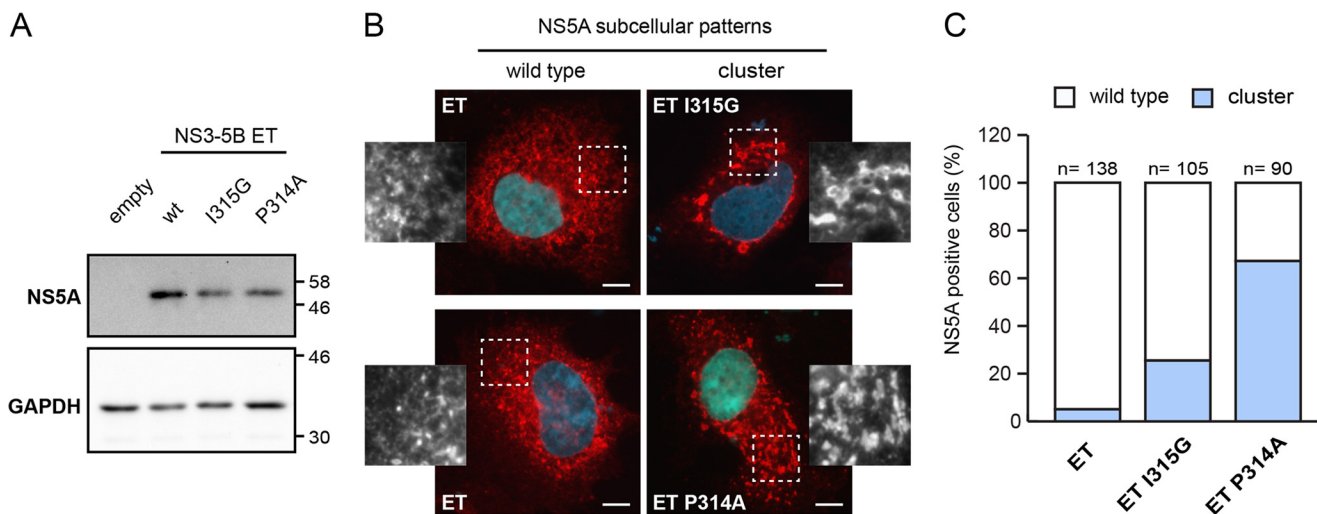


FIGURE 9. Impact of mutations within the structural motif in disordered domain 2 on subcellular localization of HCV NS5A. Huh-7 Lunet/T7 cells were transfected with empty vector (empty) or plasmids encoding the NS3 to NS5B polyprotein of HCV genotype 1b (Con1) containing mutations ET (E1202G, T1280I, and K1816T; designated *ET wt*) or mutations I315G (*ET I315G*) or P314A (*ET P314A*) in the NS5A sequence. 23 h after transfection, the cells were lysed or alternatively fixed for immunofluorescence analysis. **A**, NS5A expression was confirmed by immunoblot using antibodies directed against NS5A. GAPDH served as loading control. Apparent molecular masses (kDa) are indicated on the right. **B**, NS5A subcellular distribution (red) in cells expressing wild type (*wt*) NS5A (left column) or mutants (right column) I315G (upper right) and P314A (lower right) was analyzed by immunofluorescence; nuclei were stained with DAPI (blue). White boxed areas are shown as enlargements in the corresponding side panels. Scale bar, 10 μ m. Note the wild type dotted-like staining pattern in *ET wt* type-transfected cells compared with the formation of large NS5A "clusters" in cells expressing NS5A-D2 mutant polyproteins. **C**, quantitative analysis of NS5A staining patterns in cells expressing *ET wt* or *ET I315G* or *ET P314A* NS5A mutant polyproteins. For each construct, NS5A-positive cells (cell numbers indicated on top of the bars) were counted and classified into WT (white) and clustered (blue) phenotypes.

NMR titration experiments were recorded on ^{15}N -labeled CypA with increasing amounts of either unlabeled PepD2-WT or PepD2-I315G. The chemical shift perturbations of CypA residues near the binding site, from the free position toward the ligand-saturated frequency, allowed the determination of the dissociation constant (K_D) (Fig. 10). The affinity between CypA and the PW turn containing PepD2-WT peptide ($K_D = 0.5$ mM) is three times better than the one involving the random coil PepD2-I315G peptide ($K_D = 1.4$ mM). The structural motif hence is required for proper interaction with the host chaperone CypA. Its absence in the NS5A I315G mutant does, however, not completely abolish the interaction. Indeed, our experimental setup measures the sole contribution of the structural motif, because in each peptide there are the same five proline residues that participate in the CypA binding.

The PW Turn Modulates the CypA PPIase Activity on Pro³¹⁴—Because the binding and PPIase enzymatic activity of CypA are tightly linked (54), we assessed the *cis/trans* isomerization activity of CypA on the proline residues in the 308–327 region of NS5A-D2. Because the 20-mer peptide contains 5 prolines, assessing their conformers on the basis of the ^1H , ^{15}N HSQC peaks of neighboring residues proved too ambiguous. We therefore adapted the $^1\text{H}\alpha$ -($^{13}\text{C}\alpha$)- ^{15}N experiment to include a $^{13}\text{C}\beta$ transfer step to assess the proline conformation (*cis/trans*) or an exchange period to monitor the PPIase activity on the $^1\text{H}\alpha$ - ^{15}N correlations directly on proline resonances. In the ^{15}N , ^{13}C -labeled PepD2-WT spectra, we found several populations for the different proline residues (Fig. 11A). The major population always corresponds to the *trans* (T) conformer, as in the PW turn structural model (Figs. 4A and 5). The minor populations correspond to a *cis* (c) or an additional *trans* (t) conformer for every prolines (Fig. 12A). These latter *trans* (t) con-

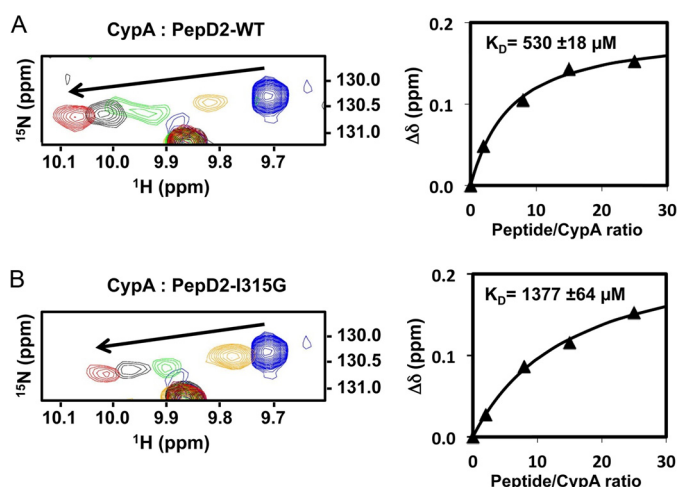


FIGURE 10. Interaction of CypA with PepD2-WT (A) and PepD2-I315G (B). Left panels correspond to the overlay of ^1H , ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N -CypA (0.1 mM) (centered on the W121sc resonance) acquired in presence of increasing amounts of unlabeled PepD2 (0, 0.2, 0.8, 1.5, and 2.5 mM). Right panels show the titration curves where the ^1H , ^{15}N combined chemical shift perturbations ($\Delta\delta$, ppm) were plotted as a function of the peptide/CypA ratios. The K_D values correspond to the average (\pm S.D.) calculated over four CypA resonances (Trp¹²¹sc, Q63, Met¹⁰⁰, and Glu¹²⁰).

formers reflect the long range effect of the *cis/trans* equilibrium of neighboring prolines on the proline chemical shift. CypA-catalyzed exchange was detected between T and c ($T \leftrightarrow c$) for Pro³¹⁰, Pro³¹⁴, Pro³¹⁹, Pro³²³, but not for Pro³²⁴ and between T and t ($T \leftrightarrow t$) for both Pro³¹⁴ and Pro³²⁴ (Fig. 12, A and B). PepD2-WT and PepD2-I315G showed marked differences for ^1H and ^{15}N chemical shift values of Pro³¹⁴ and to a lesser extent of Pro³¹⁹ (Fig. 6F). We identified a major (T) and a minor (c) population for each proline residue in this ^{15}N , ^{13}C -PepD2-I315G peptide, but the second minor (t)

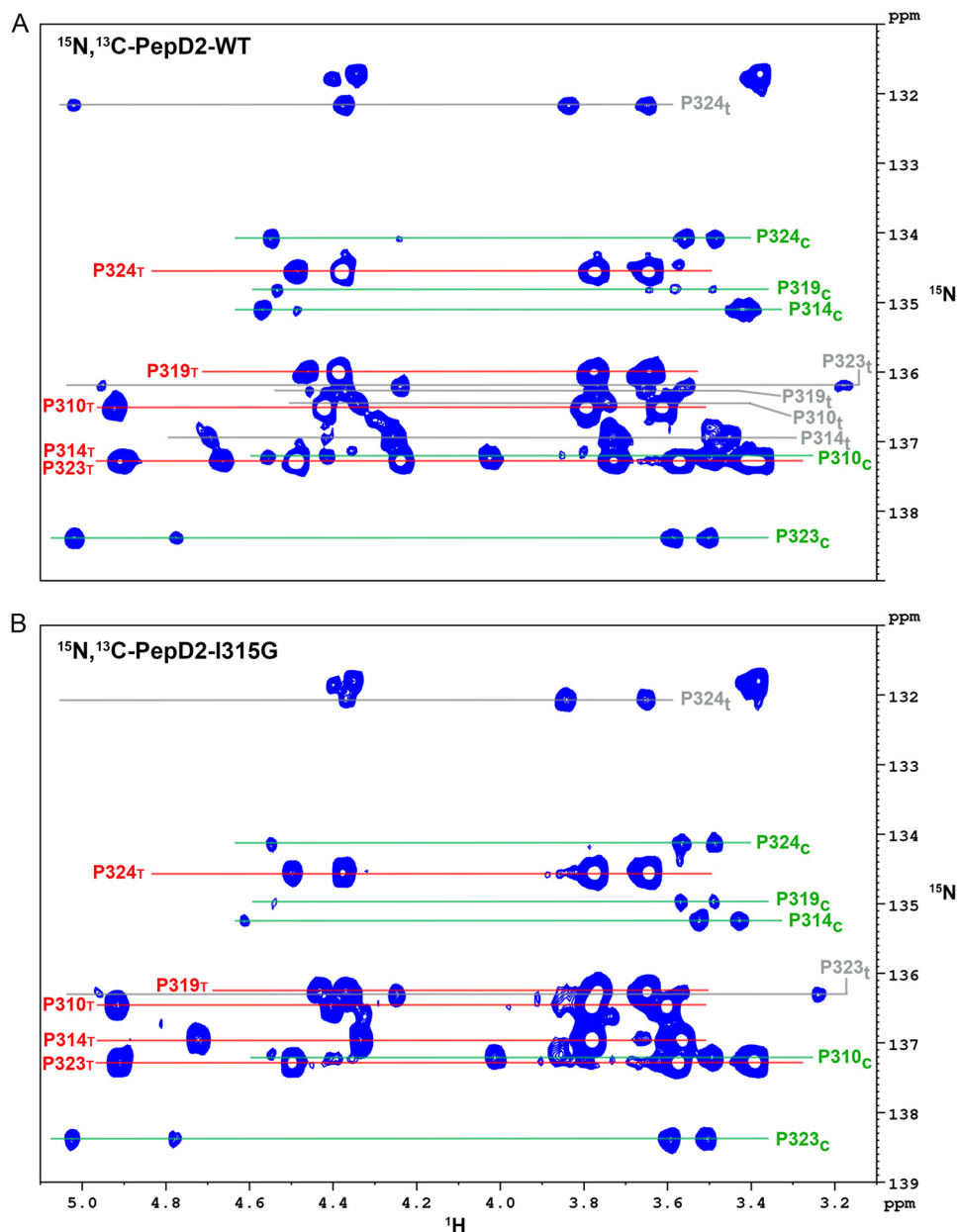


FIGURE 11. Assignments of the proline resonances in PepD2-WT (A) and PepD2-I315G (B). The panels correspond to two-dimensional ^1H , ^{15}N - $\text{H}\alpha(\text{C}\alpha)\text{N}$ NMR spectra centered on the $\text{H}\alpha$ - δ/N region of proline residues, which have been recorded on ^{15}N , ^{13}C -doubly labeled peptide. For a given proline, we observe at its ^{15}N frequency two resonances corresponding to its own (*i*) $\text{H}\alpha$ and the $\text{H}\alpha$ of the preceding (*i* - 1) residue (in the 4.0–5.0-ppm range). This experiment also connects the $\text{H}\delta$ protons (in the 3.0–3.9-ppm range) to the same nitrogen frequency because the coupling constant between $\text{C}\alpha$ -N and $\text{C}\delta$ -N are similar. A, in PepD2-WT, we find several signals, corresponding to different populations, for each proline residue: one major and two minor signals. The major population always corresponds to the *trans* conformer (T) (labeled in red), whereas the minor populations correspond to either *cis* (c) (labeled in green) or *trans* (t) (labeled in gray) conformers. B, in PepD2-I315G we assigned a major (T, labeled in red) and a minor (c, labeled in green) population for each proline residues and a second minor (t, labeled in gray) population only for Pro³²⁴, which is in a PP motif. Signals of ~132 ppm (^{15}N) correspond to the extra proline at the extreme N terminus from the DP cleavage site. Resonance assignments and determination of the proline conformations were based on a three-dimensional ^1H , ^{13}C , ^{15}N - $\text{H}\alpha\text{C}\alpha\text{C}\beta\text{N}$ NMR experiment.

population was only observed for Pro³²⁴, which belongs to the Pro³²³-Pro³²⁴ sequence motif (Figs. 11B and 12C). The absence of the minor (t) population for Pro³¹⁴ in PepD2-I315G suggests that the loss of the PW turn structural motif uncouples Pro³¹⁴ from the neighboring prolines. The addition of catalytic amounts of CypA to PepD2-I315G led to T \leftrightarrow c exchange peaks for all prolines except Pro³²⁴ (as for WT) and to a T \leftrightarrow t exchange peak for Pro³²⁴ (Fig. 12, C and D). The CypA-catalyzed T \leftrightarrow c exchange on Pro³¹⁴ is signifi-

cantly faster when the structural motif is absent in the mutant peptide (Fig. 12, B and D).

Discussion

NS5A is an essential protein that is involved in several steps of the HCV life cycle, such as RNA replication and new viral particle production (12, 13), but for which no enzymatic activity and no precise molecular function(s) have been identified so far. NS5A possesses, in addition to a well structured domain

A Structural Motif in NS5A-D2 Essential for RNA Replication

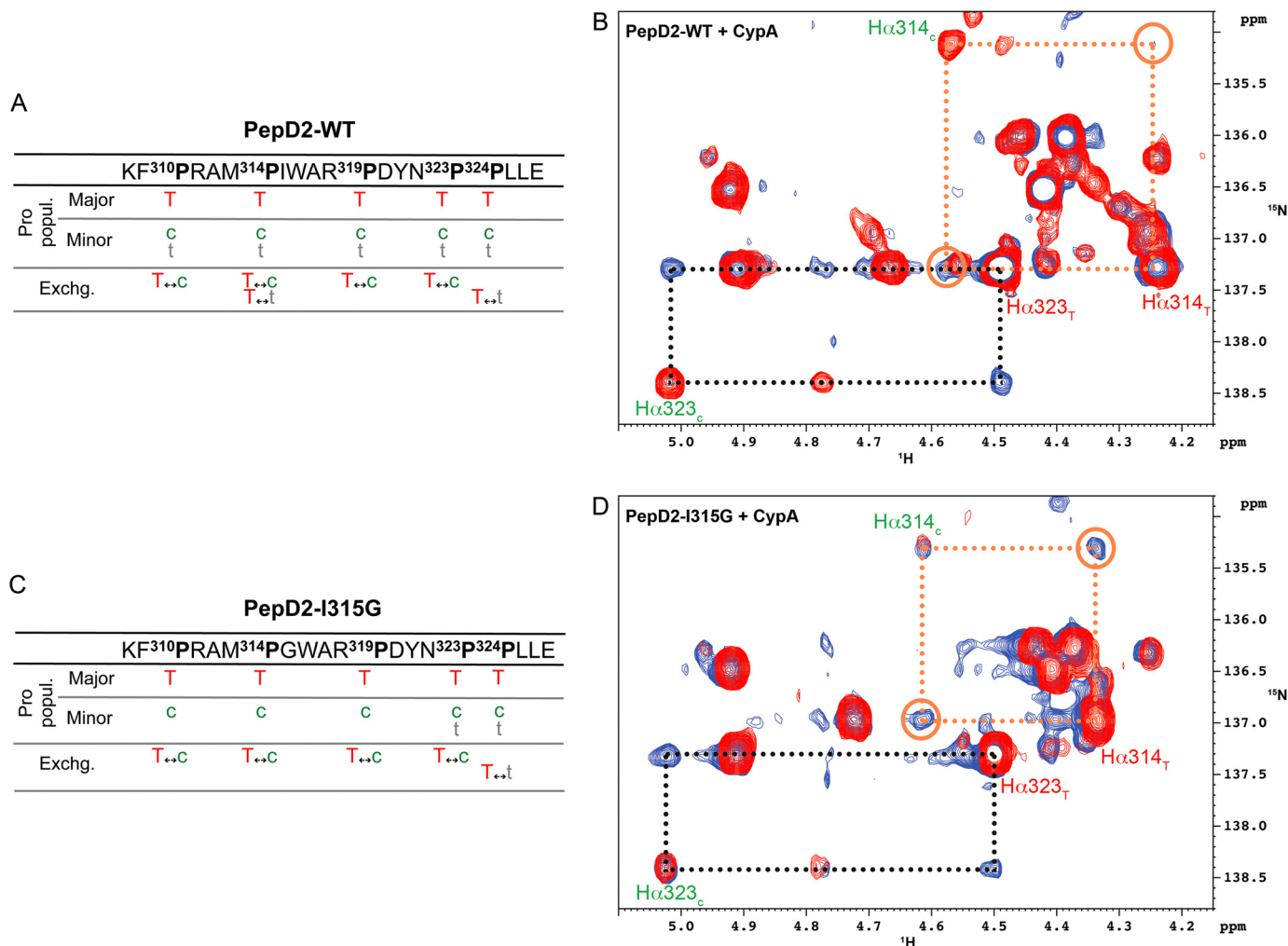


FIGURE 12. I315G mutation enhances the CypA-catalyzed *cis/trans* isomerization on Pro³¹⁴. A and C, tables summarizing all the CypA-catalyzed exchange processes that we have detected between the different proline populations in PepD2-WT (A) and in PepD2-I315G (C), respectively. B and D, superimposition of two-dimensional ¹H,¹⁵N-Ha(Cα)N NMR spectra with a Cα_z-N_z magnetization transfer period (150 ms) in absence (in red) or in presence of catalytic amount of unlabeled CypA (in blue), recorded on ¹⁵N,¹³C-PepD2-WT (B) and ¹⁵N,¹³C-PepD2-I315G (D). B and D correspond to zoomed regions centered on Pro³¹⁴ and Pro³²³ resonances. NMR exchange cross-peaks connecting the *trans* (T) and *cis* (c) conformers of Pro³¹⁴ (orange dashed frames and open circles) are more intense in the case of PepD2-I315G (D) than with PepD2-WT (B), whereas the normalized cross-peaks corresponding to the Pro³²³ isomerization (black dashed frames) are of the same intensity.

(D1), two additional domains (D2 and D3) that are mainly intrinsically disordered (23–25) and that we previously characterized by NMR spectroscopy (27, 28). IDPs/IDRs exist as highly dynamic and interconverting conformers and thus escape to the rule “one three-dimensional structure, one function.” The features that are responsible for the biological functions of this peculiar class of proteins remain to be better characterized (34). Here we present the identification, structure, and functional role of a short PW turn structural element within the mainly disordered domain 2 of the HCV NS5A protein.

NS5A-D2 from the HCV Con1 strain (genotype 1b) is mainly disordered (Fig. 1), as has previously been shown for the HCV strains H77 (genotype 1a) (23), JFH-1 (genotype 2a) (24), and HC-J4 (genotype 1b) (49). Similar to another genotype 1b HCV strain (49), secondary structural propensity analysis (55) indicates that NS5A-D2 (Con1) does contain two residual α-helices corresponding to residues 250–267 and 299–305 (Fig. 1C). Whereas no special features are detected with the latter method

or with MoRF predictors for residues Pro³¹⁴, Trp³¹⁶, and Ala³¹⁷, we demonstrate here that these residues are part of a minimal structural element that we name a PW turn. Among these crucial residues, the proline corresponds to the major disorder-promoting amino acid, whereas the tryptophan is the main order-promoting residue (34, 56, 57), which might explain why the PW turn escapes to the MoRF predictors. Residues Met³¹³ to Ala³¹⁷ of NS5A-D2 fold as a turn, which is mainly characterized by the hydrophobic interaction between the cyclic Pro³¹⁴ residue and the aromatic side chain of Trp³¹⁶ (Fig. 5). This PW turn in NS5A-D2 shares features of the Trp cage fold, which corresponds to the encapsulation of a Trp side chain by several proline residues (*i.e.* the cage) (58, 59). This motif has been described to be sufficient to efficiently promote the folding of mini-proteins (59). The PW turn identified in NS5A-D2 can be seen as a minimal Trp cage, with the interaction of a single proline residue with a tryptophan side chain. Contrary to MoRFs and PreMos in IDPs/IDRs, which are thought to fold upon binding to a partner, the PW turn of

NS5A-D2 already exists as a stable structural element in solution before any particular binding event.

In viruses that have a high mutation rate in their genome because of error-prone polymerases, the IDPs/IDRs have been proposed to have evolved to minimize the possible deleterious effects of these frequent mutations (30, 33). The PW turn nevertheless contains three residues, Pro³¹⁴, Trp³¹⁶, and Ala³¹⁷, that are strictly conserved across all HCV genotypes (Fig. 1B). In contrast, position 315 is quite variable because Ile, Val, Pro, and Ala can be observed. In our NMR PW turn structure model, the side chain of Ile³¹⁵ points outward of the turn and does not participate in the motif formation, thereby explaining the sequence variability observed at this position. In the PDB database, we identified 36 unique folded proteins in which the primary sequence P[IVPA]WA adopts a PW turn fold similar to that observed in NS5A-D2 (e.g. in PDB codes 3M9Y, 2I9E, 1X87 and 1ML1, with the primary sequences being PIWA, PVWA, PAWA, and PPAWA, respectively). The motif is notably conserved in the family of the triosephosphate isomerases from bacteria and eukaryotes and corresponds to the N-terminal hinge at the base of catalytic loop 6, which can exist in open or closed conformations (50, 60), thereby regulating the catalytic loop 6 motions (61). While the manuscript was in preparation, Chung *et al.* (62) reported the structure of a complex between the cellular MOBKL1B protein and two copies of a HCV NS5A-D2 derived peptide (residues 308–327, strain Jc1 genotype 2a). Although no functional role for this MOBKL1B-NS5A interaction was found, in one of the bound peptides the residues ³¹⁰PAWA³¹³ (PDB code 4J1V chain G) adopt the PW turn motif we here describe for the free peptide in solution, further confirming that the PW turn is an essential structural element over all HCV genotypes. Altogether, these results strongly suggest a functional role for the turn in NS5A-D2. On the basis of our search in the PDB database, we found that an aromatic or Gly residue in position equivalent to 315 disfavors the PW turn. We produced a NS5A-D2 I315G mutant and showed that this mutation efficiently disrupts the PW turn structure while maintaining all strictly conserved residues (Figs. 3 and 6). This mutant, without the PW turn motif, does not support viral RNA replication in a subgenomic replicon assay (Fig. 8). Tellinghuisen *et al.* (12) have previously observed that the NS5A-D2 P314A and W316A mutants impaired RNA replication, whereas the I315A mutant did not. Their results are consistent with the disruption of the PW turn in the two first mutants and with the fact that an alanine at position 315 is still compatible with this PW turn structure. It hence unambiguously indicates that the structural motif rather than the primary sequence is important for the biological activity of NS5A.

NS5A mutations (I315G or P314A) disrupting the PW turn structure lead to an altered subcellular distribution of NS5A, forming predominantly large clusters as compared with the small speckles formed by WT NS5A (Fig. 9). Electron microscopy analyses suggest that NS5A-positive structures correspond, in part, to double membrane vesicles, which are a hallmark of the membranous HCV replication factory, designated membranous web (52). A NS5A “cluster” phenotype similar to that of the PW turn mutants was previously found in cells treated with NS5A or Cyp inhibitors (46, 52, 53), as well as in

PI4KIII α knockdown cells. This phenotype was shown to correspond to lipid droplets or aberrant double membrane vesicles, respectively (47). Both CypA and PI4KIII α are essential host cell factors for HCV replication. In case of the latter, kinase activity is enhanced upon HCV infection by interaction with NS5A and NS5B (63, 64), resulting in increased PI4P levels. Although NS5A-PI4KIII α interaction occurs through NS5A domain I, it is also required for proper membranous web morphology, and therefore, we assessed the effect of I315G and P314A mutations on PI4KIII α activity by quantifying the intracellular PI4P levels. As expected, expression of WT NS3–5B enhanced PI4P levels (2.6-fold on average) and induced its dispersion throughout the cytoplasm with partial colocalization with NS5A (47). Mutants I315G and P314A also stimulated PI4P production (3.2- and 1.8-fold, respectively) compared with control cells, albeit to different extents (data not shown). Collectively, these results argue against a direct effect of mutations in the structural motif of NS5A-D2 on PI4KIII α activation. Therefore, inhibition of HCV replication, at least of the genotype 1b isolate Con1, by I315G and P314A mutations (Fig. 8) is probably due to disruption of the structural motif in NS5A-D2 and consequently to the abolishment of the functional interaction with CypA that is required for the establishment of HCV replication sites (46).

Regions in viral proteins associated with a higher sequence conservation have been proposed to be required for interaction with host proteins, which do not evolve as rapidly (32). We previously identified the 308–327 region of NS5A-D2 as the main binding site for the human CypA, which is a mandatory host factor for viral RNA replication (27). Several Pro to Ala mutations in this NS5A region have been evaluated in terms of CypA binding (51). The reduced CypA binding observed for P310A in the JFH-1 strain (equivalent to Pro³¹⁴ in Con1) might be due to the loss of the Pro as anchoring residue but also to the disruption of the structural PW turn. Here, on the basis of the comparative titration experiment results with NS5A-D2 WT and the mutant NS5A-D2 I315G (which still contains all the proline residues), we show that the proper binding to CypA requires the presence of the PW turn structure (Fig. 10). Gris  *et al.* (51) have shown that two peptides derived from the cellular Supervillin and Nsun5 proteins containing the linear sequence ALPAW were able to bind to CypA *in vitro*. Interestingly, we found that these Pro and Trp residues in the Supervillin structure (PDB code 2K6N) (65), but not in the Nsun5 structure (PDB code 2B9E), fold into a PW turn similar to that we here identified in NS5A-D2. The sole Pro to Ala mutation in this sequence motif efficiently abolished the interaction with CypA in the case of the Supervillin peptide, whereas all of the five prolines have to be mutated in the case of the Nsun5 peptide (51). These observations further support our conclusion that the structural PW turn motif beyond the linear sequence is required for proper binding of CypA.

The binding and enzymatic activity of PPIases are inherently tightly coupled, raising questions about their respective role in functional processes in which they are involved (54). For HIV-1, the binding of CypA to the viral Capsid protein seems required (66), whereas the infection of *E. coli* by the filamentous phage fd is regulated by the Cyclophilin18-catalyzed *cis/trans*-isomer-

A Structural Motif in NS5A-D2 Essential for RNA Replication

ization of its Pro²¹³ (67, 68). Regarding HCV and its mandatory host factor CypA, this important question remains to be answered (69). However, because mutations in the active site of CypA abolishing its PPIase activity also interfere with its binding property (69, 70), it is challenging to distinguish between these two possible mechanisms, which are moreover not mutually exclusive. We show that CypA-catalyzed *cis/trans* ($c \leftrightarrow T$) isomerization of Pro³¹⁴ is significantly faster when the structural motif is absent (Fig. 12), suggesting that it is the interaction of the PW turn structure with CypA that is required for HCV RNA replication rather than the CypA-catalyzed *cis/trans* isomerization of Pro³¹⁴. Although we showed a correlation between the CypA binding to the PW turn, the subcellular distribution of NS5A, which is related to the membranous web formation, and the HCV RNA replication, we cannot exclude the possibility that the PW turn structure might also be involved in the binding of other proteins, as, for example, the NS5B polymerase.

In conclusion, we have identified a small well defined PW turn structure in the intrinsically disordered domain 2 of HCV NS5A protein. This PW turn is conserved across all HCV genotypes and plays a crucial functional role, because it is required for viral RNA replication. This minimal structural element is directly involved in the binding of the host CypA, which is mandatory for HCV replication, and plays a role in NS5A subcellular distribution. Our work thereby provides a molecular basis for the understanding of the role of NS5A in the HCV replication and also highlights how very small structural motifs can carry specific function(s) in IDPs.

Author Contributions—X. H., G. L., R. B., and F. P. designed the study and wrote the paper. M. D. and X. H. purified proteins and peptides and performed the NMR analyses shown in Figs. 1–4, 6, 11, and 12. V. M. and R. B. designed, performed, and analyzed the cellular experiments shown in Figs. 8 and 9. R. M. and F. P. calculated and analyzed the NMR structure models of PepD2-WT shown in Fig. 5 and Table 1. P. A. and G. L. designed, performed, and analyzed the exchange NMR spectroscopy experiments shown in Figs. 11 and 12. I. H. designed and constructed vectors for expression of mutant proteins and analyzed the mutant phenotypes in bacteria. H. L. provided assistance for NMR experiments and contributed to the preparation of the figures. A. L. designed, performed, and analyzed the CD and fluorescence spectroscopy experiments shown in Fig. 7. All authors analyzed the results and approved the final version of the manuscript.

References

1. Gravitz, L. (2011) A smouldering public-health crisis. *Nature* **474**, S2–S4
2. Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C. M. (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 453–463
3. Bartenschlager, R., Lohmann, V., and Penin, F. (2013) The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 482–496
4. Scheel, T. K., and Rice, C. M. (2013) Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.* **19**, 837–849
5. Pawlowsky, J.-M. (2014) New hepatitis C virus (HCV) drugs and the hope for a cure: concepts in anti-HCV drug development. *Semin. Liver Dis.* **34**, 22–29
6. Lange, C. M., Jacobson, I. M., Rice, C. M., and Zeuzem, S. (2014) Emerging

- therapies for the treatment of hepatitis C. *EMBO Mol. Med.* **6**, 4–15
7. Gao, M., Nettles, R. E., Belema, M., Snyder, L. B., Nguyen, V. N., Fridell, R. A., Serrano-Wu, M. H., Langley, D. R., Sun, J. H., O'Boyle, D. R., 2nd, Lemm, J. A., Wang, C., Knipe, J. O., Chien, C., Colonno, R. J., Grasela, D. M., Meanwell, N. A., and Hamann, L. G. (2010) Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* **465**, 96–100
8. Yang, F., Robotham, J. M., Grise, H., Frausto, S., Madan, V., Zayas, M., Bartenschlager, R., Robinson, M., Greenstein, A. E., Nag, A., Logan, T. M., Bienkiewicz, E., and Tang, H. (2010) A major determinant of cyclophilin dependence and cyclosporine susceptibility of hepatitis C virus identified by a genetic approach. *PLoS Pathog.* **6**, e1001118
9. Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lopez, M. Z., Lohmann, V., Luban, J., and Bartenschlager, R. (2009) Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog.* **5**, e1000546
10. Paeshuyse, J., Kaul, A., De Clercq, E., Rosenwirth, B., Dumont, J. M., Scalfaro, P., Bartenschlager, R., and Neyts, J. (2006) The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* **43**, 761–770
11. Gally, P. A., and Lin, K. (2013) Profile of alisporivir and its potential in the treatment of hepatitis C. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**, 105–115
12. Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., Treadaway, J. C., and Rice, C. M. (2008) Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J. Virol.* **82**, 1073–1083
13. Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008) Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* **4**, e1000035
14. Moradpour, D., and Penin, F. (2013) Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **369**, 113–142
15. Ross-Thriepand, D., and Harris, M. (2014) Insights into the complexity and functionality of hepatitis C virus NS5A phosphorylation. *J. Virol.* **88**, 1421–1432
16. Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H. E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004) Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* **279**, 40835–40843
17. Ascher, D. B., Wielens, J., Nero, T. L., Doughty, L., Morton, C. J., and Parker, M. W. (2014) Potent hepatitis C inhibitors bind directly to NS5A and reduce its affinity for RNA. *Sci. Rep.* **4**, 4765
18. Huang, L., Hwang, J., Sharma, S. D., Hargittai, M. R., Chen, Y., Arnold, J. J., Raney, K. D., and Cameron, C. E. (2005) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 36417–36428
19. Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., and Rice, C. M. (2005) Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**, 374–379
20. Love, R. A., Brodsky, O., Hickey, M. J., Wells, P. A., and Cronin, C. N. (2009) Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus. *J. Virol.* **83**, 4395–4403
21. Lambert, S. M., Langley, D. R., Garnett, J. A., Angell, R., Hedgethorpe, K., Meanwell, N. A., and Matthews, S. J. (2014) The crystal structure of NS5A domain I from genotype 1a reveals new clues to the mechanism of action for dimeric HCV inhibitors. *Protein Sci.* **23**, 723–734
22. Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., and Treadaway, J. (2008) Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* **4**, e1000032
23. Liang, Y., Ye, H., Kang, C. B., and Yoon, H. S. (2007) Domain 2 of non-structural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus is natively unfolded. *Biochemistry* **46**, 11550–11558
24. Hanouille, X., Badillo, A., Verdegem, D., Penin, F., and Lippens, G. (2010) The domain 2 of the HCV NS5A protein is intrinsically unstructured. *Protein Pept. Lett.* **17**, 1012–1018
25. Hanouille, X., Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszkeski, J. M., Penin, F., and Lippens, G. (2009) Domain 3 of non-structural protein 5A from hepatitis C virus is natively unfolded. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**,

634–638

26. Fan, X., Xue, B., Dolan, P. T., LaCount, D. J., Kurgan, L., and Uversky, V. N. (2014) The intrinsic disorder status of the human hepatitis C virus proteome. *Mol. Biosyst.* **10**, 1345–1363
27. Hanouille, X., Badillo, A., Wieruszkeski, J. M., Verdegem, D., Landrieu, I., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lippens, G. (2009) Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B. *J. Biol. Chem.* **284**, 13589–13601
28. Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszkeski, J. M., Landrieu, I., Leroy, A., Bartenschlager, R., Penin, F., Lippens, G., and Hanouille, X. (2011) Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic α -helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. *J. Biol. Chem.* **286**, 20441–20454
29. Uversky, V. N., Oldfield, C. J., and Dunker, A. K. (2008) Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys.* **37**, 215–246
30. Xue, B., Williams, R. W., Oldfield, C. J., Goh, G. K., Dunker, A. K., and Uversky, V. N. (2010) Viral disorder or disordered viruses: do viral proteins possess unique features? *Protein Pept. Lett.* **17**, 932–951
31. Gunasekaran, K., Tsai, C. J., Kumar, S., Zanuy, D., and Nussinov, R. (2003) Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 81–85
32. Tokuriki, N., Oldfield, C. J., Uversky, V. N., Berezovsky, I. N., and Tawfik, D. S. (2009) Do viral proteins possess unique biophysical features? *Trends Biochem. Sci.* **34**, 53–59
33. Alves, C., and Cunha, C. (2012) Order and disorder in viral proteins: new insights into an old paradigm. *Fut. Virol.* **7**, 1183–1191
34. Uversky, V. N. (2013) A decade and a half of protein intrinsic disorder: biology still waits for physics: protein intrinsic disorder. *Protein Sci.* **22**, 693–724
35. Davey, N. E., Van Roey, K., Weatheritt, R. J., Toedt, G., Uyar, B., Altenberg, B., Budd, A., Diella, F., Dinkel, H., and Gibson, T. J. (2012) Attributes of short linear motifs. *Mol. Biosyst.* **8**, 268–281
36. Vacic, V., Oldfield, C. J., Mohan, A., Radivojac, P., Cortese, M. S., Uversky, V. N., and Dunker, A. K. (2007) Characterization of molecular recognition features, mRFs, and their binding partners. *J. Proteome Res.* **6**, 2351–2366
37. Lee, S.-H., Kim, D.-H., Han, J. J., Cha, E.-J., Lim, J.-E., Cho, Y.-J., Lee, C., and Han, K.-H. (2012) Understanding pre-structured motifs (PreSMos) in intrinsically unfolded proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 34–54
38. Combet, C., Garnier, N., Charavay, C., Grando, D., Crisan, D., Lopez, J., Dehne-Garcia, A., Geourjon, C., Bettler, E., Hulo, C., Le Mercier, P., Bartenschlager, R., Diepolder, H., Moradpour, D., Pawlowsky, J. M., Rice, C. M., Trépo, C., Penin, F., and Deléage, G. (2007) euHCVdb: the European hepatitis C virus database. *Nucleic Acids Res.* **35**, D363–D366
39. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deléage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 147–150
40. Verdegem, D., Dijkstra, K., Hanouille, X., and Lippens, G. (2008) Graphical interpretation of Boolean operators for protein NMR assignments. *J. Biomol. NMR.* **42**, 11–21
41. Wüthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*, The George Fisher Baker Non-resident Lectureship in Chemistry at Cornell University, Wiley, New York
42. Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR.* **13**, 289–302
43. Schwieters, C. D., Kuszewski, J. J., and Marius Clore, G. (2006) Using Xplor: NIH for NMR molecular structure determination. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **48**, 47–62
44. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55
45. Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2003) Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J. Virol.* **77**, 3007–3019
46. Madan, V., Paul, D., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2014) Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation. *Gastroenterology* **146**, 1361–1372
47. Reiss, S., Harak, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Klein, R., Ruggieri, A., Rebhan, I., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2013) The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A. *PLoS Pathog.* **9**, e1003359
48. Tamiola, K., Acar, B., and Mulder, F. A. (2010) Sequence-specific random coil chemical shifts of intrinsically disordered proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18000–18003
49. Feuerstein, S., Solyom, Z., Aladag, A., Favier, A., Schwarten, M., Hoffmann, S., Willbold, D., and Brutscher, B. (2012) Transient structure and SH3 interaction sites in an intrinsically disordered fragment of the hepatitis C virus protein NS5A. *J. Mol. Biol.* **420**, 310–323
50. Casteleijn, M. G., Alahuhta, M., Groebel, K., El-Sayed, I., Augustyns, K., Lambeir, A.-M., Neubauer, P., and Wierenga, R. K. (2006) Functional role of the conserved active site proline of triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* **45**, 15483–15494
51. Grisé, H., Frausto, S., Logan, T., and Tang, H. (2012) A conserved tandem cyclophilin-binding site in hepatitis C virus nonstructural protein 5A regulates alisporivir susceptibility. *J. Virol.* **86**, 4811–4822
52. Berger, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Terreux, R., Zayas, M., Paul, D., Harak, C., Hoppe, S., Gao, M., Penin, F., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2014) Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication. *Gastroenterology* **147**, 1094–1105.e25
53. Anderson, L. J., Lin, K., Compton, T., and Wiedmann, B. (2011) Inhibition of cyclophilins alters lipid trafficking and blocks hepatitis C virus secretion. *Virol. J.* **8**, 329
54. Fischer, G., Tradler, T., and Zarnt, T. (1998) The mode of action of peptidyl prolyl cis/trans isomerases *in vivo*: binding vs. catalysis. *FEBS Lett.* **426**, 17–20
55. Marsh, J. A., Singh, V. K., Jia, Z., and Forman-Kay, J. D. (2006) Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between alpha- and gamma-synuclein: implications for fibrillation. *Protein Sci.* **15**, 2795–2804
56. Campen, A., Williams, R. M., Brown, C. J., Meng, J., Uversky, V. N., and Dunker, A. K. (2008) TOP-IDP-Scale: a new amino acid scale measuring propensity for intrinsic disorder. *Protein Pept. Lett.* **15**, 956–963
57. Theillet, F.-X., Kalmár, L., Tompa, P., Han, K.-H., Selenko, P., Dunker, A. K., Daughdrill, G. W., and Uversky, V. N. (2013) The alphabet of intrinsic disorder I: act like a pro: on the abundance and roles of proline residues in intrinsically disordered proteins. *Intrinsically Disord. Proteins.* **1**, 1–13
58. Barua, B., Lin, J. C., Williams, V. D., Kummmler, P., Neidigh, J. W., and Andersen, N. H. (2008) The Trp-cage: optimizing the stability of a globular miniprotein. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS.* **21**, 171–185
59. Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., and Andersen, N. H. (2002) Designing a 20-residue protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9**, 425–430
60. Kursula, I., Salin, M., Sun, J., Norledge, B. V., Haapalainen, A. M., Sampson, N. S., and Wierenga, R. K. (2004) Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 375–382
61. Rozovsky, S., Jogl, G., Tong, L., and McDermott, A. E. (2001) Solution-state NMR investigations of triosephosphate isomerase active site loop motion: ligand release in relation to active site loop dynamics. *J. Mol. Biol.* **310**, 271–280
62. Chung, H.-Y., Gu, M., Buehler, E., MacDonald, M. R., and Rice, C. M. (2014) Seed sequence-matched controls reveal limitations of small interfering RNA knockdown in functional and structural studies of hepatitis C virus NS5A-MOBKL1B interaction. *J. Virol.* **88**, 11022–11033
63. Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., Longeric, T., Diehl, S., Ramirez, F., Balla, T., Rohr, K., Kaul, A., Bühler, S., Pepperkok, R., Lengauer, T., Albrecht, M., Eils, R., Schirmacher, P., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2011) Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe.* **9**, 32–45
64. Berger, K. L., Kelly, S. M., Jordan, T. X., Tartell, M. A., and Randall, G. (2011) Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *J. Virol.* **85**, 8870–8883

A Structural Motif in NS5A-D2 Essential for RNA Replication

65. Brown, J. W., Vardar-Ulu, D., and McKnight, C. J. (2009) How to arm a supervillin: designing F-actin binding activity into supervillin headpiece. *J. Mol. Biol.* **393**, 608–618
66. Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V., and Goff, S. P. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell*. **73**, 1067–1078
67. Eckert, B., Martin, A., Balbach, J., and Schmid, F. X. (2005) Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 619–623
68. Weininger, U., Jakob, R. P., Eckert, B., Schweimer, K., Schmid, F. X., and Balbach, J. (2009) A remote prolyl isomerization controls domain assembly via a hydrogen bonding network. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 12335–12340
69. Chatterji, U., Bobardt, M., Selvarajah, S., Yang, F., Tang, H., Sakamoto, N., Vuagniaux, G., Parkinson, T., and Galloway, P. (2009) The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *J. Biol. Chem.* **284**, 16998–17005
70. Braaten, D., Ansari, H., and Luban, J. (1997) The hydrophobic pocket of cyclophilin is the binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J. Virol.* **71**, 2107–2113
71. Strickland, E. H. (1974) Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **2**, 113–175

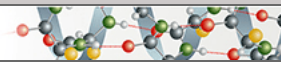
**Protein Structure and Folding:
A Proline-Tryptophan Turn in the
Intrinsically Disordered Domain 2 of NS5A
Protein Is Essential for Hepatitis C Virus
RNA Replication**

Marie Dujardin, Vanesa Madan, Roland
Montserret, Puneet Ahuja, Isabelle Huvent,
Helene Launay, Arnaud Leroy, Ralf
Bartenschlager, François Penin, Guy Lippens
and Xavier Hanouille

J. Biol. Chem. 2015, 290:19104-19120.

doi: 10.1074/jbc.M115.644419 originally published online June 17, 2015

PROTEIN STRUCTURE
AND FOLDING



MOLECULAR BASES
OF DISEASE



Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M115.644419](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.644419)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](http://www.jbc.org/).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 70 references, 17 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/290/31/19104.full.html#ref-list-1>

1.3 Clonage, expression et purification de peptides recombinants marqués pour la RMN

Dans cette partie nous détaillons la méthode qui a permis l'obtention des peptides pepD2(Con1) doublement marqués $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ (Figure 54B).

1.3.1 Stratégie utilisée

La synthèse chimique d'un peptide de 20 résidus doublement marqué est envisageable mais l'enrichissement $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ nécessaire pour la faible sensibilité de la RMN est trop onéreux. Par contre, l'expression de ce peptide de manière recombinante chez *Escherichia coli* est compatible avec un tel enrichissement isotopique, mais pose des problèmes de rendement d'expression et de dégradation si le peptide est trop petit. Nous avons donc choisi de produire le peptide D2 (Con1) en fusion avec la protéine thioredoxine A chez *Escherichia coli*. Cette stratégie permet d'augmenter les rendements d'expression, en évitant que l'ARNm du peptide ne se dégrade dans la cellule. De plus la protéine de fusion thioredoxine A (TrxA) est une enzyme d'oxydoréduction de 11,8 kDa très soluble, c'est pourquoi elle est utilisée en fusion afin d'augmenter les rendements en peptide. Afin d'exprimer le peptide marqué chez *E. coli* nous avons utilisé le plasmide pET32a. Dans ce plasmide, une étiquette poly-histidine est présente en N-terminal de la thioredoxine A permettant de purifier la protéine de fusion par chromatographie d'affinité. Le plasmide pET32a utilisé permet d'introduire un site de coupure à la thrombine dans le site multiple de clonage entre les deux partenaires de fusion : la TrxA et le peptide. La thioredoxine A peut alors être séparée du peptide grâce à une coupure enzymatique et éliminée par chromatographie d'affinité grâce à la présence de son étiquette poly-histidine présente en N-terminal.

La thrombine clive sélectivement entre les résidus d'arginine et de glycine du site de clivage (Leu-Val-Pro-Arg-/Gly-Ser). Afin de séparer les deux partenaires de fusion nous n'avons pas utilisé le site de clivage à la thrombine présent entre les deux partenaires de fusion dans le plasmide pET32a. En effet, l'inconvénient de ce site de coupure est que deux résidus supplémentaires Gly-Ser auraient été présents en N-terminal du peptide de 20 résidus. Nous avons alors choisi de cliver la protéine de fusion grâce à un site de coupure chimique Asp-Pro que nous avons inséré artificiellement en N-terminal du peptide. La liaison peptidique Asp-Pro peut être hydrolysée dans des conditions de pH acide et éventuellement de température relativement élevée (70°C) alors que les autres liaisons peptidiques Asp-X sont stables

(Piszkiwicz et al., 1970). Le mécanisme de cette réaction se fait par une catalyse intramoléculaire entre l'anion carboxylique de la chaîne latérale de l'aspartate et le groupement amine de la proline, avec formation d'un intermédiaire imide cyclique conduisant au clivage de la chaîne peptidique. La plus grande facilité de réaction avec la proline comparée aux autres acides aminés est due à la plus grande basicité de sa fonction amine et à la plus grande mobilité de la liaison peptidique Asp-Pro. Le mécanisme de réaction est détaillé ci-dessous (Figure 55) :

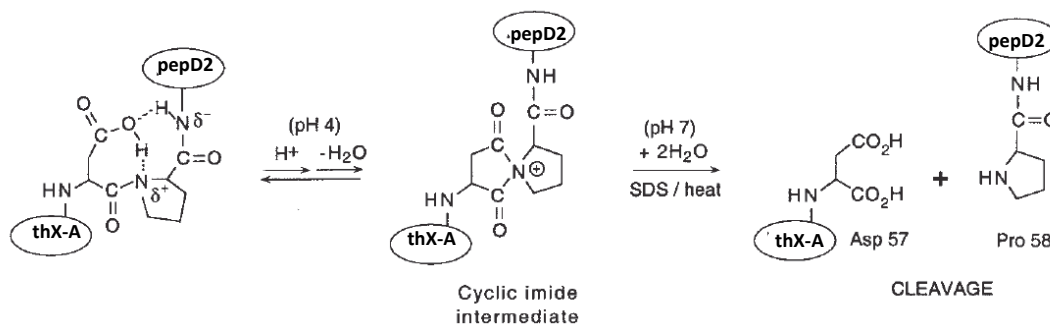


Figure 55. Mécanisme de l'hydrolyse acide de la liaison peptidique Asp-Pro. Adapté de Lamed et al., (2001).

Les peptides recombinants possèdent donc une proline supplémentaire en N-terminal résultant du site de clivage Asp-Pro.

1.3.2 Clonage du peptide D2 Con1

Etant donné que la séquence d'ADN codant pour le peptide D2 (Con1) est petite, 60 paires de bases, nous n'avons pas utilisé une stratégie classique de clonage car cet ADN peut être difficile à purifier à partir d'une PCR sur gel d'agarose. Nous avons d'abord cloné le peptide dans un plasmide intermédiaire, le plasmide pJET1.2 issu du kit « Clone Jet PCR Cloning Kit », permettant de cloner des fragments d'ADN *blunt*, sans utilisation d'enzymes de restrictions. De plus, l'utilisation de ce plasmide permet de faire une sélection positive des clones contenant l'insert car le plasmide pJET1.2 contient un site de restriction léthal qui peut être interrompu par la présence d'un insert dans le site de clonage.

La séquence d'ADN codant pour les 20 acides aminés du peptide a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pT7.7, contenant la séquence de NS5A-D2 Con1, avec les amorces suivantes : 5'-CGT **GGA TCC GAC CCT** AAA TTT CCA CGT GCA ATG CCG ATC TGG-3' et 5'-ATT **CTC GAG TCA TCA CTC CAG CAG CGG CGG** GTT GTA ATC-3'. Les séquences en caractères gras indiquent les sites de coupure des enzymes de restrictions BamHI et XhoI respectivement. La séquence en italique est la séquence Asp-Pro insérée artificiellement dans le

fragment de PCR juste avant le peptide D2 (Con1). Le fragment amplifié par PCR a été directement inséré dans le plasmide pJET1.2 sans coupure par des enzymes de restrictions puis séquencé.

Le fragment inséré dans le plasmide pJET1.2 a ensuite été digéré par les enzymes de restrictions BamHI et XhoI puis inséré dans le plasmide pET32a. Cette construction permet d'exprimer une protéine recombinante de 162 acides aminés (17,6 kDa). Les 6 premiers acides aminés correspondent à l'étiquette poly-histidine, les 128 suivants à la thioredoxine A, les 6 acides aminés suivants correspondant au site de clivage à la thrombine, le site de coupure chimique DP, puis les 20 derniers acides aminés correspondent au peptide D2 (Con1) (Figure 56).

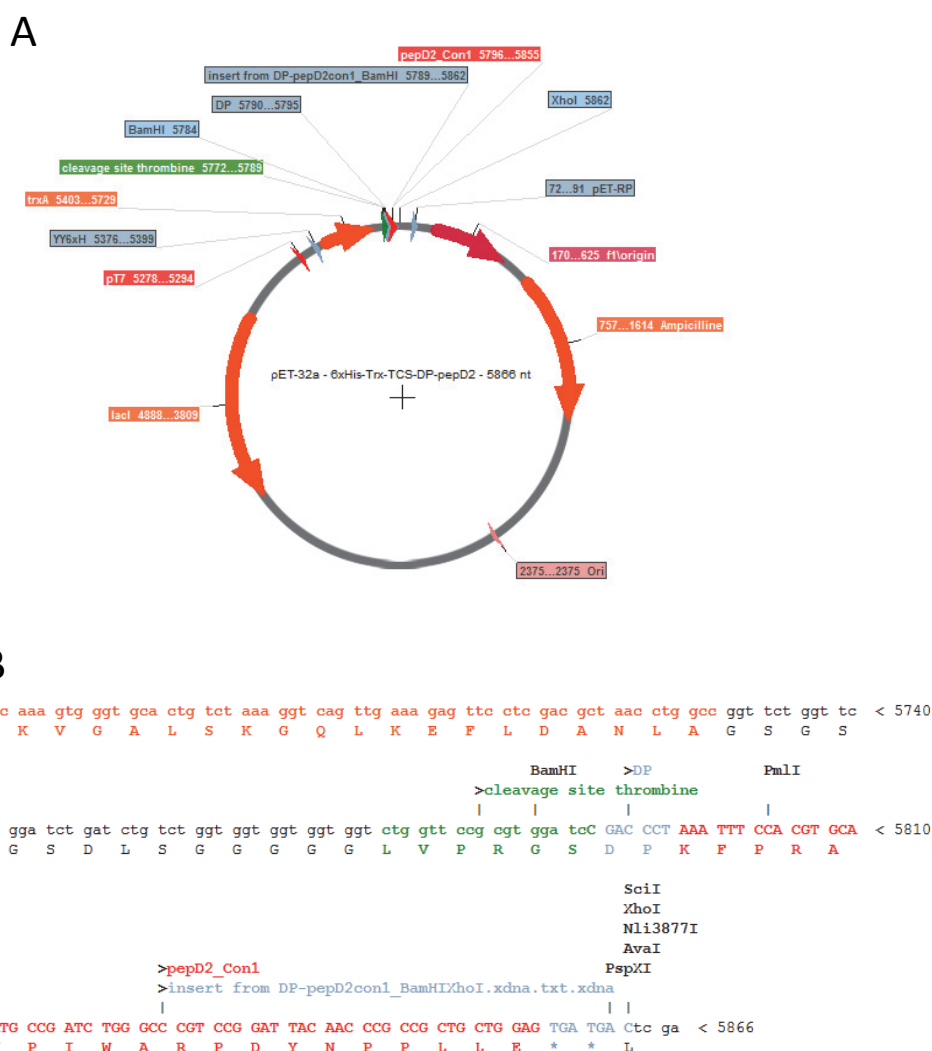


Figure 56. Clonage du peptide D2 (Con1) à l'aide du plasmide pET32a. A, Le plasmide d'expression pET32a thioredoxineA-pepD2(Con1) a été construit en clonant la séquence d'ADN codant pour le site de coupure Asp-Pro suivi de la séquence codant pour le peptide D2 (Con1) dans les sites BamHI et XhoI. Le vecteur permet ainsi la production d'une protéine de fusion thioredoxine A-peptide-D2(Con1) avec une étiquette poly-histidine en N-terminal, un site de coupure Asp-Pro ainsi qu'un site de coupure à la thrombine entre les deux partenaires de fusion. B, Détail du vecteur d'expression pET32a thioredoxineA-

pepD2Con1 au niveau de la fusion entre la thioredoxine A et le peptide D2 (Con1). La séquence codant pour la thioredoxine A (orange) est suivie du site de coupure à la thrombine (vert), puis du site de coupure chimique Asp-Pro (bleu) et de la séquence codant pour le peptide D2-Con1 (rouge).

1.3.3 Expression de la protéine de fusion TrxA-pepD2Con1 marquée ^{15}N ^{13}C

Les cellules d'expression *E. coli* BL21(DE3) ont été transformées par électoporation avec le plasmide d'expression pET32a recombinant codant pour la protéine de fusion TrxA-pepD2(Con1) sous contrôle du promoteur fort et inductible P_{T7lac} . Afin d'obtenir une analyse structurale et fonctionnelle du peptide D2 (Con1) par RMN, nous avons réalisé un marquage ^{15}N , ^{13}C de la protéine recombinante. Les cellules ont été cultivées en milieu minimal M9 avec une unique source d'azote $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et une unique source de carbone ^{13}C -glucose. La production de la protéine de fusion a été induite par 0.4 mM d'IPTG, permettant de lever la répression du répresseur Lac et ainsi permettre la production de l'ARN polymérase T7 nécessaire à la transcription du gène cible. La protéine de fusion est très bien exprimée dans les cellules *E. coli* BL21(DE3) 4h30 après induction à 37°C, le niveau de surexpression de la protéine de fusion de 17,6 kDa est analysé par SDS-PAGE (Figure 57).

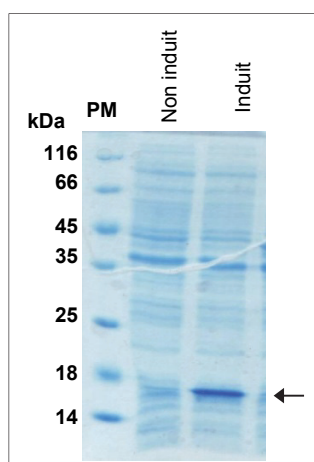


Figure 57. Expression de la protéine de fusion TrxA-pepD2Con1. Les échantillons analysés par SDS-PAGE (16 %) et colorés au Bleu de Coomassie correspondent tous à une même quantité de cellules avant induction et 4h30 après induction à 37°C. La flèche noire indique la protéine de fusion TrxA-pepD2(Con1).

1.3.4 Purification de la protéine de fusion TrxA-pepD2(Con1)

La protéine recombinante étant produite dans le cytoplasme il est nécessaire de lyser les cellules induites par ajout de détergent (Triton X100), de lysozyme et de DNase. La centrifugation permet ensuite de séparer les débris cellulaires (paroi, débris membranaires...) des constituants se trouvant dans le surnageant (protéines, ADN, ARN, sucres...). La protéine recombinante TrxA-pepD2(Con1) a été purifiée par chromatographie d'affinité sur nickel grâce à la présence de

l'étiquette poly-histidine présente en N-terminal de la protéine de fusion (Figure 58). On peut remarquer à cette étape une légère coupure de la protéine de fusion au niveau du site de coupure chimique DP correspondant à la bande située juste en dessous de celle de TrxA-pepD2(Con1) (Figure 58). La protéine de fusion est purifiée efficacement avec un bon rendement : environ 30mg par litre de culture.

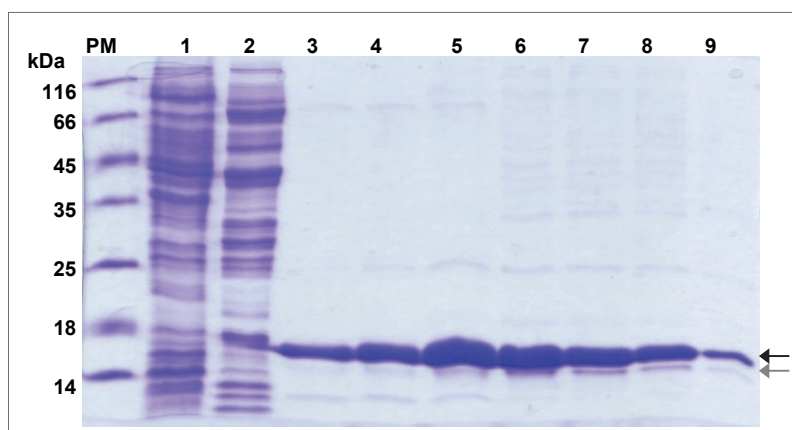


Figure 58. Purification de la protéine de fusion TrxA-pepD2(Con1) $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$. Analyse par SDS-PAGE (16 %) des échantillons issus de la purification par chromatographie d'affinité au nickel. piste 1 : protéines non retenues par la colonne ; piste 2 lavage à 25 mM d'imidazole, pistes 3 à 9 fractions collectées lors de l'élution par gradient d'imidazole de 25 mM à 250 mM. La flèche noire indique la protéine de fusion TrxA-pepD2(Con1) et la flèche grise la protéine TrxA issue d'une dégradation de la protéine de fusion au niveau du site de coupure chimique DP.

1.3.5 Elimination de la thioredoxine A par coupure chimique DP

Les fractions issues de la purification d'affinité au nickel ont été rassemblées et dialysées contre un tampon (200 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 6.8). Nous avons effectué différents essais de coupure chimique DP sur la protéine de fusion purifiée afin d'éliminer la thioredoxine A. Différentes conditions de coupure ont été testées et analysées par SDS-PAGE en faisant varier la température, le temps d'incubation et l'ajout de différents acides (acide chlorhydrique, acide trifluoro-acétique (TFA)). La Figure 59 résume les conditions testées.

Test n°1	10 mM HCl à 25°C
Test n°2	10 mM HCl à 90°C
Test n°3	20 mM HCl à 75°C
Test n°4	0.1 % TFA à 75°C

Figure 59. Conditions testées pour la coupure chimique DP de la protéine de fusion.

Le test n°4 a permis d'obtenir le meilleur rendement en peptides. Les pistes 3 à 8 sur l'analyse SDS-PAGE (Figure 60) correspondent à des temps croissant d'incubation de la protéine de fusion dans les conditions du test n°4. Deux bandes très proches sont observées à environ 17,5 kDa. La bande du haut, correspondant à la protéine de fusion TrxA-pepD2(Con1), disparaît au cours du temps alors que celle du bas correspondant à la TrxA seule apparaît. Les conditions optimales de coupure chimique de la protéine de fusion sont donc une incubation à 75°C à pH 2 par ajout de 0.1 % TFA, pendant 4h30. Le clivage de la protéine de fusion à la thrombine (Figure 60 piste 9) nous a permis d'avoir un contrôle positif de la coupure chimique DP. Cette coupure est réalisée avec 1 unité de thrombine pour 100 µg de protéine de fusion, à température ambiante, pendant 1 h, dans un tampon à 50 mM Tris pH8 et 150 mM NaCl.

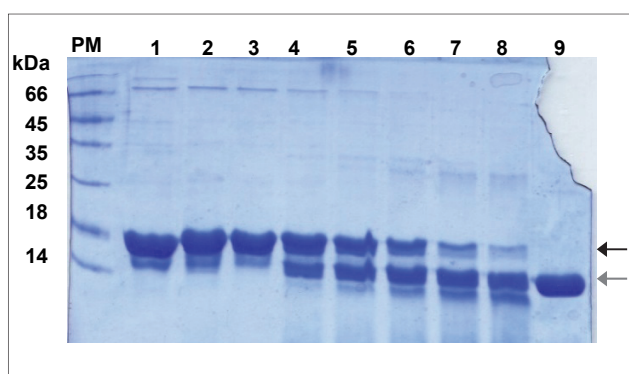


Figure 60. Résultats du test n°4 de coupure chimique acide DP de la protéine de fusion TrxA-pepD2(Con1) $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$. La piste 1 correspond au pool des fractions collectées après purification par affinité au nickel, la piste 2 correspond au pool des fractions collectées après purification par affinité au nickel et dialysé contre le tampon 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 6.8. Les pistes 3 à 8 correspondent à la coupure chimique DP en présence de 0.1 % TFA à 75°C pendant différents temps d'incubation (piste 3 : t=0 min ; piste 4 : t=30min ; piste 5 : t=1h ; piste 6 : t=2h ; piste 7 : t=3h ; piste 8 : t=4h). La piste 9 correspond au contrôle positif de coupure à la thrombine et permet de vérifier que la différence de masse entre les deux bandes correspond bien à un peptide de 20 résidus. La bande correspondant à la protéine de fusion TrxA-pepD2Con1 est indiquée par une flèche noire et celle de la protéine TrxA est indiquée par une flèche grise.

Après la coupure acide du site de clivage DP pendant 4h30, le pH du milieu réactionnel est neutralisé. La TrxA est éliminée par incubation avec des billes de résines chargées en Ni^{2+} grâce à la présence de son étiquette poly-histidine. Le surnageant contenant le peptide D2 Con1 est ensuite purifié par chromatographie en phase inverse.

1.3.6 Purification du peptide par chromatographie phase inverse

Après élimination de la TrxA, le peptide doit être purifié par chromatographie liquide en phase inverse pour éliminer les coupures non spécifiques dues aux conditions de clivage de la liaison peptidique DP. L'échantillon est acidifié à un pH de 2 par de l'acide trifluoro-acétique et chargé

sur une colonne de phase inverse (Zorbax 300 SB C18 9,4/250). Le peptide est élué par un gradient d'acétonitrile (Figure 61 A). Les fractions d'élution correspondant à un maximum d'absorbance à 280 nm sur le chromatogramme (fractions 3, 4 et 5) sont rassemblées et analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le pic majoritaire du spectre de masse correspond à la masse attendue pour le peptide D2 Con1 marqué ^{15}N ^{13}C , $2655 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figure 61 B). Les autres fractions du chromatogramme sont également analysées par spectrométrie de masse et correspondent à des impuretés ou à une coupure non spécifique du peptide, comme le peptide de la fraction 1 du chromatogramme qui possède une masse de $1781 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ correspondant à une coupure non spécifique de la liaison peptidique DY, du peptide D2 (Con1) PKFPRAMPIWARPD/YNPPLLE. Pour un litre de culture, les rendements en peptide marqué $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ sont de l'ordre de 3 à 5,5 mg selon les préparations.

La mutation I315G a été introduite dans le plasmide pET32a-TrxA-pepD2(Con1) par mutagenèse dirigée. La même méthode a été utilisée pour produire le peptide D2 (Con1) muté en I315G et marqué $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$. Les peptides pepD2(Con1) WT ^{15}N ^{13}C et pepD2(Con1) I315G ^{15}N ^{13}C ont permis de réaliser une analyse structurale et fonctionnelle par RMN du motif structural présent au sein de NS5A-D2 Con1.

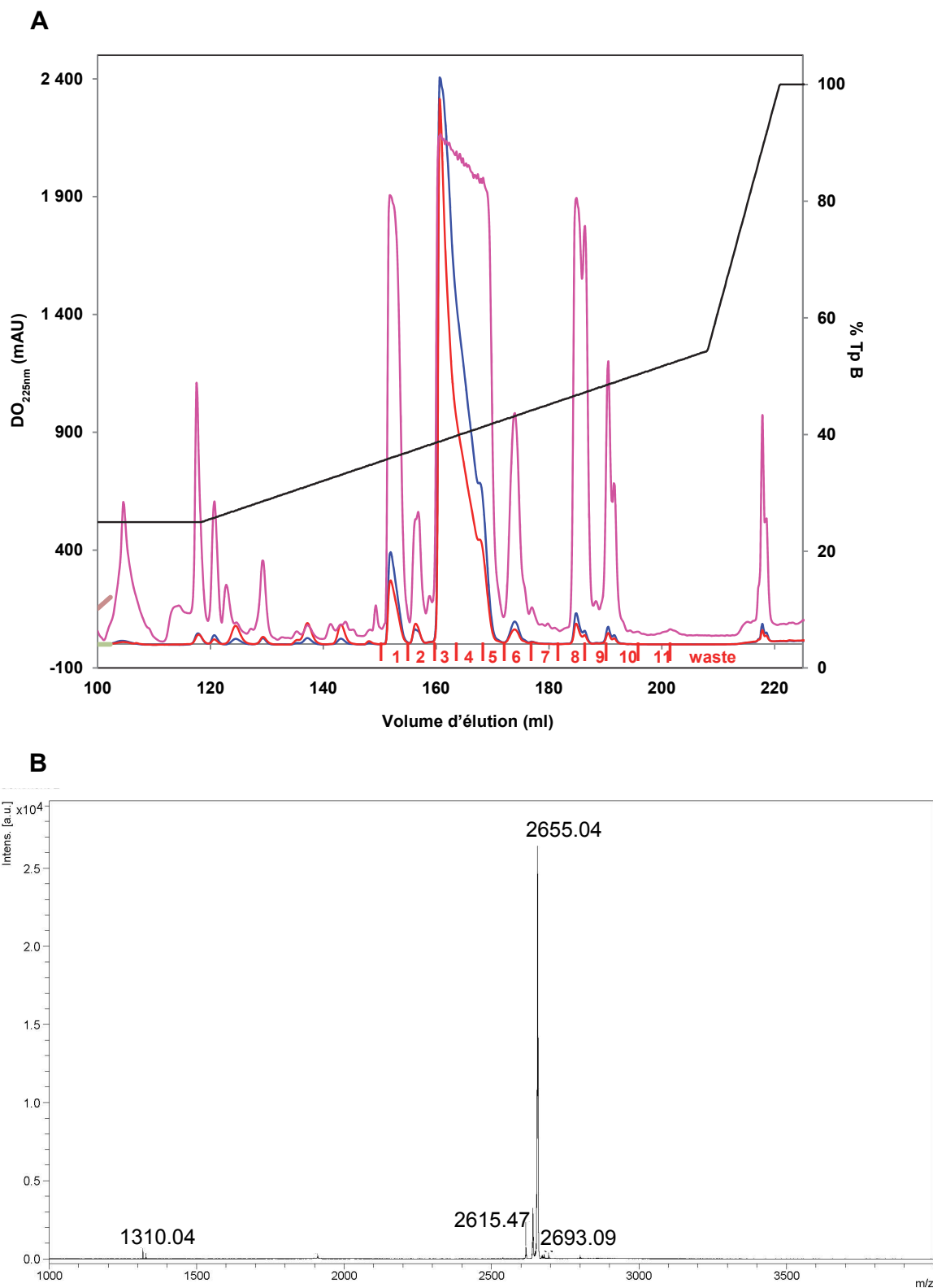


Figure 61. Purification du peptide D2 (Con1) ^{15}N ^{13}C . A, Chromatographie phase inverse du peptide pepD2(Con1) ^{15}N ^{13}C . La chromatographie a été réalisée en phase inverse à l'aide d'une colonne Zorbax 300 SB C18 9,4/250, dans un tampon (0,1 % de TFA, 2% acétonitrile). L'élution a été réalisée par un gradient de 20 % à 80 % de tampon B (0,1 % TFA, 80 % acétonitrile) sur 9 CV. Les courbes correspondent à la mesure de la densité optique (DO) à 225 nm (rose), à 280 nm (bleu) et à 260 nm (rouge). Les numéros des fractions d'élution sont indiqués. B, Spectre de masse MALDI-TOF correspondant aux fractions 3 à 5 du chromatogramme (Figure 61 A).

(LQH111111) qui serviront à purifier les protéines recombinantes par chromatographie d'affinité sur une colonne chargée en nickel (Ni²⁺).

2.1.1.2 Mutagenèse dirigée

Nous avons créé par mutagenèse dirigée les vecteurs d'expression correspondant aux différents mutants de NS5A-D2 (JFH1). La liste des mutants créés est présentée Figure 63.

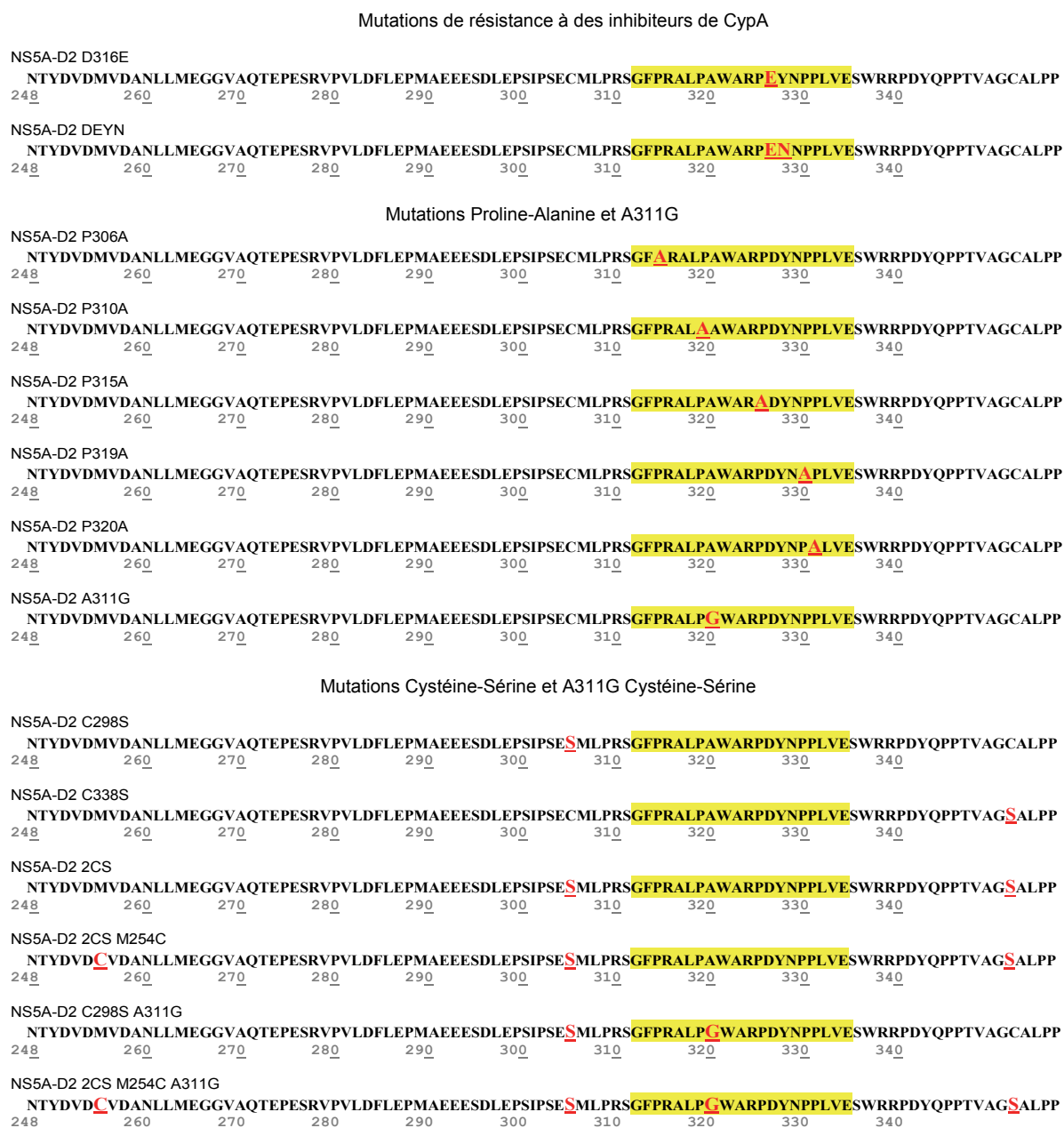


Figure 63. Liste des mutants de NS5A-D2 (JFH1) exprimés chez *E. coli*. La mutation est indiquée en rouge, la région surlignée en jaune correspond au site d'interaction avec la CypA.

2.1.1.3 Expression et purification des domaines recombinants NS5A-D2 JFH1 WT et mutants.

Les domaines recombinants D2 WT et mutants ont été produits chez la souche BL21(DE3) de *E. Coli*. Après transformation de ces bactéries par les vecteurs d'expression, une préculture de 20 ml est effectuée en milieu riche Luria-Bertani (LB) en présence d'ampicilline pendant une nuit afin d'obtenir une préculture à saturation. La préculture est ensuite centrifugée et le culot de bactéries est resuspendu dans un litre de culture en milieu minimum (M9) contenant une unique source d'azote marquée ^{15}N et/ou une unique source de glucose marqué ^{13}C . L'induction de la production de protéines à l'IPTG est réalisée lorsque la culture est en milieu de phase exponentielle de croissance, ce qui correspond à des conditions optimales pour la production de protéines par les bactéries. La bactérie synthétisant ses propres acides aminés à partir d'une unique source d'azote et de carbone, le marquage isotopique de la protéine sera proche de 100%. Les différentes étapes de production sont contrôlées par SDS-PAGE (Figure 64). Le domaine D2 recombinant est bien exprimé dans les cellules *E. coli* BL21(DE3) après induction à 400 μM d'IPTG pendant 4h30. L'analyse par SDS-PAGE des cellules surexprimant NS5A-D2 montre une expression importante d'une protéine migrant comme un témoin de masse moléculaire de 20 kDa, alors que la masse du domaine D2 est de 11600 Da. Cette masse moléculaire en apparence élevée sur SDS-PAGE s'explique par la présence de nombreux résidus de prolines au sein de ce domaine.

Après la lyse des bactéries, NS5A-D2 doit-être purifié. Ce domaine étant thermorésistant, les extraits solubles peuvent être chauffés. Cette première étape de purification permet de précipiter un grand nombre de protéines contaminantes et d'inactiver les protéases issues de *E. Coli*. NS5A-D2 WT et les différents mutants ont été exprimés avec une étiquette poly-histidine permettant de réaliser une purification d'affinité sur colonne chargée en nickel. Le niveau élevé d'expression associé à la première étape de purification par chauffage et aux conditions stringentes de lavage de la chromatographie d'affinité au nickel ont permis d'obtenir un bon rendement et des protéines de puretés élevées nécessaires à leur étude par RMN. L'analyse SDS-PAGE de la chromatographie d'affinité (Figure 64) montre que la majorité des protéines n'ayant pas d'affinité au nickel est passée au travers de la colonne. La phase de lavage a permis d'éliminer les protéines liées à la résine sans perte de la protéine d'intérêt. Enfin, les fractions d'élutions indiquent que NS5A-D2, par compétition avec l'imidazole, s'est décroché des ions nickel.

Les domaines D2 de NS5A WT et mutants JFH1 (non marqués et marqués ^{15}N et/ou ^{13}C) sont donc bien surexprimés sous forme soluble chez *E. Coli* et purifiés avec un rendement de l'ordre

de 20 mg par litre de culture en milieu M9. Le rendement peut augmenter jusqu'à 30 mg pour 1 litre de culture en milieu riche LB. Des résultats similaires ont été obtenus pour NS5A-D2 Con1, avec un rendement légèrement moins important.

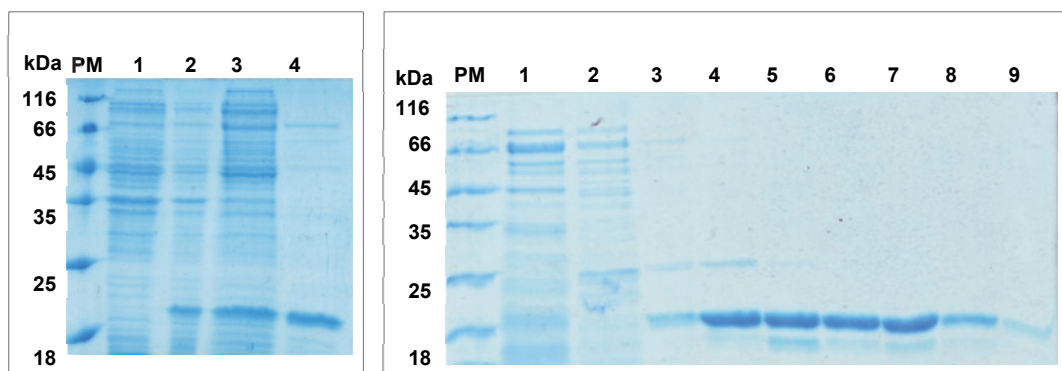


Figure 64. Expression et purification de NS5A-D2 chez *E. coli*. Les protéines sont analysées par SDS-PAGE à 15% et colorées au Bleu de Coomassie. A gauche, Expression de NS5A-D2 et purification par chauffage. Piste 1, cellules *E. coli* non induites; piste 2, cellules *E. coli* 4h30 après induction à l'IPTG ; piste 3, fraction soluble du lysat bactérien (27 000 g, 30 min); piste 4, fraction soluble après chauffage à 75°C. A droite, Purification de NS5A-D2 par chromatographie d'affinité sur colonne chargée en nickel. Piste 1, protéines non retenues par la colonne; piste 2, protéines lavées par 25 mM d'imidazole ; piste 3 à 9, protéines éluées par un gradient d'imidazole de 25 mM à 250 mM.

2.1.2 Clonage, expression et purification des peptides recombinants de NS5A-D2 (JFH1) WT et mutants marqués ¹⁵N ¹³C

Le peptide du domaine D2 de NS5A (JFH1), pepD2-WT (JFH1), correspondant au site d'interaction avec la CypA a été cloné et produit avec le même système de production de peptide recombinant décrit précédemment pour le peptide pepD2(Con1) (partie 1.3 des résultats). Sur le peptide de 20 résidus, 4 diffèrent entre les deux souches JFH1 et Con1 (Figure 65). Les peptides D2 (JFH1) mutés en D316E et A311G ont également été produits avec la même méthode. Ces mutations ont été créées par mutagenèse dirigée sur le vecteur d'expression pET32a-trxA-pepD2(JFH1).



Figure 65. Alignement de séquences des peptides pepD2(Con1) et pepD2(JFH1) correspondant au site d'interaction avec la CypA. Les 5 résidus de prolines sont indiqués en rouge. Les numérotations des résidus sont indiqués, ainsi que les résidus identiques (*) et les résidus différents (:) entre les deux souches.

2.1.3 Expression et purification de la CypA

La CypA (18 kDa) a été clonée sous le contrôle du promoteur P_{T7lac} dans le vecteur pET15b possédant un gène de résistance à l'ampicilline. Cette construction permet l'expression de la CypA possédant une étiquette poly-histidine en N-terminal clivable par la thrombine grâce à la présence du site de coupure LVPR/GS entre la CypA et l'étiquette 6xHis. Pour l'étude de la CypA par RMN nous n'avons pas clivé cette étiquette poly-histidine. Ce clonage a été réalisé précédemment dans notre laboratoire.

La CypA est très bien exprimée de façon soluble chez *E. coli* et purifiée en une seule étape par chromatographie d'affinité sur une colonne chargée en nickel. Pour l'étude nous avons produit de la CypA non marquée et de la CypA marquée ^{15}N , les rendements sont respectivement de l'ordre de 100 mg et 40 mg pour 1 L de culture.

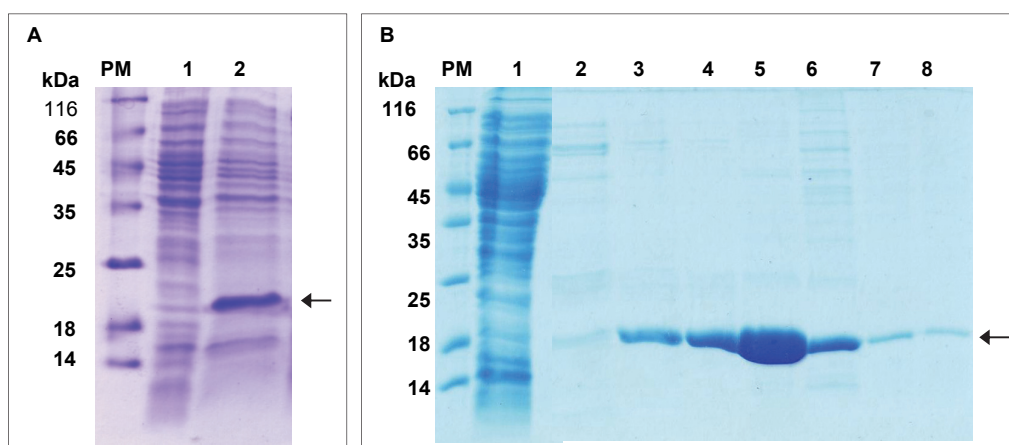


Figure 66. Expression et purification de la CypA ^{15}N . A, Expression de la CypA chez *E. coli*. Piste 1, cellules non induites ; Piste 2 cellules induites à l'IPTG (0.4 mM, 4h30 à 37°C). B, Purification de la CypA par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Piste 1, protéines non retenues par la colonne; piste 2, protéines lavées par 25 mM d'imidazole ; piste 3 à 8, protéines éluées par un gradient d'imidazole de 25 mM à 250 mM.

2.2 Mise en évidence du motif structural au sein de NS5A-D2 (JFH1)

NS5A-D2 est un domaine protéique intrinsèquement désordonné contenant un petit motif structural caractérisé, dans la première partie, à l'aide du peptide pepD2(Con1). Le domaine NS5A-D2 de la souche JFH1 complet nous a permis d'élargir la description structurale du motif.

tendances hélicale dans trois régions, 30% des conformères vont avoir une hélice α dans les régions composées des résidus 250-262 et 295-301, 20% des conformères vont avoir une hélice α dans la région 322-327. Les régions 264-293 et 302-308 ont une conformation étendue ou une tendance à former des brins β . Ce domaine est donc globalement désordonné avec toutefois trois régions qui ont tendance à se structurer en hélices (Figure 68 A). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Feuerstein et al., 2012. Bien que le spectre ^1H - ^{15}N HSQC ainsi que les méthodes CSI et SSP indiquent globalement une absence de structure de NS5A-D2 (JFH1), deux résonances sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC se distinguent par leurs valeurs de déplacements chimiques proton amide particuliers qui ne semblent pas correspondre à une absence de structuration. Il s'agit des résonances des résidus W312 et A313 (Figure 67) qui sont localisés dans le site d'interaction avec la CypA ($^{304}\text{GFPRALPAWARPDYNPPLVE}^{323}$) (Hanouille et al., 2009b).

Les méthodes d'analyse CSI et SSP, vues précédemment, ne mettent pas en évidence les déplacements chimiques inattendus pour les résidus W312 et A313. Deux hypothèses sont alors possibles pour expliquer ces résonances inhabituelles dans le contexte d'une protéine désordonnée :

- La séquence locale en acides aminés induirait ces déplacements chimiques particuliers. Les résidus voisins du W312 et A313 seraient la cause de ces résonances particulières.
- Il y aurait une conformation locale particulière au niveau de ces résidus W312 et A313.

Les déplacements chimiques de NS5A-D2 ont alors été analysés avec la méthode *neighbour corrected Intrinsically Disordered Protein* (ncIDP) (Tamiola et al., 2010) (Figure 68 B, C) qui permet de prédire, à partir de la séquence primaire en acides aminés, pour chacun des résidus, sa valeur de déplacement chimique correspondant à un état non structuré théorique en tenant compte de ses voisins en $i-1$ et $i+1$. Il s'agit de calculer la variation de déplacement chimique ($\Delta\delta$ (ppm)) entre la valeur de déplacement chimique mesurée expérimentalement et la valeur ncIDP prédite. Les écarts élevés par rapport aux prédictions ncIDP sont indicatifs de structuration tandis que des écarts faibles sont indicatifs de régions désordonnées. Nous avons calculé la $\Delta\delta$ (ppm) entre les valeurs expérimentales et ncIDP pour les déplacements chimiques H_N , N (Figure 68 B) avec la formule $\Delta\delta = |\Delta\delta(^1\text{H}_\text{N})| + 0.2 |\Delta\delta(^{15}\text{N})|$, où $\Delta\delta(^1\text{H}_\text{N})$ et $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ représentent la différence entre les déplacements chimiques expérimentaux et ncIDP en $^1\text{H}_\text{N}$ et ^{15}N respectivement. Nous avons également réalisé l'analyse ncIDP pour le déplacement chimique $^{13}\text{C}_\alpha$ (Figure 68 C) avec la formule $\Delta\delta = \delta\text{C}_{\alpha(\text{exp})} - \delta\text{C}_{\alpha(\text{ncIDP})}$. La comparaison des déplacements chimiques expérimentaux H_N , N et C_α par rapport aux prédictions ncIDP met bien en évidence des déplacements chimiques

particuliers pour le W312 et l'A313 qui ne sont pas dus à un effet de séquence mais à une conformation locale au niveau du W312.

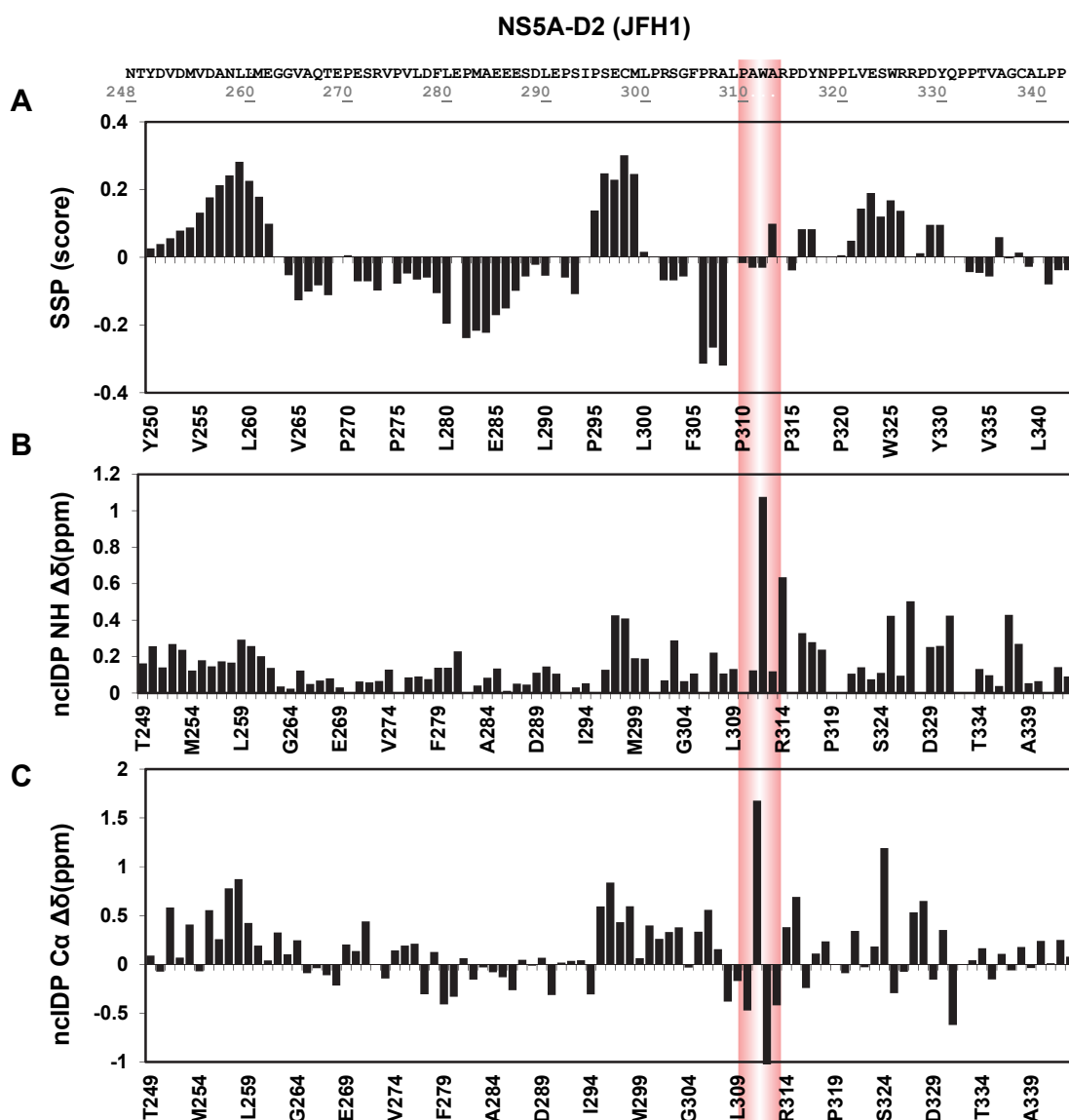


Figure 68. Analyse des déplacements chimiques secondaires de NS5A-D2 (JFH1). A, Propension structurales de NS5A-D2 (JFH1) calculées avec le programme SSP, les valeurs positives et négatives correspondent respectivement à des tendances à adopter une structure hélicale et étendue. B, Ecart entre les déplacements chimiques expérimentaux combiné NH et les valeurs prédites nclDP ($\Delta\delta_{NH}$ (ppm)) réparties le long de la séquence primaire de NS5A-D2 (JFH1). C, Ecart entre les déplacements chimiques expérimentaux Ca et les valeurs prédites nclDP ($\Delta\delta_{Ca}$ (ppm)) réparties le long de la séquence primaire de NS5A-D2 (JFH1).

2.2.2 Analyse de la relaxation

Afin de caractériser la dynamique de NS5A-D2 (JFH1), des expériences de relaxation ^{15}N ont été effectuées.

Le principe de la mesure des constantes de relaxation ^{15}N R1 (relaxation longitudinale) est de créer un état hors équilibre de l'aimantation de l'azote 15 selon l'axe Z et de laisser cet état se relaxer pendant un délai T. On peut alors mesurer la décroissance de l'intensité du pic étudié en faisant varier le délai T. La décroissance de l'intensité (I) en fonction du délai T est une monoexponentielle de la forme :

$$I = I_{(0)}e^{-T(\text{délai}) \cdot R}$$

Avec $I_{(0)}$ l'intensité du pic lorsque le délai T est égal à 0. Les constantes de relaxation R1 et R2 sont extraites à partir de cette équation.

La détermination des constantes de relaxation R1 et R2 est réalisée grâce à des expériences RMN sous forme de pseudo 3D, la troisième dimension correspond aux différents délais T utilisés pour les expériences en deux dimensions ^1H - ^{15}N . Pour chaque résidu, l'intensité est représentée en fonction du délai T ce qui permet d'extraire la constante de relaxation. Plus la valeur de la constante de relaxation est faible plus la protéine est flexible. La vitesse de relaxation transversale R2 est toujours plus rapide ou égale à la vitesse de relaxation longitudinale R1, $R2 \geq R1$. Les différents délais de relaxation, T, que nous avons utilisés sont indiqués dans le tableau suivant :

Expérience	Délai T (ms)
^{15}N R1	10 ; 100 ; 200 ; 400 ; 600 ; 800 ; 1000 ; 1200 ; 1500 ; 2000
^{15}N R2	15.77 ; 189.24 ; 63.08 ; 94.62 ; 157.7 ; 126.16 ; 252.32 ; 31.54 ; 47.31 ; 157.7 ; 78.85 ; 220.78

Figure 69. Délais T (ms) utilisés pour mesurer la relaxation ^{15}N R1 et ^{15}N R2 de NS5A-D2 (JFH1).

Les données RMN ont été traitées avec le logiciel sparky. Un exemple est illustré Figure 70, représentant la décroissance de l'intensité du W312 en fonction du délai T, et permettant de déterminer le paramètre ^{15}N R2.

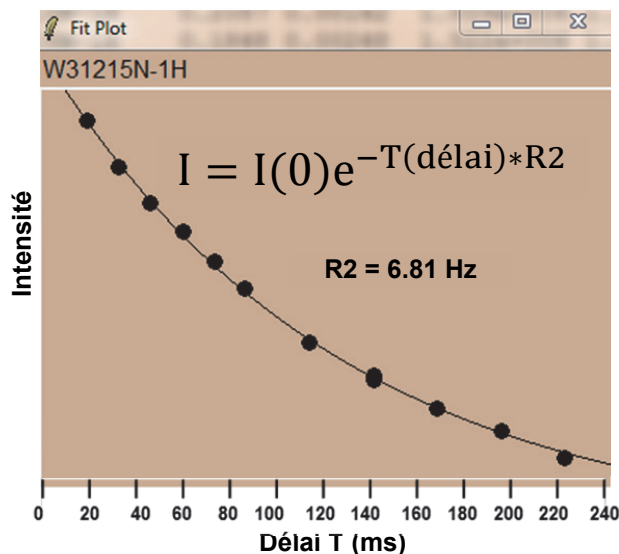


Figure 70. Mesure du taux de relaxation ^{15}N R_2 de la résonance W312 de NS5A-D2 (JFH1) à 600 MHz. Courbe de décroissance de l'intensité de la résonance du W312 en fonction des différents délais T (ms) utilisés (Figure 69) permettant d'extraire le taux de relaxation ^{15}N R_2 .

La mesure du nOe hétéronucléaire ^1H - ^{15}N s'effectue en deux expériences : une expérience de référence et une expérience pendant laquelle les protons amides sont préalablement saturés pendant 4 secondes. Le rapport d'intensité de ces deux expériences permet de déterminer le nOe hétéronucléaire ^1H - ^{15}N . L'effet nOe hétéronucléaire ^1H - ^{15}N correspondant à la liaison amide est théoriquement limité entre des valeurs positives et négatives comprises dans l'intervalle $[0,9; -3,8]$. L'analyse de l'effet nOe le long de la chaîne peptidique donne une estimation qualitative de la dynamique interne de la protéine. Si l'effet nOe est proche de 0,8 le vecteur NH est relativement rigide tandis qu'une valeur de l'effet nOe plus faible indique que ce vecteur est plus mobile. De manière générale pour une protéine désordonnée l'effet nOe hétéronucléaire ^1H - ^{15}N est négatif.

Les constantes de relaxation ^{15}N R_1 , ^{15}N R_2 et l'effet nOe hétéronucléaire ^1H - ^{15}N de NS5A-D2 (JFH1) à 450 μM ont été mesurées à 600 MHz, à 298K (Figure 71).

La ligne de base du paramètre de relaxation longitudinale R_1 est stable et comprise entre 1,2 et 1,6 s^{-1} , avec des valeurs décroissantes jusqu'à 1 s^{-1} aux extrémités N et C terminales. Ces valeurs sont caractéristiques d'un domaine intrinsèquement désordonné avec des extrémités N et C-terminales plus flexibles que le reste du domaine.

La dispersion des R_2 est beaucoup plus importante que pour les R_1 , R_2 varie de 1,8 à 6,8 s^{-1} . La vitesse de relaxation transversale R_2 est sensible aux dynamiques rapide (ps-ns) et intermédiaire (μs -ms). S'il existe une augmentation du paramètre R_2 pour certaines régions de la chaîne peptidique, cela peut correspondre à une conformation plus rigide de cette région (dynamique

rapide ps-ns) et/ou à la présence d'un changement de conformation de la protéine à une vitesse de l'ordre de la μs -ms. Les valeurs de R2 pour les résonances de NS5A-D2 (JFH1) comprises entre environ 1,8 et 4 s^{-1} à 600 MHz sont caractéristiques de protéines intrinsèquement désordonnées. L'augmentation du paramètre R2 dans la région 304-321 (correspondant au site d'interaction avec la CypA) indique une dynamique conformationnelle particulière avec une rigidité plus importante. La valeur du paramètre R2 du W312 est particulièrement élevée, 6,8 s^{-1} . En raison de l'absence de variation de la valeur de R1 dans cette région, ces paramètres de R2 élevés peuvent traduire un phénomène d'échange dans la gamme de temps de la μs -ms. Nous verrons par la suite que des expériences de types CPMG ont été réalisées pour tenter de mettre en évidence ce phénomène d'échange sur une gamme de temps de l'ordre de la μs -ms (paragraphe 2.5.4.5).

Les valeurs de l'effet nOe hétéronucléaires sont comprises entre -1 et 0,33. Il se dégage les mêmes tendances que pour le paramètre R2. Les nOe hétéronucléaires négatifs (région 249-296 et 337 -343) sont indicatifs d'un domaine désordonné. La région 304-321 sort de la tendance et possède un nOe hétéronucléaire positif de 0,24 à 0,33 indiquant une dynamique interne moins importante dans cette région. La région 325-335 possède également des nOe hétéronucléaires positifs, mais le R2 dans cette région est plus faible par rapport à la région 304-321.

Ces résultats indiquent que la région 304-321, correspondant au site d'interaction avec la CypA, semble présenter une dynamique conformationnelle particulière. La rigidité dans cette région est plus importante ce qui est en accord avec les résultats d'analyse de déplacements chimiques secondaires mettant en évidence la présence d'une conformation locale autour du W312.

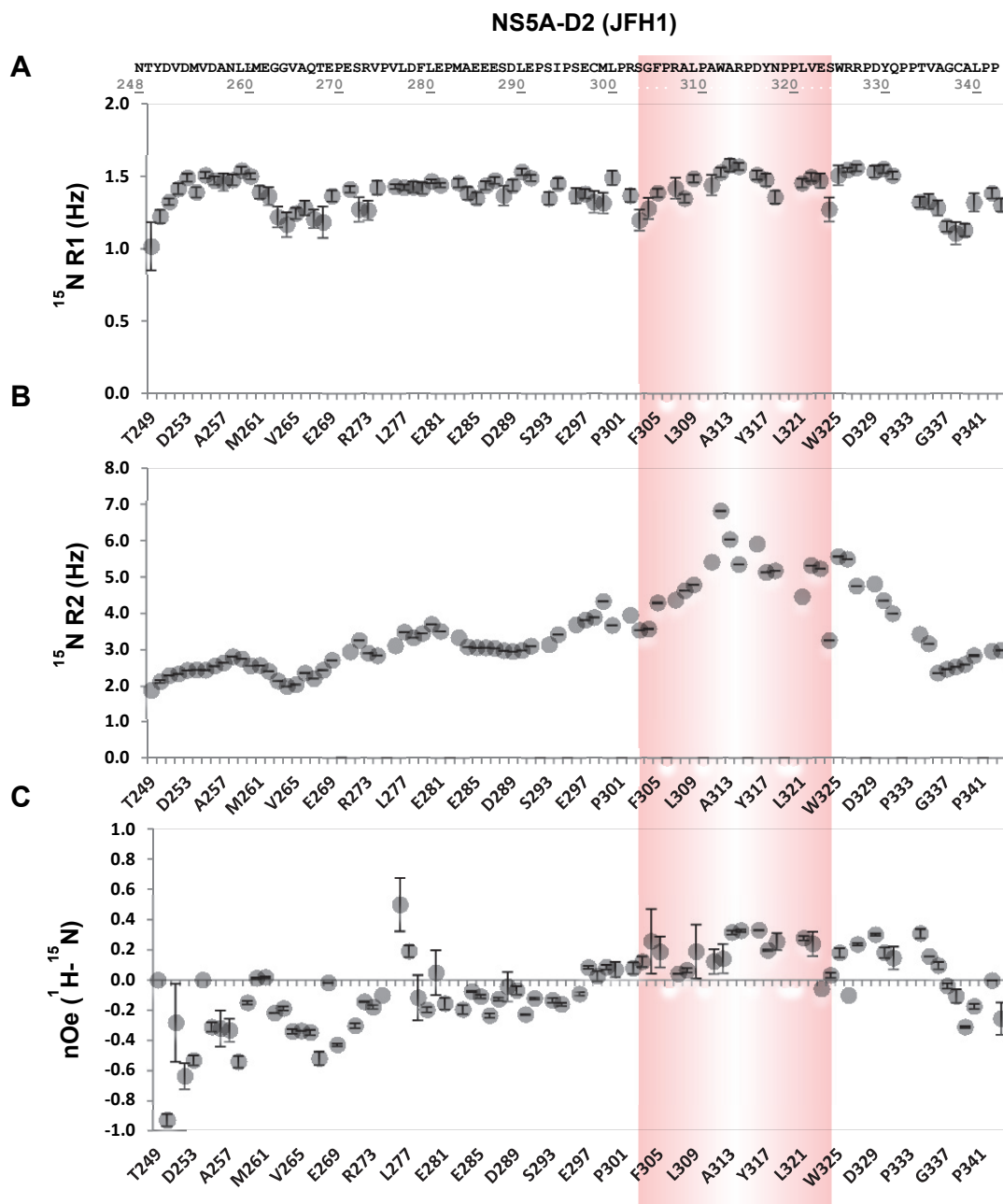


Figure 71. Vitesses de relaxation longitudinale (^{15}N R1) (A), transversale ^{15}N R2 (B), et effet $n\text{Oe}$ hétéronucléaire $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ (C), réparties les long de la séquence de NS5A-D2 (JFH1) à 298K, 600 MHz.

2.2.3 Comparaison des données expérimentales acquises sur NS5A-D2 (JFH1) avec un ensemble de structures respectant les conditions *random coil*

Nous avons utilisé le logiciel FLEXIBLE-MECCANO, développé en 2005 par Bernadó et al., pour comparer nos données expérimentales acquises sur NS5A-D2 (JFH1) par rapport à un ensemble respectant les conditions *random coil*. Ce logiciel permet de créer un ensemble de structures *random coil* en se basant sur la séquence primaire de la protéine en prenant en compte

le volume d'exclusion stérique des acides aminés et une base de données d'angles dièdres (ϕ, ψ) extraite de structures cristallographiques pour lesquelles ont été uniquement conservés les acides aminés ne contenant pas de structures secondaires (Ozenne et al., 2012). Le logiciel calcule alors pour chaque structure plusieurs paramètres RMN dont :

- des couplages dipolaires résiduels (RDC), qui permettent par exemple d'obtenir l'orientation de vecteurs NH les uns par rapport aux autres. Un couplage dipolaire élevé est indicateur de région structurée.
- la relaxation paramagnétique (PRE), qui permet d'obtenir des informations sur les contacts longues distances au sein de protéines désordonnées.
- le couplage scalaire $^3J(H_N H_\alpha)$ qui permet d'obtenir l'angle dièdre ϕ des acides aminés à partir de la relation de Karplus.

Ces paramètres RMN calculés pour chaque structure sont moyennés sur l'ensemble avec le logiciel FLEXIBLE-MECCANO. Un ensemble de 100 000 structures a été généré avec ce logiciel avec pour unique entrée la séquence primaire de NS5A-D2 (JFH1). Les données expérimentales que nous avons obtenues sur NS5A-D2 (JFH1) (Couplages dipolaires résiduels (RDC), PRE, et constantes de couplages $^3J_{HNHA}$) sont comparées avec les paramètres RMN prédits à partir de l'ensemble généré respectant les conditions *random coil*.

2.2.3.1 Analyse des RDC_{NH}

Les couplages dipolaires résiduels donnent des informations sur la structure et la dynamique des protéines (Bax, 2003; Blackledge, 2005 ; Mittermaier and Kay, 2009). Le couplage dipolaire correspond à l'interaction à travers l'espace des moments magnétiques de spins se trouvant dans un champ magnétique. Le signe et la force du couplage dipolaire dépendent de la distance entre les deux spins et de leur orientation relative par rapport au champ magnétique B_0 (Figure 72 A).

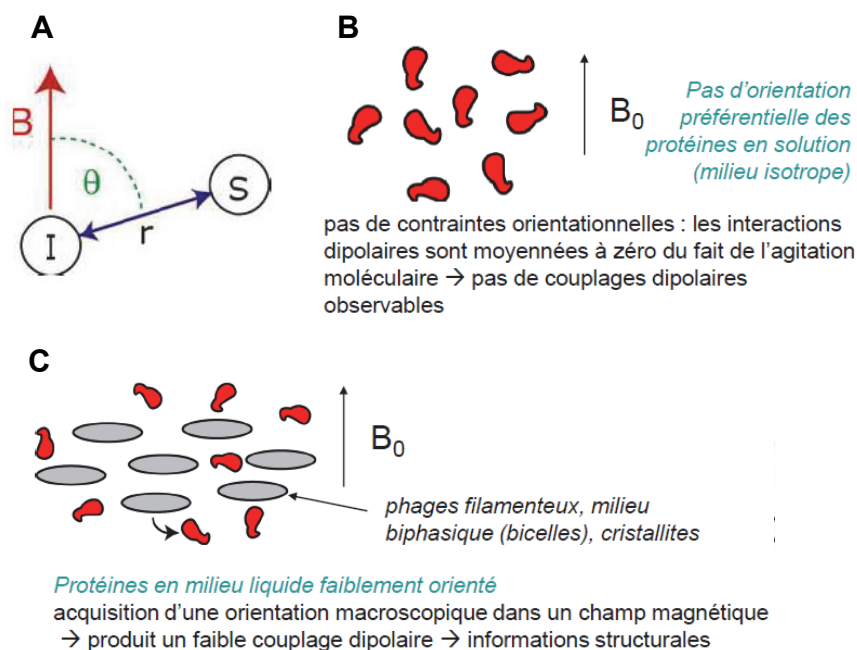


Figure 72. Contraintes orientationnelles pour la mesure des RDC. Figure extraite du cours du Dr. Caroline Smet-NoCCA. A, couplage dipolaire entre deux spins I et S. B, Protéines en milieu isotrope. C, Protéines en milieu anisotrope.

Cependant, en conditions isotropes (Figure 72 B), toutes les orientations des vecteurs internucléaires sont échantillonnées avec des probabilités équivalentes, les couplages dipolaires s'annulent du fait de la diffusion rotationnelle des molécules et l'information structurale est perdue. Si l'échantillon protéique est dissout dans un milieu anisotrope possédant un faible degré d'alignement des molécules par rapport au champ magnétique (Figure 72 C) la distribution orientationnelle des molécules n'est plus uniforme et l'information structurale peut-être obtenue. Les interactions dipolaires, moyennées pendant le temps nécessaire à l'acquisition du signal RMN (quelques centaines de millisecondes), présentent alors une valeur non nulle permettant de mesurer des couplages dipolaires résiduels qui informent sur l'orientation d'un vecteur interatomique par rapport à un système d'axes externes à la molécule, le tenseur d'alignement. Les RDC informent sur l'orientation globale de vecteurs au sein de la molécule, par exemple, pour une protéine structurée qui possède deux domaines, les RDC permettent de déterminer l'orientation relative des deux domaines, il faut pour cela déterminer le tenseur d'alignement et réaliser un affinement des structures. Pour les protéines désordonnées, la présence de couplages dipolaires résiduels révèle la présence de structures résiduelles au sein de la protéine.

Pour obtenir des RDC, il est nécessaire d'ajouter un co-soluté dans l'échantillon permettant d'obtenir un alignement partiel de la molécule étudiée. Diverses procédures d'alignement ont été développées, les plus utilisées actuellement sont les bicelles, les bactériophages Pfl, les particules

de cellulose en forme de bâtonnets, ou encore les mélange PEG/hexanol (Rückert and Otting, 2000). Le choix du milieu orientant varie en fonction de l'échantillon et peut nécessiter d'être ajusté empiriquement.

Nous avons réalisé des mesures de RDC du vecteur NH sur NS5A-D2 (JFH1) ^{15}N . Le choix du milieu orientant a été basé sur les caractéristiques de NS5A-D2 (JFH1). Le point isoélectrique de NS5A-D2 (JFH1) étant de 4,6, la charge globale de NS5A-D2 (JFH1) au pH 6,4 du tampon utilisé en RMN, est positive. Les bactériophages Pfl ayant une charge négative, ce milieu orientant est déconseillé pour l'orientation de NS5A-D2 car il risque d'interagir avec les bactériophages. Au laboratoire, François-Xavier Cantrelle avait déjà une expérience sur le milieu PEG(C_{12}E_5) / hexanol, nous avons donc réalisé des essais d'orientation de NS5A-D2 (JFH1) avec ce milieu qui se sont avérés convaincants. La concentration optimale de PEG(C_{12}E_5)/hexanol a été ajustée (6,6 % de PEG(C_{12}E_5) et 3 % d'hexanol) et l'orientation du milieu a été contrôlée par l'apparition d'un doublet sur le signal du deutérium d'environ 35 Hz.

Les couplages dipolaires résiduels des vecteurs NH de la chaîne polypeptidique de NS5A-D2 (JFH1) ont été mesurés à l'aide d'expériences ^{15}N -IPAP-HSQC (Ottiger and Bax, 1998). La méthode consiste à mesurer le couplage J_{NH} en Hz entre les deux spins N et H, ce couplage se traduit sur le spectre par un dédoublement du pic (Figure 73). Cette mesure est effectuée d'abord sur l'échantillon en milieu isotrope puis sur l'échantillon en milieu anisotrope. La différence de couplage J_{NH} entre le milieu anisotrope et le milieu isotrope permet d'obtenir la valeur du couplage dipolaire résiduel en Hz (Figure 73). La méthode IPAP (*In Phase AntiPhase*), que nous avons utilisée, permet de séparer les composantes du doublet dues au couplage dans deux spectres différents, la valeur du couplage se mesure par la différence de fréquence des pics dans les deux spectres.

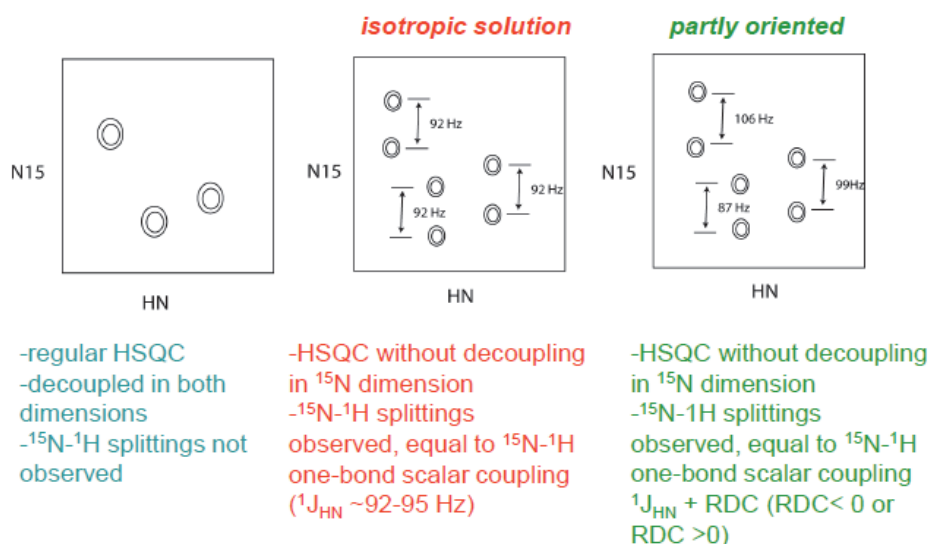


Figure 73. Mesure des RDC. Figure extraite du cours de RMN du Dr. Caroline Smet-Nocca.

La Figure 74 montre les spectres ^{15}N -IPAP-HSQC enregistrés à 298K sur l'échantillon de NS5A-D2 (JFH1) en milieu isotrope et en milieu anisotrope. Ces spectres ont été enregistrés sur le même échantillon ^{15}N NS5A-D2 (JFH1) à 450 μM . Pour enregistrer l'expérience en milieu anisotrope, 6,6 % de PEG(C_{12}E_5) et 3 % d'hexanol ont été ajoutés.

La Figure 75 donne les valeurs de couplages dipolaires résiduels NH mesurées sur ^{15}N NS5A-D2 (JFH1) à partir de la différence de couplage entre le milieu anisotrope et le milieu isotrope en tenant compte du signe négatif du couplage scalaire ^1H - ^{15}N . Excepté pour les prolines, la totalité des couplages dipolaires résiduels a pu être mesurée. En comparant les RDC_{NH} expérimentaux avec ceux prédits à partir de l'ensemble généré par FLEXIBLE-MECANO nous pouvons mettre en évidence une déviation des valeurs de RDC_{NH} expérimentales par rapport à l'ensemble *random coil*, ce qui indique la présence de structuration. Dans la zone d'interaction avec la CypA, centrée sur la région $^{310}\text{PAWA}^{313}$, les RDC_{NH} sont élevés pour une IDP, en particulier pour le W312 qui possède un RDC_{NH} de 33Hz, ce qui confirme la présence d'un motif structural dans cette zone. NS5A-D2 (JFH1) possède deux tryptophanes dans sa séquence primaire, le W312 et le W325, leur couplage dipolaire résiduel NH a également été mesuré pour les chaînes latérales (Figure 74 E, F). Le RDC_{NH} de la chaîne latérale du W312 est beaucoup plus élevé (40 Hz) que celui du W325 (24 Hz), indiquant que le W312 est impliqué dans un motif structural. On peut remarquer que le profil des RDC_{NH} le long de la séquence peptidique est relativement similaire à celui de l'analyse ncIDP (Figure 75 B) et SSP (Figure 68 A). Les RDC légèrement positifs dans les régions 250-262, 295-303 et 322-327 ainsi que les RDC négatifs dans la région 264-293 indiquent des tendances de ces régions à se structurer respectivement en hélices α et en feuillet β .

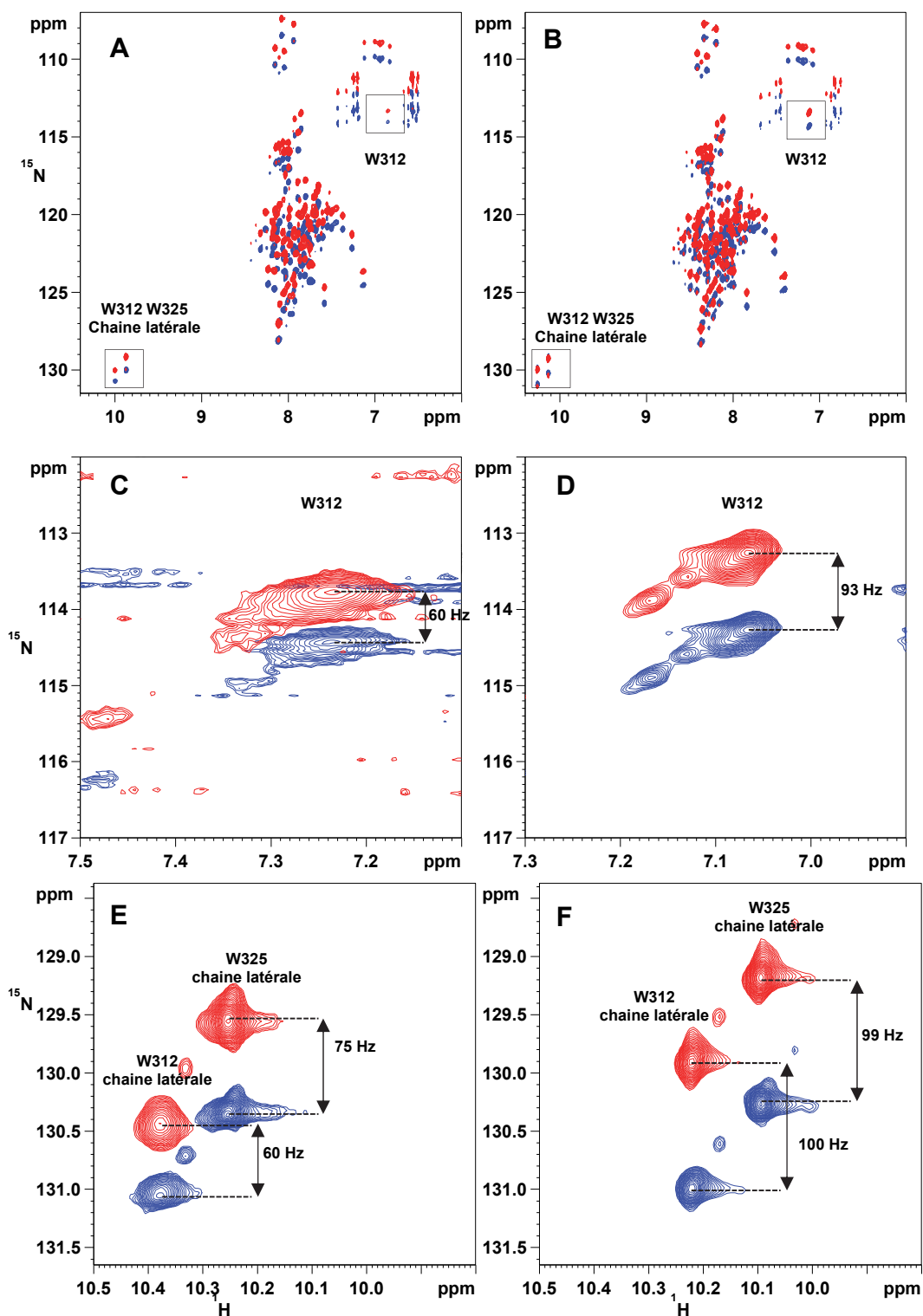


Figure 74. Spectres ^{15}N -IPAP-HSQC de NS5A-D2 (JFH1). Les deux composantes de chaque doublet sont en bleu et rouge. A, C, E, spectres en milieu anisotrope PEG/hexanol, (A) spectres en entier, (C) agrandissement sur la résonance du W312, (E) agrandissement sur les résonances de la chaîne latérale du W312 et du W325. B, D, F, spectres en milieu isotrope, (B) spectres en entier (D) agrandissement sur la résonance du W312, (F) agrandissement sur les résonances de la chaîne latérale du W312 et du W325. Le couplage dipolaire résiduel du résidu W312 est la différence entre l'éclatement des raies dans les spectres ^{15}N -IPAP HSQC en milieu isotrope et en milieu anisotrope ($\text{RDC}_{\text{NH W312}} = 93 - 60 = 33 \text{ Hz}$). De la même manière $\text{RDC}_{\text{NH W312 chaîne latérale}} = 100 - 60 = 40 \text{ Hz}$ et $\text{RDC}_{\text{NH W325 chaîne latérale}} = 99 - 75 = 24 \text{ Hz}$.

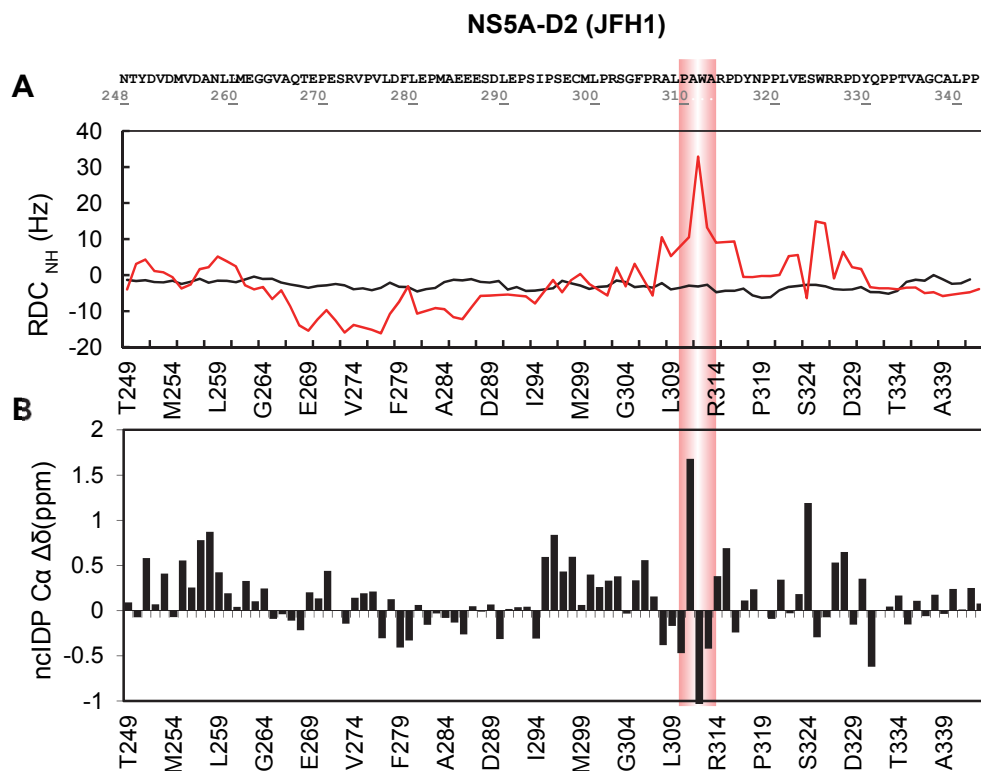


Figure 75. Couplages dipolaires résiduels RDC_{NH} au sein de NS5A-D2 (JFH1). A, Comparaison des RDC_{NH} expérimentaux de NS5A-D2 JFH1 (rouge) par rapport aux valeurs calculées pour l'ensemble *random coil* généré avec FLEXIBLE-MECCANO (noir). B, L'analyse nclDP C_α est réintégrée dans cette figure pour mettre en évidence la présence d'un petit motif structural au niveau de la séquence surlignée en rouge.

2.2.3.2 Analyse des constantes de couplages $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$

Les constantes de couplages $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ ont été mesurées sur NS5A-D2(JFH1) ^{15}N ^{13}C à l'aide de l'expérience tridimensionnelle HNHA (Vuister and Bax, 1993) et comparées avec l'ensemble *random coil* généré par FLEXIBLE-MECCANO (Figure 76). Les couplages scalaires $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ prédits avec FLEXIBLE-MECCANO reproduisent bien les valeurs expérimentales. Contrairement aux autres paramètres RMN utilisés précédemment (déplacements chimiques, relaxation, RDC), les constantes de couplages $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ ne permettent pas de mettre en évidence la présence d'un motif structural autour du résidu W312.

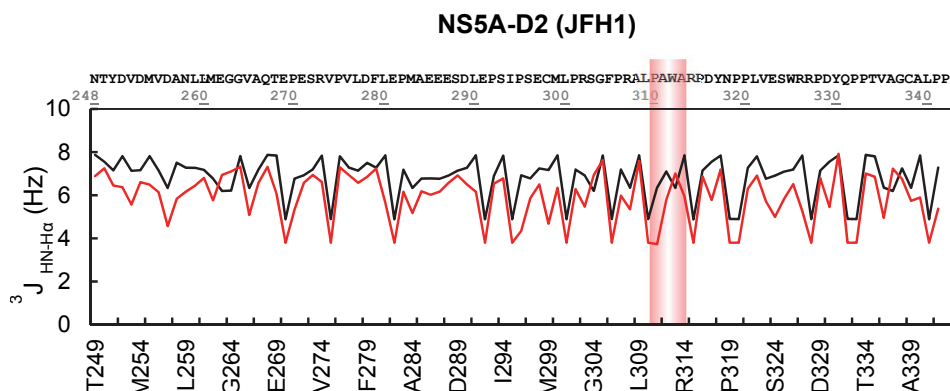


Figure 76. Comparaison des valeurs de couplages scalaires $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ expérimentales (rouge) par rapport aux valeurs calculées pour l'ensemble *random coil* généré avec FLEXIBLE-MECCANO (noir).

2.2.3.3 Analyse de la relaxation paramagnétique PRE

Comme présenté dans l'introduction, la technique PRE permet d'obtenir des informations à longue distance au sein des protéines. La méthode consiste à marquer un résidu par un électron non apparié, cet électron libre augmente la relaxation du signal et donc diminue l'intensité des pics sur l'HSQC. Les contacts transitoires à longue distance au sein d'une protéine désordonnée sont observés grâce à cette diminution d'intensité du signal RMN. La méthode consiste à enregistrer un spectre ^1H - ^{15}N HSQC de l'échantillon de protéines marqué par un électron non apparié (paramagnétique), le spectre ^1H - ^{15}N HSQC du même échantillon réduit à la vitamine C est ensuite enregistré et sert de référence (diamagnétique). En mesurant le rapport d'intensité des spectres paramagnétiques et diamagnétiques (I/I_0) on détecte les interactions longues distances au sein de la protéine.

Pour cette technique, nous avons utilisé une molécule de 3-(2-Iodoacetamido)-proxyl (Figure 77), possédant un électron libre non apparié, et permettant de marquer les résidus de cystéines. NS5A-D2 WT (JFH1) possède deux cystéines en position 338 et 298. Nous avons créé par mutagenèse dirigée trois mutants de NS5A-D2 (JFH1) ne possédant qu'une seule cystéine répartie le long de la séquence de NS5A-D2 : NS5A-D2 2CS M254C, NS5A-D2 C338S, NS5A-D2 C298S. Les cystéines de ces mutants ont été marquées avec la molécule proxyl.

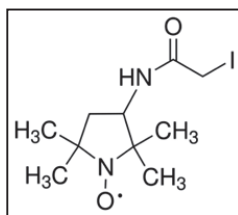


Figure 77. Formule chimique du 3-(2-Iodoacetamido)-proxyl

La relaxation paramagnétique des trois mutants cystéines de NS5A-D2 (JFH1) est présentée Figure 78. Les valeurs expérimentales de PRE sont déviées par rapport aux PRE calculées avec FLEXIBLE-MECCANO indiquant des contacts longues distances au sein de NS5A-D2 (JFH1). Une cystéine marquée au nitroxyde en position 254 affecte la région 304 à 322 correspondant à la région du petit motif structural. Un nitroxyde placé en position 338 a un effet sur la région du 304-320 et également sur la région 280-288 possédant une tendance à se former en hélice. Le nitroxyde placé en position 298 semble trop près du motif structural pour mettre en évidence un contact longue distance avec cette région. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Feuerstein et al., (2012). Ils ont étudié la relaxation paramagnétique d'un fragment de NS5A (souche HC-J4 du génotype 1b), le domaine 2 incluant les séquences LCS1 et LCS2 (191-369), un marquage de cystéine en N- ou C-terminal (position 243 ou 342) affecte la région 311-326 qui est la région équivalente à 306-321 dans la souche JFH1.

Toutes ces analyses (déplacements chimiques, RDC, PRE, relaxation R2 et nOe hétéronucléaires) ont permis de montrer que NS5A-D2 (JFH1) est une IDP possédant une conformation et une dynamique particulière au niveau du site d'interaction avec la CypA. L'ensemble généré avec le logiciel FLEXIBLE-MECCANO a permis de mettre en évidence une déviation de nos données expérimentales par rapport à un ensemble de structures respectant les conditions *random coil*.

Ces données expérimentales pourraient être utilisées ultérieurement afin de sélectionner un ensemble de conformères à l'aide d'algorithmes de sélections tels que ASTEROID (*A Selection Tool for Ensemble Representations of Intrinsically Disordered States*) (Jensen et al., 2010) et ENSEMBLE (Krzeminski et al., 2013) qui permettraient de décrire au mieux les conformations de NS5A-D2 en solution. En attendant, nous avons utilisé un modèle peptidique afin de décrire le motif structural dans NS5A-D2 (JFH1), de la même manière que ce que nous avons fait précédemment pour NS5A-D2 (Con1).

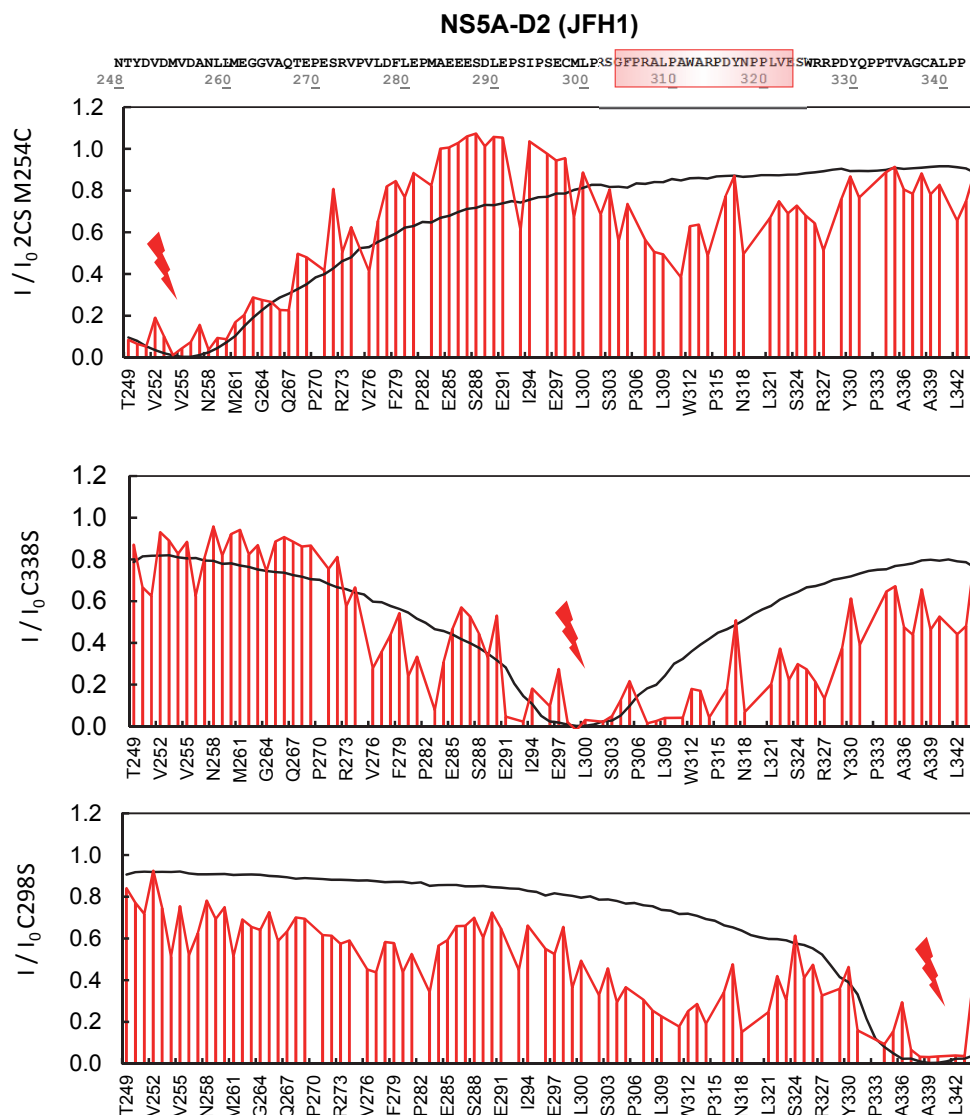


Figure 78. Relaxation paramagnétique des mutants de NS5A-D2 (JFH1) marqués par une molécule de proxyl. Les spectres paramagnétiques et diamagnétiques ^1H - ^{15}N HSQC, de NS5A-D2 (100 μM) marqué par une molécule de proxyl, sont enregistrés strictement dans les mêmes conditions, mis à part l'ajout de 4,8 mM de vitamine C pour l'enregistrement du spectre diamagnétique. Le rapport d'intensité des résonances du spectre ^1H - ^{15}N HSQC paramagnétique (I) et diamagnétique (I_0) est tracé en fonction de la séquence primaire du domaine 2 de NS5A. De haut en bas : NS5A-D2 2CS M254C ; NS5A-D2 C338S et NS5A-D2 C298S. Pour chaque mutant, la position de la cystéine marquée au proxyl est indiquée par une flèche rouge. Les valeurs expérimentales (rouge) sont comparées aux valeurs calculées pour l'ensemble *random coil* généré avec FLEXIBLE-MECCANO (noir).

2.3 Etude du motif structural dans NS5A-D2 (JFH1) à l'aide d'un modèle peptidique

2.3.1 Le peptide de NS5A-D2(JFH1) est un bon modèle pour une étude structurale

Afin de caractériser cette région particulière au sein de NS5A-D2 (JFH1) comprenant le W312 et l'A313 nous avons utilisé un peptide de 20 résidus (région G304-E323 de NS5A-D2 JFH1) non marqué produit par synthèse chimique par la société GenCust, et le même peptide marqué ^{15}N / ^{13}C que nous avons produit de manière recombinante chez *E. Coli*. Les spectres ^1H - ^{15}N HSQC des peptides non marqués et marqués se superposent avec la région correspondante sur le spectre du domaine 2 de NS5A (JFH1) entier (Figure 79). Ce peptide est donc un bon modèle pour une étude structurale.

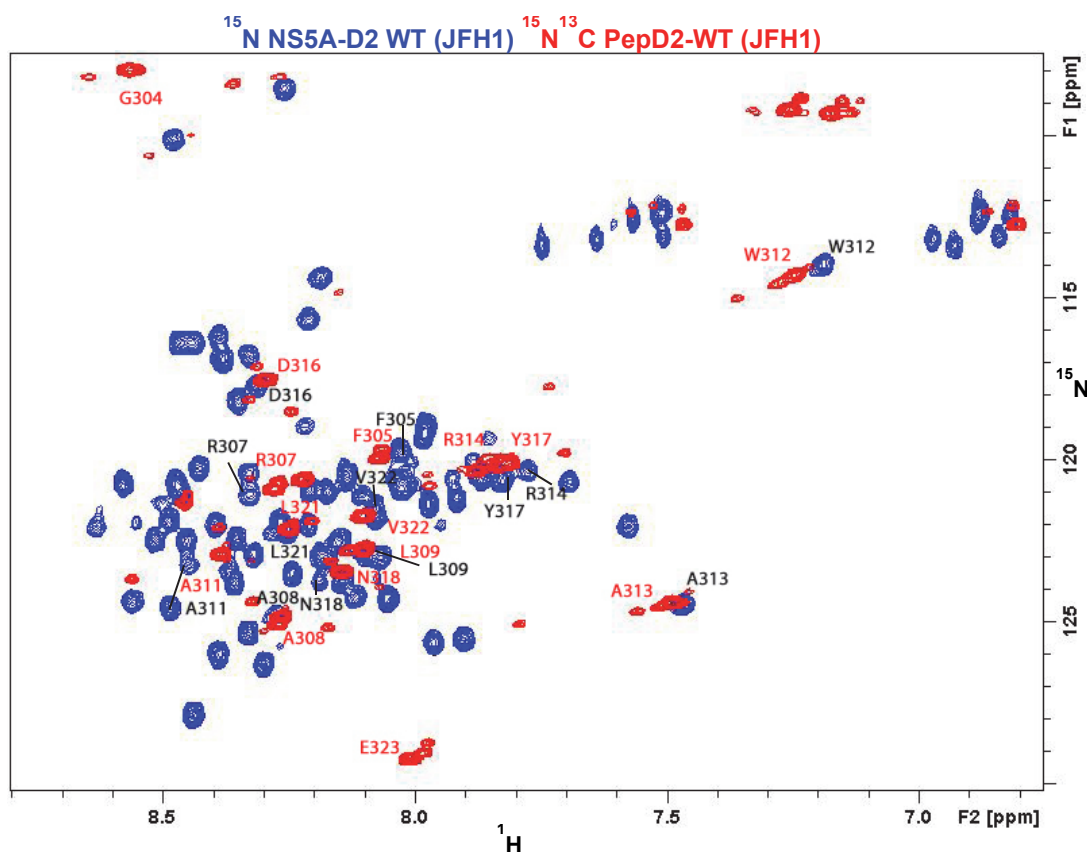


Figure 79. Comparaison par RMN de NS5A-D2 WT (JFH1) et pepD2-WT (JFH1). Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC à 600 MHz de NS5A-D2 WT (JFH1) (bleu) et du peptide pepD2-WT (JFH1) ^{15}N / ^{13}C (rouge). L'attribution des résonances de NS5A-D2 et de pepD2 sont en noir et rouge respectivement. Excepté pour les résidus N- et C-terminaux (G304 et E323) les résonances du peptide se superposent aux résonances correspondantes dans le domaine entier NS5A-D2 (JFH1).

2.3.2 Calcul de la structure du motif au sein de NS5A-D2 (JFH1)

Des expériences RMN homo- et hétéronucléaires (^1H - ^{15}N HSQC, 3D HNCACB, 3D HN(CO)CACB, 3D HNCO, 3D HNHA, ^1H - ^1H TOCSY et ^1H - ^1H NOESY) enregistrées sur le pepD2-WT (JFH1) marqué ^{15}N ^{13}C et non marqué nous ont permis de mesurer différents paramètres tels que les déplacements chimiques du squelette peptidique ^1H , ^{15}N , ^{13}C et des contacts NOE. Ces paramètres ont été utilisés dans un protocole de modélisation sous contraintes expérimentales. Des spectres ^1H - ^1H TOCSY et ^1H - ^1H NOESY (avec un temps de mélange de 400 ms) ont été enregistrés à 298 K, 600 MHz, sur le peptide non marqué. Les pics NOE ont été utilisés comme contraintes de distances et ont été divisés en 3 catégories (1,8 Å - 2,8 Å ; 1,8 Å - 3.9 Å ; 1,8- 5 Å) en fonction de leur intensité. Les angles diédraux calculés avec le logiciel Talos (Cornilescu et al., 1999) à partir des déplacements chimiques ^1H , ^{15}N ^{13}C ont également été utilisés dans le protocole de modélisation sous contraintes expérimentales. Le calcul de la structure tridimensionnelle du peptide pepD2-WT (JFH1) a été réalisé avec le logiciel CNS (*Crystallography and NMR system*) (Brünger et al., 1998). 100 structures ont été calculées avec le protocole *simulated annealing*. A partir du set de 100 structures initiales remplissant les conditions de contraintes expérimentales, une sélection a été effectuée avec ces critères d'acceptations : aucune violation des contraintes de distance supérieure à 0,5 Å et au maximum 5 violations d'angle diédraux de moins de 5 °. Cette sélection a conduit à l'acceptation de 97 structures. A partir de cet ensemble, les 23 structures de plus basse énergie ont été retenues. Les statistiques structurales de ces deux ensembles sont indiquées Figure 80. L'ensemble de 23 structures de plus basse énergie est représenté Figure 81 A. Une structure moyenne a été calculée à partir de ces 23 structures et est représentée Figure 82 A. Cette structure moyenne met en évidence le même *PW-turn* identifié au sein de NS5A-D2 Con1 (première partie), caractérisé par un contact hydrophobe entre la chaîne latérale du tryptophane W312 et la proline P310. Le motif structural $^{310}\text{PAWA}^{313}$ identifié au sein de NS5A-D2 (JFH1) est identique au motif structural $^{314}\text{PIWA}^{317}$ identifié au sein de NS5A-D2 (Con1).

NS5A-D2 (304-323)		
Restrains used		
Distance restraints		
Intra-residu		0
Sequential		73
Medium range		16
Long range		11
Dihedral angle constraints		
Φ angles		14
Ψ angles		14
Statistics for the CNS accepted structures		
Number of accepted structures		97
CNS energy (kcal.mol-1)		421 ± 27
NOE violations		
Number > 0.5 Å		0
R.m.s.deviation (Å)		0.081 ± 0.0008
Dihedral angle violation		
Number > 5°		≤ 1
R.m.s.deviation (deg)		1.96 ± 0.566
R.m.s. deviation (Å)		
Backbone (C',Cα, N)	Residues 310-313	0.03
	Residues 310-320	1.53
	All residues	4.47
Statistics for the 23 lowest energy final CNS structures		
Number of structures in the final set		23
CNS energy (kcal.mol-1)		392 ± 4.18
NOE violations		
Number > 0.5 Å		0
R.m.s.deviation (Å)		0.080 ± 0.0005
Dihedral angle violation		
Number > 5°		≤ 1
R.m.s.deviation (deg)		1.57 ± 0.040
R.m.s. deviation (Å)		
Backbone (C',Cα, N)	Residues 310-313	0.01
	Residues 310-320	1.07
	All residues	4.26

Figure 80. Statistiques structurales pour les 97 structures acceptées et les 23 structures de plus basses énergies du peptide pepD2-WT (JFH1) calculées avec le logiciel CNS.

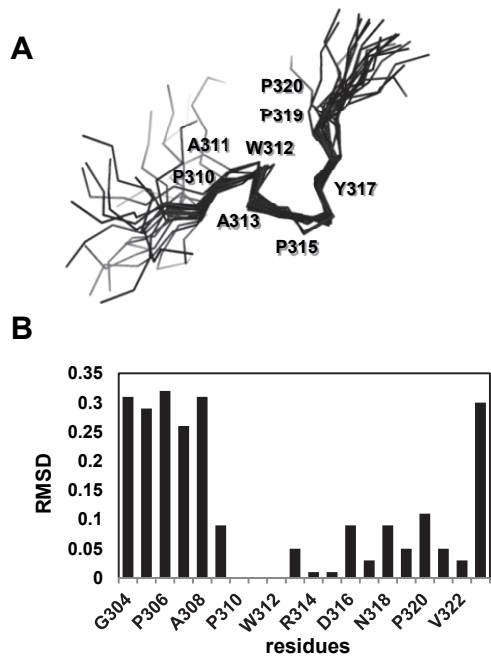


Figure 81. Ensemble des 23 structures de plus basse énergie du peptide de NS5A-D2 (304-323). A, Superposition sur les atomes C α des 23 structures de plus basse énergie entre les résidus 310 à 320. B, RMSD calculé sur les atomes N, C α , CO, de chaque résidu des 23 structures de plus basse énergie de pepD2-WT (JFH1).

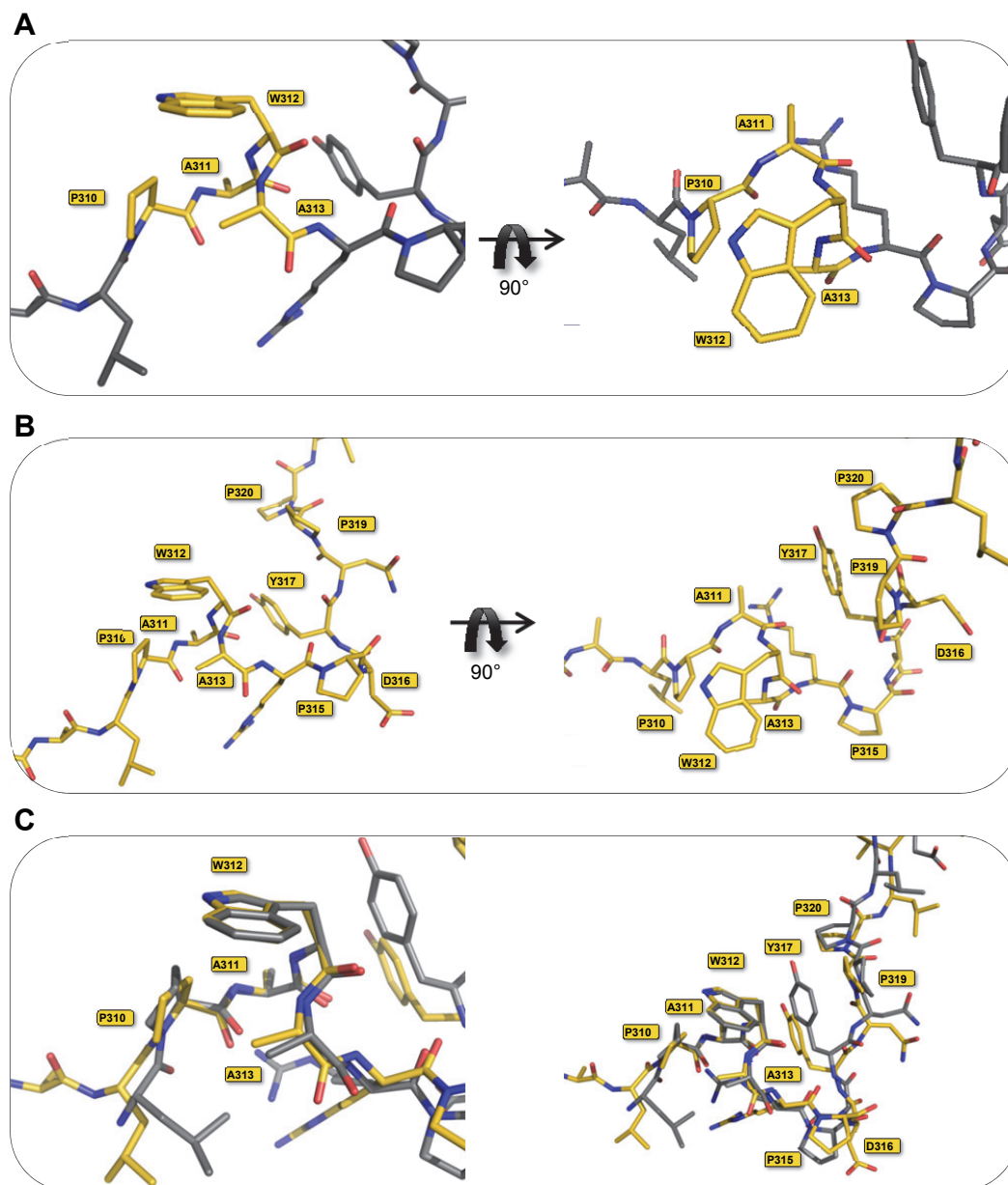


Figure 82. Motif structural au sein de NS5A-D2 (JFH1). A, Structure du PW-*turn*, les résidus $^{310}\text{PAWA}^{313}$ sont en jaune, le reste du peptide est en gris. Le motif structural est caractérisé par un contact hydrophobe entre la chaîne latérale du W312 et la proline P310, la chaîne latérale du résidu A311 est orientée vers l'extérieur du PW-*turn*. B, Le motif structural s'étend plus loin jusqu'au résidu P320, caractérisé par un *stacking* entre le C_β du W312, et la chaîne latérale Y317, la P319, et la P320. C, Superposition du motif structural au sein de NS5A-D2 caractérisé par RMN (en jaune) avec la structure du peptide de NS5A-D2 obtenue par cristallographie en interaction avec MOBKL1B (en gris) (code PDB : 4JIV). Le peptide L309-E323 de NS5A-D2 de cette structure cristallographique (en gris) est superposé ici aux résidus P310-A313 de la structure obtenue par RMN (en jaune). Sur le panneau de gauche, on remarque que les deux structures adoptent le même PW-*turn*, sur le panneau de droite on remarque que les deux peptides ont presque la même conformation caractérisé par un *stacking* entre le C_β du W312, la chaîne latérale de la tyrosine Y317, la proline P319 et la proline P320.

Dans la première partie nous nous sommes focalisés sur la description du motif structural autour des résidus $^{314}\text{PIWA}^{317}$, alors que dans cette deuxième partie, nous avons obtenu différentes données sur le domaine entier NS5A-D2 (JFH1) indiquant que le motif structural n'est pas limité

au PW-*turn* mais qu'il s'étend plus loin dans la séquence. En effet, les données de relaxation ^{15}N , ainsi que les contacts longues distances au sein de NS5A-D2 (JFH1) (parties 2.2.2 et 2.2.3) indiquent que la zone 306-320 n'est pas en conformation *random coil*. Comme nous le verrons dans la partie suivante 2.5.3, nous avons également d'autres indices indiquant que le motif s'étend plus loin dans la séquence, jusqu'au résidu P320, probablement dans une conformation de type polyproline. Les structures polyprolines ne sont pas nécessairement constituées de résidus de prolines mais ce type de structure est très courant dans des séquences riches en proline, caractéristiques des IDPs. Sur les spectres ^1H - ^1H NOESY de pepD2-WT (JFH1), outre des contacts NOE entre les résidus $^{310}\text{PAWA}^{313}$, des contacts NOE ont également été identifiés entre le tryptophane W312 et la chaîne latérale de la tyrosine Y317, et entre la tyrosine Y317 et les prolines P319 et P320 (W312-H α /Y317-H ϵ ; W312-H α /Y317-H δ ; W312-H β /Y317-H δ ; Y317-H δ /P319-H δ ; Y317-H δ /P319-H δ ; Y317-H ϵ /P319-H β ; P319-H α /P320-H α). La structure moyenne (Figure 82B) ainsi que l'ensemble des 23 structures finales (Figure 81) de pepD2(JFH1) montrent un *stacking* entre le C β du W312, la chaîne latérale Y317 et les prolines P319 et P320. Le RMSD, calculé sur les 23 structures RMN de plus basse énergie sur les atomes N, C α et CO, est plus faible dans la zone 310-322 (Figure 81B). Récemment Chung et al., (2014) ont obtenu la structure cristallographique du peptide NS5A-D2 (309-323) de la souche JC1 (génotype 2a) en interaction avec une protéine de la cellule hôte MOBKL1B. Bien que cette interaction ne soit pas fonctionnelle *in vivo*, la structure cristallographique du peptide de NS5A-D2 obtenue met en évidence un *stacking* entre le carbone β du W312, la chaîne latérale de Y317, et le résidu P319. Les résidus 310-313 du peptide NS5A-D2 de la structure cristallographique adoptent le même PW-*turn* que celui que nous avons identifié par RMN, et les résidus 310-320 adoptent presque la même conformation que celle que nous avons identifiée par RMN (Figure 82 C). Le RMSD sur les atomes N, C α , et Co entre ces deux structures est de 0,23 Å et 0,65 Å pour l'alignement sur les résidus 310-313 et 310-320 respectivement indiquant une bonne convergence des structures. Ces résultats indiquent que le motif structural au sein de NS5A-D2 s'étend du résidu P310 au résidu P320 et adopte une conformation caractérisée par un *stacking* entre le C β du W312, la chaînes latérale de Y317 et les résidus de prolines P319 et P320.

2.4 Etude de la mutation A311G

Comme détaillé dans la première partie, nous avons pu observer une certaine variabilité en position $i+1$ de la proline du PW-*turn*. Les résidus I, V, P, et A sont retrouvés parmi tous les génotypes du VHC (Figure 54 partie 1). Les recherches effectuées dans la PDB ont permis de

montrer que la présence du motif structural est potentiellement compatible avec les résidus IVPA (partie 1 et Figure 83), suggérant que le motif structural est conservé parmi tous les génotypes du VHC. Dans cette deuxième partie de résultats, nous avons caractérisé le motif structural au sein de NS5A-D2 (JFH1). Dans cette souche, il existe justement une variabilité en position $i+1$ de la proline du *PW-turn*, une alanine est présente dans la souche JFH1 au lieu d'une isoleucine dans la souche Con1. Nos résultats confirment que la variabilité à cette position est compatible avec la présence du motif structural. Le motif structural *PW-turn* identifié au sein de NS5A-D2 a donc pu être caractérisé par RMN en solution dans la souche Con1 et JFH1, il est identique dans ces deux souches.

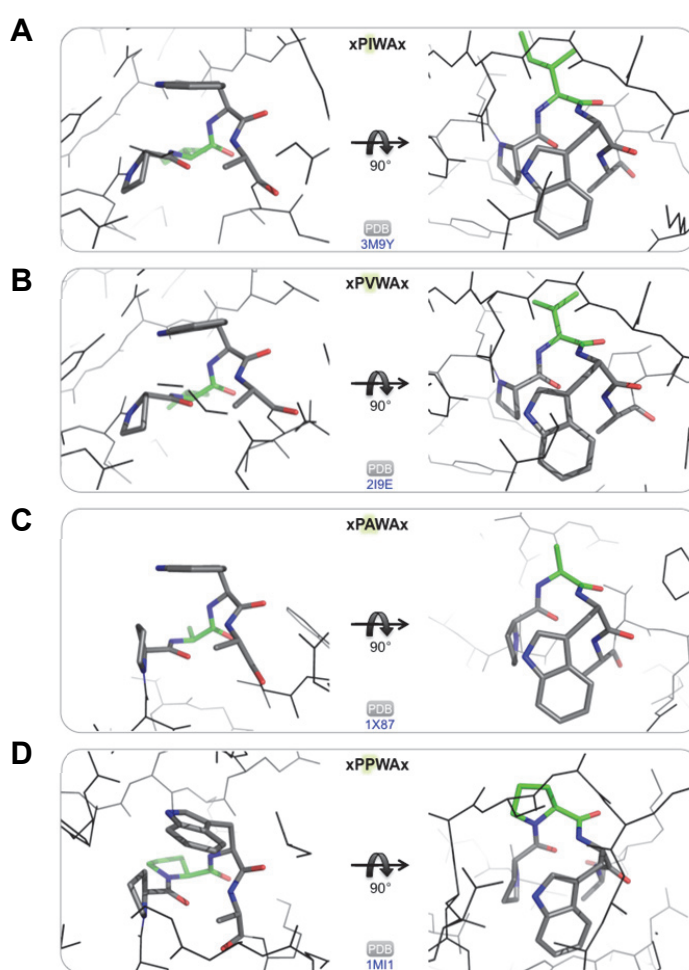


Figure 83. Le motif structural 310-PAWA-313 identifié au sein de NS5A-D2 (JFH1) est retrouvé dans d'autres protéines de la PDB et est compatible avec la présence des résidus Ile, Val, Ala et Pro qui sont trouvés en position 311 dans les différents génotypes du VHC (Figure 54, partie 1). (A) 3M9Y : triosephosphate isomerase de *Staphylococcus aureus*. (B) 2I9E : Triosephosphate isomerase de *Tenebrio molitor*. (C) 1X87 : Urocanase de *Geobacillus stearothermophilus*. (D) 1ML1 : triosephosphate isomerase de *Trypanosoma brucei*.

Par analogie avec ce que nous avons fait dans la souche Con1 (partie 1, article), nous avons généré le mutant A311G au sein de NS5A-D2 de la souche JFH1, et au sein du peptide pepD2(JFH1). Sur les spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 A311G (JFH1) et de pepD2-A311G (JFH1), les résonances correspondant aux résidus W312 et A313 ont des déplacements chimiques caractéristiques d'une protéine désordonnée (Figure 84). Sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 A311G, les résonances NH de la chaîne latérale du W312 se superposent avec celles du W325 (Figure 84 B), indiquant que le W312 est en conformation *random coil*. Les déplacements chimiques ^{13}C du W312 de ce mutant sont également proches des valeurs *random coil* (Figure 118 et Figure 119). En conclusion, comme pour la mutation I315G de NS5A-D2 (Con1), la mutation A311G au sein de NS5A-D2 (JFH1) casse le motif structural. La simple suppression d'un groupement méthyle en position 311 est suffisante pour perturber drastiquement le motif structural au sein de NS5A-D2 (JFH1).

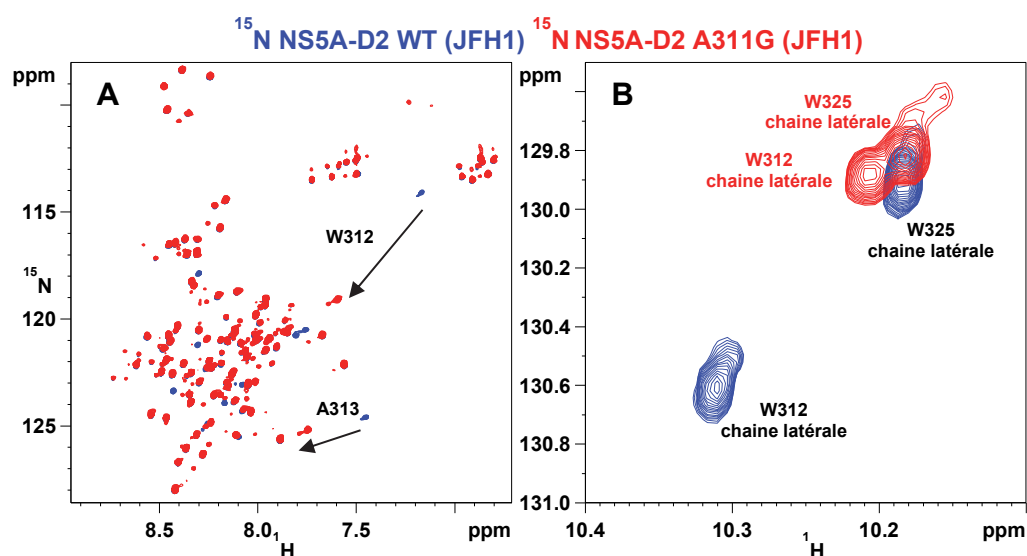


Figure 84. Comparaison des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT et de NS5A-D2 A311G (600 MHz, 298 K, 450 μM). Superposition du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) avec celui de NS5A-D2 A311G (rouge). A, spectres entiers montrant la perturbation de déplacement chimique des résonances du W312 et A313 vers des valeurs *random coil* en présence de la mutation A311G. B, Agrandissement sur les résonances des chaînes latérales du W312 et du W325. En présence de la mutation A311G, les résonances des chaînes latérales du W312 et W325 ont presque les mêmes déplacements chimiques indiquant que le W312 est en conformation *random coil*.

Afin de savoir si des contacts longues distances existent toujours au sein de NS5A-D2 (JFH1) en l'absence de motif structural, nous avons réalisé des expériences PRE sur des mutants CS de NS5A-D2 (JFH1) également mutés en A311G : NS5A-D2 C298S A311G et NS5A-D2 2CS M254C A311G. Le profil d'intensité I/Io en présence de la mutation A311G est similaire à celui

obtenu sans cette mutation, avec toutefois des valeurs I/I_0 légèrement supérieures en présence de la mutation A311G (Figure 85). Ces résultats ne sont toutefois pas assez significatifs pour mettre en évidence que l'absence de motif structural au sein de NS5A-D2 A311G abolit les contacts longues distances au sein de ce domaine. La mutation A311G qui casse le *PW-turn* va nous permettre par la suite d'évaluer l'importance fonctionnelle de celui-ci au sein de NS5A-D2 (JFH1).

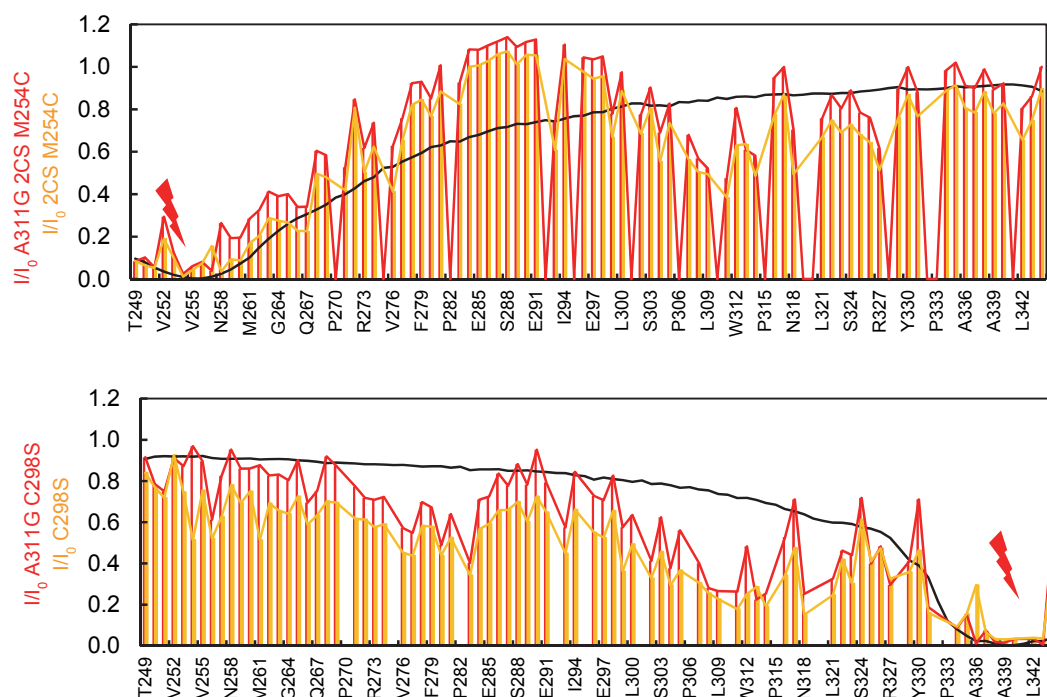


Figure 85. Comparaison de la relaxation paramagnétique de NS5A-D2 (JFH1) muté en A311G et non muté en A311G marqués par une molécule de proxyl. En haut : Superposition des profils de relaxation paramagnétique de NS5A-D2 A311G 2CS M254C (rouge) et NS5A-D2 2CS M254C (orange) ; En bas, Superposition des profils de relaxation paramagnétique de NS5A-D2 A311G C298S (rouge) et NS5A-D2 C298S (orange). Le rapport d'intensité des résonances du spectre ^1H - ^{15}N HSQC paramagnétique (I) et diamagnétique (I_0) est tracé en fonction de la séquence primaire du domaine 2 de NS5A. Pour chaque mutant, la position de la cystéine marquée au proxyl est indiquée par une flèche rouge. Les valeurs expérimentales (rouge et orange) sont comparées aux valeurs calculées pour l'ensemble *random coil* généré avec FLEXIBLE-MECCANO (noir).

2.5 Etude des formes minoritaires du W312

2.5.1 Formes minoritaires du W312 sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC

Le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 (JFH1) possède de nombreuses formes minoritaires (Figure 86) dues aux nombreux résidus de prolines dans le domaine (15 au total, sur un fragment de 94 résidus) qui peuvent exister en conformation *cis* ou *trans*. Les résidus situés à proximité de

prolines en équilibre *cis/trans* ressentent cet équilibre et donnent donc 2 signaux différents dans le spectre ^1H - ^{15}N HSQC, un pic majoritaire (d'intensité plus importante) correspondant à la conformation *trans* et un pic minoritaire (d'intensité moins importante) correspondant à la conformation *cis* de la proline. Comme l'interconversion des isomères *cis* et *trans* des prolines est relativement lente sur l'échelle de temps de le RMN (de l'ordre de la minute), il est possible d'observer les deux conformations sur le spectre. Certaines de ces formes minoritaires sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 (JFH1) ont pu être attribuées à l'aide d'expériences d'attributions tridimensionnelles HNCACB et HNCOCACB, en mesurant le déplacement chimique C_β de la proline qui est en *i-1*. Si $\delta^{13}\text{C}_{\beta(\text{proline})} = 32$ ppm alors la proline est en conformation *trans* et si $\delta^{13}\text{C}_{\beta(\text{proline})} = 34$ ppm elle est en conformation *cis*. Par exemple pour le glutamate E271, il existe une forme majoritaire correspondant à la Proline 270 en *trans* (le déplacement chimique du $^{13}\text{C}_{\beta i-1}$ du résidu E271 déterminé grâce aux expériences HNCACB et HNCOCACB est de 32,07 ppm), et il existe une forme minoritaire correspondant à la proline 270 en *cis* ($\delta^{13}\text{C}_{\beta i-1} = 34,38$ ppm) (Figure 86B et Figure 87). Il est possible de quantifier le ratio *cis/trans* des prolines en mesurant le rapport d'intensité entre la forme majoritaire et la forme minoritaire. Par exemple, la proline 270 possède une population *cis* de 7,3 %, ceci a été déterminé en mesurant le rapport d'intensité $I_{E270\text{min}} / (I_{E270\text{maj}} + I_{E270\text{min}})$. Il est donc possible par cette méthode de lier un état *cis/trans* d'une proline à un résidu donné quand la proline est en *i-1* de ce résidu car les expériences d'attribution HNCACB et HNCOCACB permettent d'identifier uniquement les déplacements chimiques C_α et C_β des résidus *i* et *i-1*.

Il existe d'autres cas sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT où on observe non pas une mais plusieurs formes minoritaires pour un même résidu. Notamment pour l'aspartate D316 possédant en *i-1* la proline P315, 3 formes minoritaires ont pu être identifiées (Figure 86C). Au voisinage du D316 il y a 5 prolines, donc le D316 ressent l'équilibre *cis/trans* de plusieurs d'entre elles. Dans ce cas il est difficile de déterminer à quelle proline en conformation *cis* correspondent ces formes minoritaires. En effet dans ce cas précis, la proline en *i-1* (proline P315) de toute les formes minoritaires identifiées pour le D316 est à chaque fois en conformation *trans*. La forme minoritaire correspondant à la P315 en conformation *cis* n'a pas pu être identifiée probablement parce qu'elle est superposée avec d'autres pics sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2. Les formes minoritaires observées pour le D316 sont donc dues à des équilibres *cis/trans* d'autres prolines au voisinage du D316.

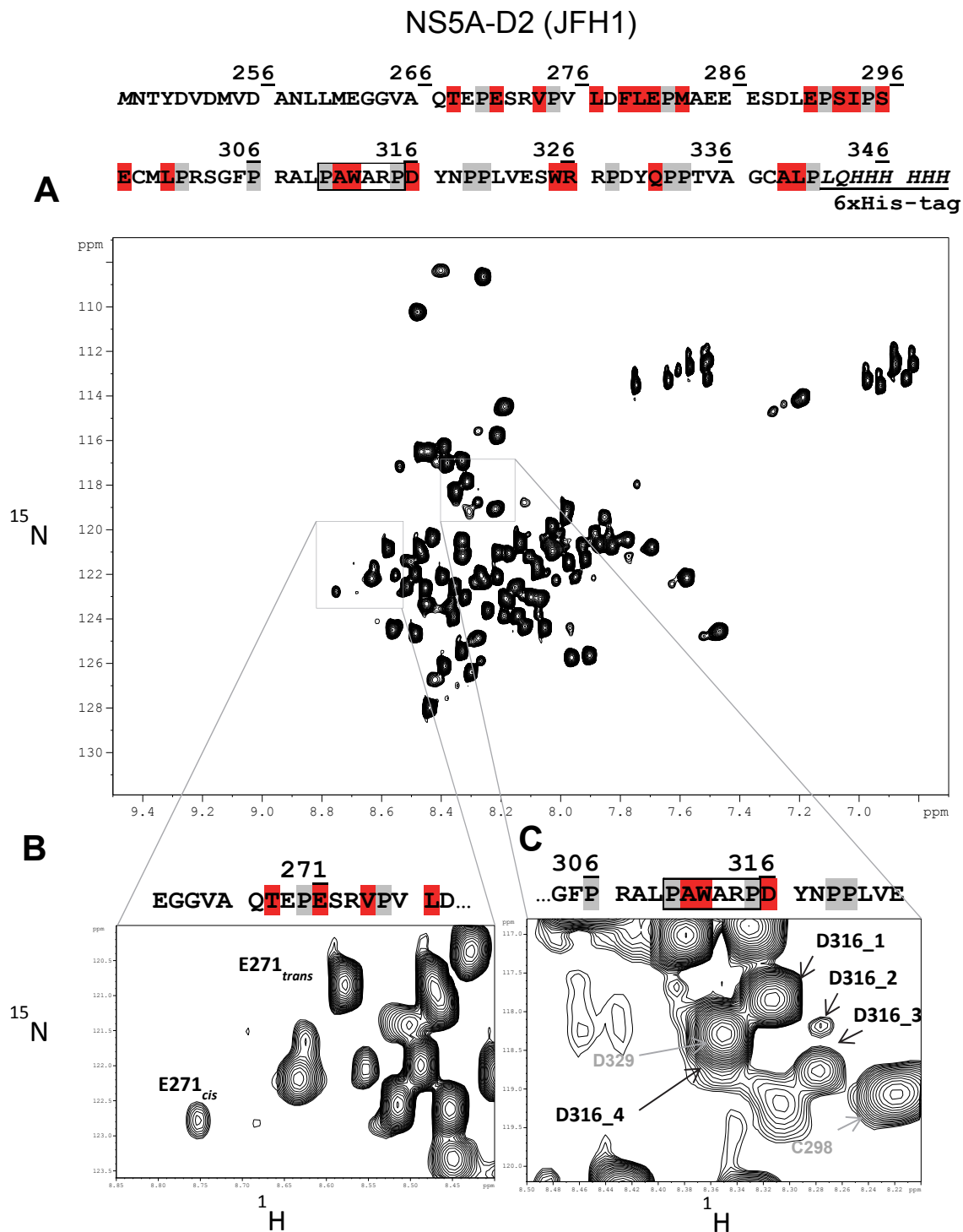


Figure 86. Formes minoritaires sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (JFH1) (600 MHz, 298 K, 450 μM). A, Séquence et spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 (JFH1). B, Détails du spectre ^1H - ^{15}N HSQC centré sur la forme majoritaire et minoritaire du résidu E271 correspondant respectivement à la proline 270 en conformation *trans* et *cis*. C, Détails du spectre ^1H - ^{15}N HSQC centré sur les formes du résidu D316, il existe 1 forme majoritaire et 3 formes minoritaires.

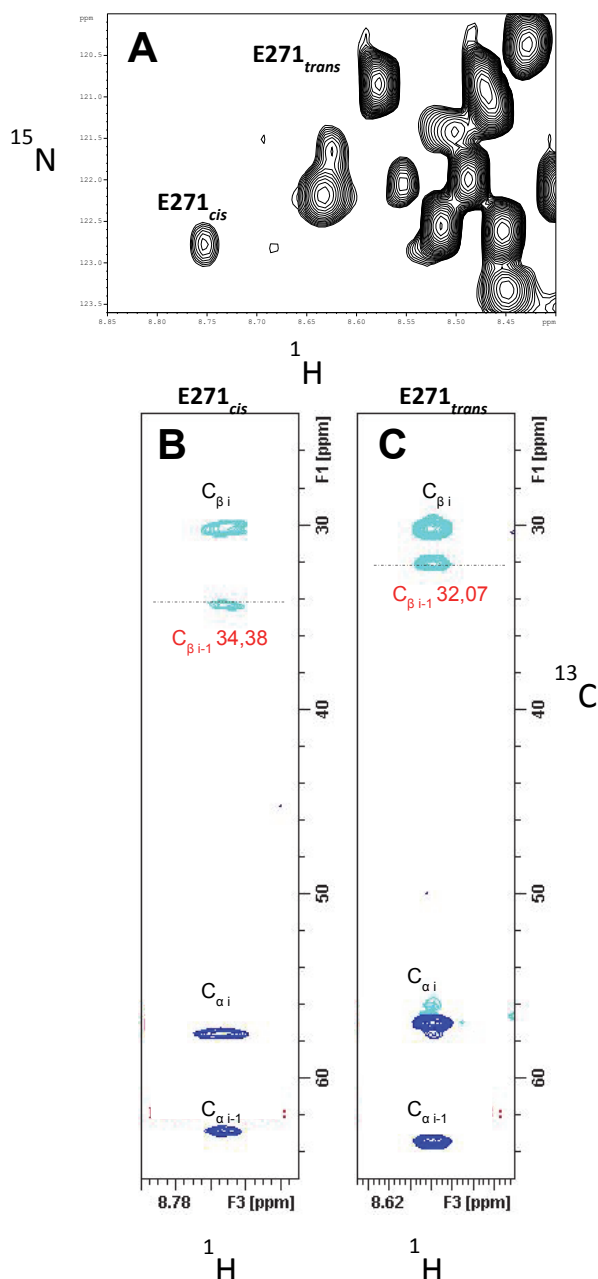


Figure 87. Forme majoritaire et minoritaire du résidu E271. A, Détails du spectre ^1H - ^{15}N HSQC sur les résonances E271 majoritaire et minoritaire. B, C, Plans ^1H , ^{13}C extraits à la fréquence ^{15}N de l'expérience tridimensionnelle HNCACB aux déplacements chimiques des protons amides du résidu E271 minoritaire (B) et du résidu E271 majoritaire (C). Les lignes horizontales en pointillé indiquent les déplacements chimiques C _{β i-1} à 34,38 ppm pour la forme minoritaire de E271, et à 32,07 ppm pour la forme majoritaire de E271.

Pour le W312 et l'A313, directement impliqués dans le motif structural P³¹⁰W³¹²-turn, on observe des pics particuliers pour lesquels toutes les formes minoritaires se retrouvent sur une ligne, le déplacement chimique du ^{15}N est linéaire par rapport au déplacement chimique du ^1H . Nous avons pu identifier 5 formes minoritaires pour le W312, et 3 pour l'A313 (Figure 88).

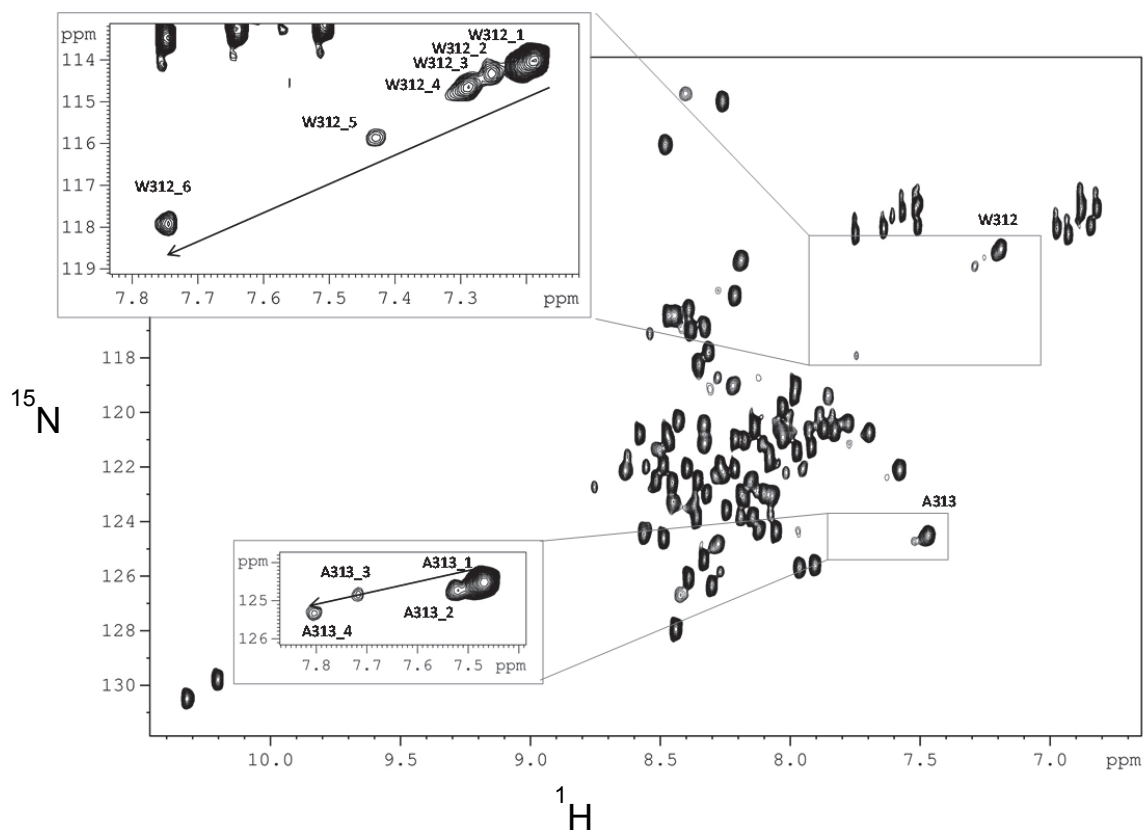


Figure 88. Spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 (JFH1) à 600 MHz. Spectre entier et détails du spectre sur les résonances des formes minoritaires du W312 et de l'A313. Il existe 5 formes minoritaires pour le W312 et 3 formes minoritaires pour l'A313 alignées sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC.

Le W312 possède 5 prolines dans son proche voisinage (Figure 65) et par conséquent pourrait ressentir l'équilibre *cis/trans* de plusieurs d'entre elles. L'hypothèse que nous avons formulée est que chacune de ces formes minoritaires correspondrait à un équilibre *cis/trans* d'une des 5 prolines localisées dans le site d'interaction avec la CypA. Pour valider cette hypothèse il a donc été nécessaire de déterminer à quelle proline en conformation *cis* correspond chacune de ces formes minoritaires. L'état *cis/trans* des prolines a pu être identifié pour la forme majoritaire W312_1 située en haut à droite de la ligne et pour la dernière forme minoritaire W312_6 située en bas à gauche de la ligne à l'aide des expériences 3D HNCACB et HNCOCACB lors de l'attribution du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (JFH1). La forme majoritaire W312_1 correspond au W312 lorsque les 5 prolines sont en conformation *trans*. La dernière forme minoritaire W312_6 située en bas à gauche sur la ligne a été attribuée au W312 lorsque la proline P310 est en conformation *cis*. En effet, les spectres HNCACB et HNCOCACB ont permis de connecter la forme minoritaire W312_6 à la forme minoritaire alanine A311_2 qui possède en i-1 la proline P310 en conformation *cis* (Figure 89).

Afin d'attribuer les autres formes minoritaires du W312 situées sur une ligne sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC, nous avons muté une par une les 5 prolines localisées dans le site d'interaction avec la CypA en alanine. Si notre hypothèse de départ est vérifiée, alors en mutant une proline en alanine on doit supprimer un équilibre *cis/trans* et donc une forme minoritaire devrait disparaître sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC.

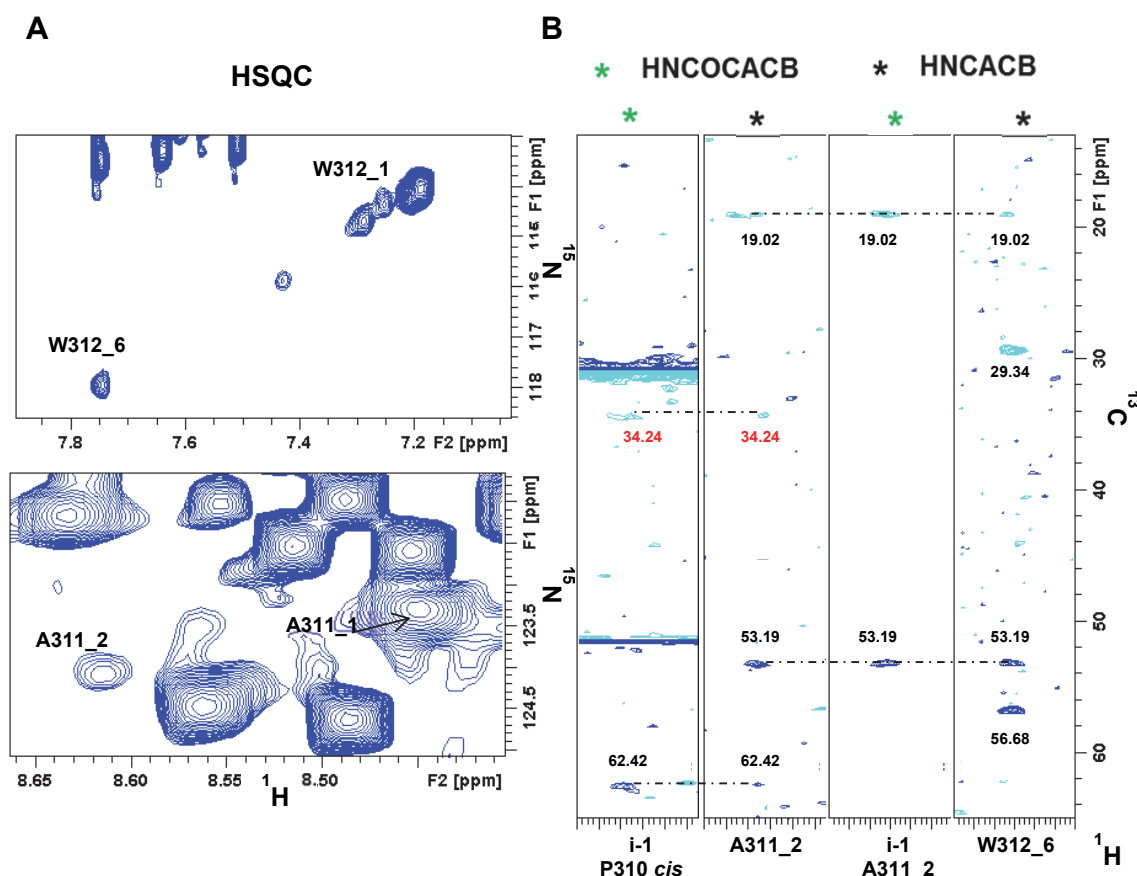


Figure 89. La forme minoritaire W312_6 est liée à la P310 en conformation *cis*. A, spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 JFH1 WT ^{15}N . En haut, région du spectre centrée sur les résonances du W312 et ses formes minoritaires, en bas région du spectre centrée sur les résonances de l'A311 et sa forme minoritaire A311_2. B, Plans ^1H , ^{13}C extraits à la fréquence ^{15}N de la HNCACB (*) et de la HNCOCACB (*) aux déplacements chimiques des protons amides des formes minoritaires W312_6 et A311_2. Les lignes horizontales en pointillé indiquent les déplacements chimiques C_α et C_β du W312_6 et de son résidu i-1 l'A311_2, du résidu A311_2 et de son résidu i-1 P310_{*cis*}. Le résidu i-1 de l'A311_2 possède un C_β à 34,24 ppm indiquant que la proline P310 est en conformation *cis*. La forme minoritaire W312_6 correspond donc au W312 lorsque la P310 est en conformation *cis*.

2.5.2 Etude des mutations proline-alanine de NS5A-D2 localisées dans le site d'interaction avec la CypA

Nous avons donc créé par mutagenèse dirigée les 5 mutants proline-alanine localisés dans le site d'interaction avec la CypA : NS5A-D2 P306A, NS5A-D2 P310A, NS5A-D2 P315A, NS5A-D2 P319A et NS5A-D2 P320A. Les spectres ^1H - ^{15}N HSQC de ces mutants ont été attribués à l'aide

d'expériences tridimensionnelles présentées dans l'introduction et du logiciel d'attribution développé au laboratoire (Verdegem et al., 2008). Afin de pouvoir comparer correctement les différents spectres ^1H - ^{15}N HSQC des mutants P-A de NS5A-D2 (JFH1), ils ont tous été enregistrés à une concentration de 450 μM , à 900 MHz dans les mêmes conditions de tampon et de température, l'acquisition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC est effectuée avec 2048 x 256 points et 32 scans. La concentration de tous les mutants de NS5A-D2 a été vérifiée par dosage spectrophotométrique UV suivi d'une analyse SDS-PAGE (Figure 90). Chaque bande correspond à 2 μg de protéine d'après la concentration mesurée par spectrophotométrie UV à 280 nm, l'intensité de la bande est identique pour tous les mutants de NS5A-D2 (JFH1). La comparaison des formes minoritaires du W312 entre chaque mutant s'est faite sur les spectres ^1H - ^{15}N HSQC enregistrés à 900 MHz car l'utilisation d'un plus haut champ permet d'obtenir une meilleure résolution ce qui facilite l'identification des différentes formes minoritaires. Nous avons vérifié que le profil des formes minoritaires de NS5A-D2 WT est identique à 600 MHz et 900 MHz (Figure 91 et Figure 92). Les spectres des mutants proline-alanine sont superposés au spectre de NS5A-D2 WT et sont présentés de la Figure 93 à Figure 102.

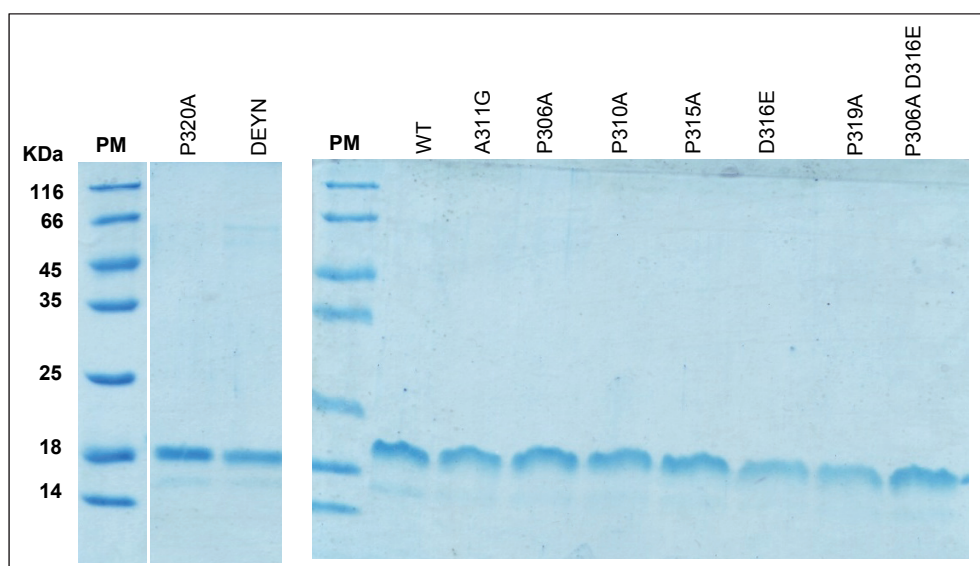


Figure 90. Dosage des mutants P-A, des mutants de résistance à la CsA et de la mutation A311G de NS5A-D2(JFH1) par SDS-PAGE 15% : NS5A-D2 P320A, NS5A-D2 DEYN, NS5A-D2 Wild type, NS5A-D2 A311G, NS5A-D2 P306A, NS5A-D2 P310A, NS5A-D2 P315A, NS5A-D2 D316E, NS5A-D2 P319A, NS5A-D2 P306A-D316E. Chaque bande correspond à 2 μg de protéines d'après le dosage UV à 280 nm.

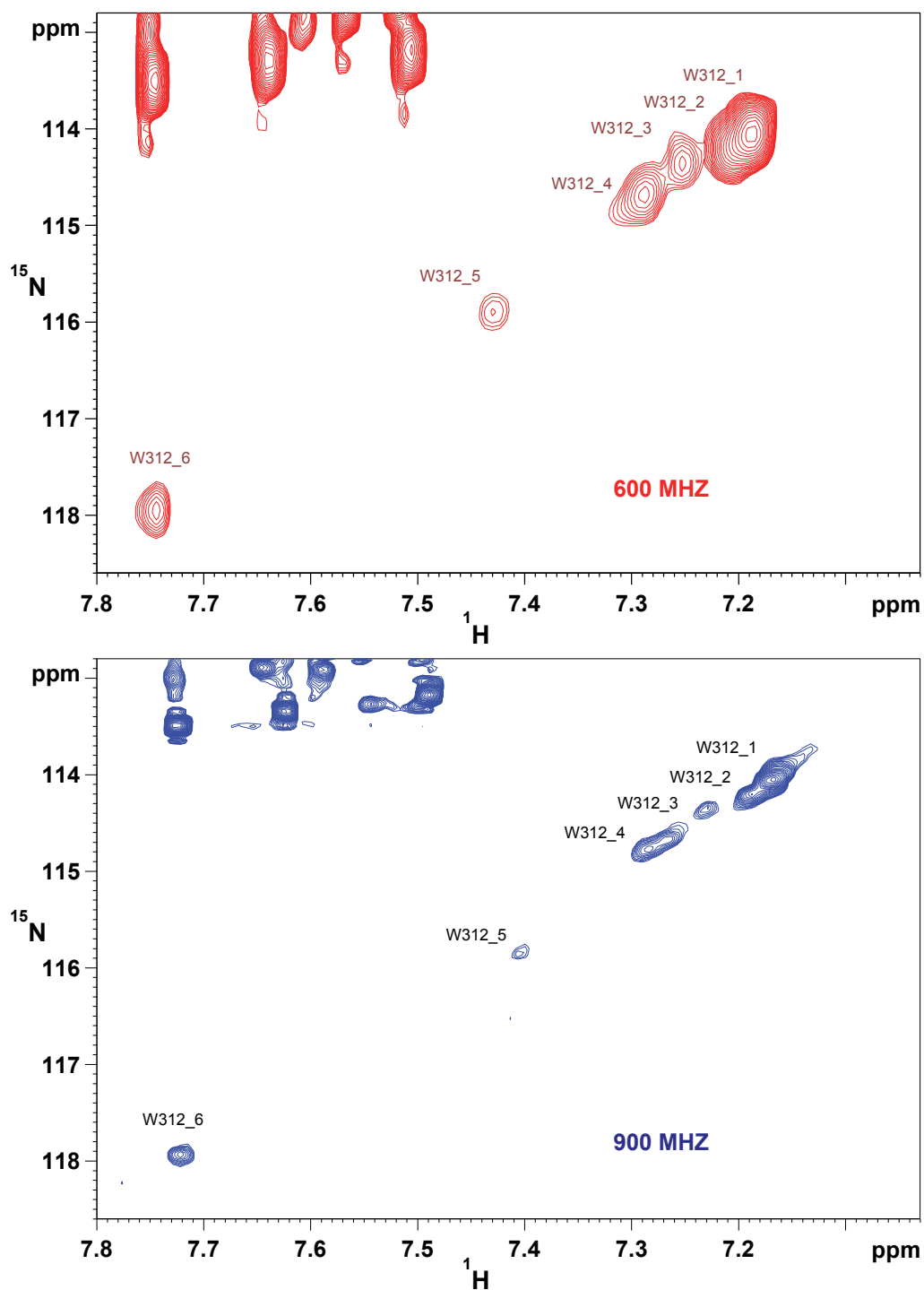


Figure 91. Comparaison des formes minoritaires du W312 de NS5A-D2 WT (JFH1) sur des spectres ^1H - ^{15}N HSQC à 600 MHz (en haut) et 900 MHz (en bas). Les spectres ont été enregistrés avec les mêmes paramètres d'acquisition, dans les mêmes conditions de tampon et de température (298K).

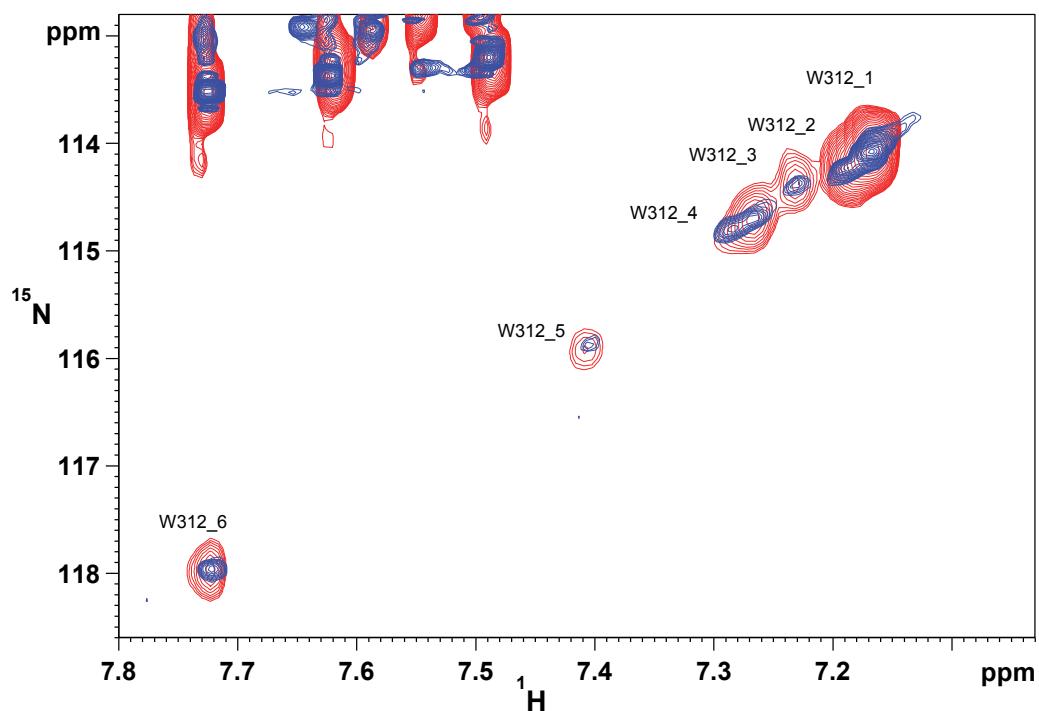


Figure 92. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT enregistré à 600 MHz (rouge) et 900 MHz (bleu), détails du spectre sur les résonances du W312 et de ses formes minoritaires. (Les mêmes spectres sont montrés séparément dans la figure précédente). Le nombre de formes minoritaires à 600 MHz et 900 MHz est identique, la résolution est plus importante à 900 MHz.

P306A

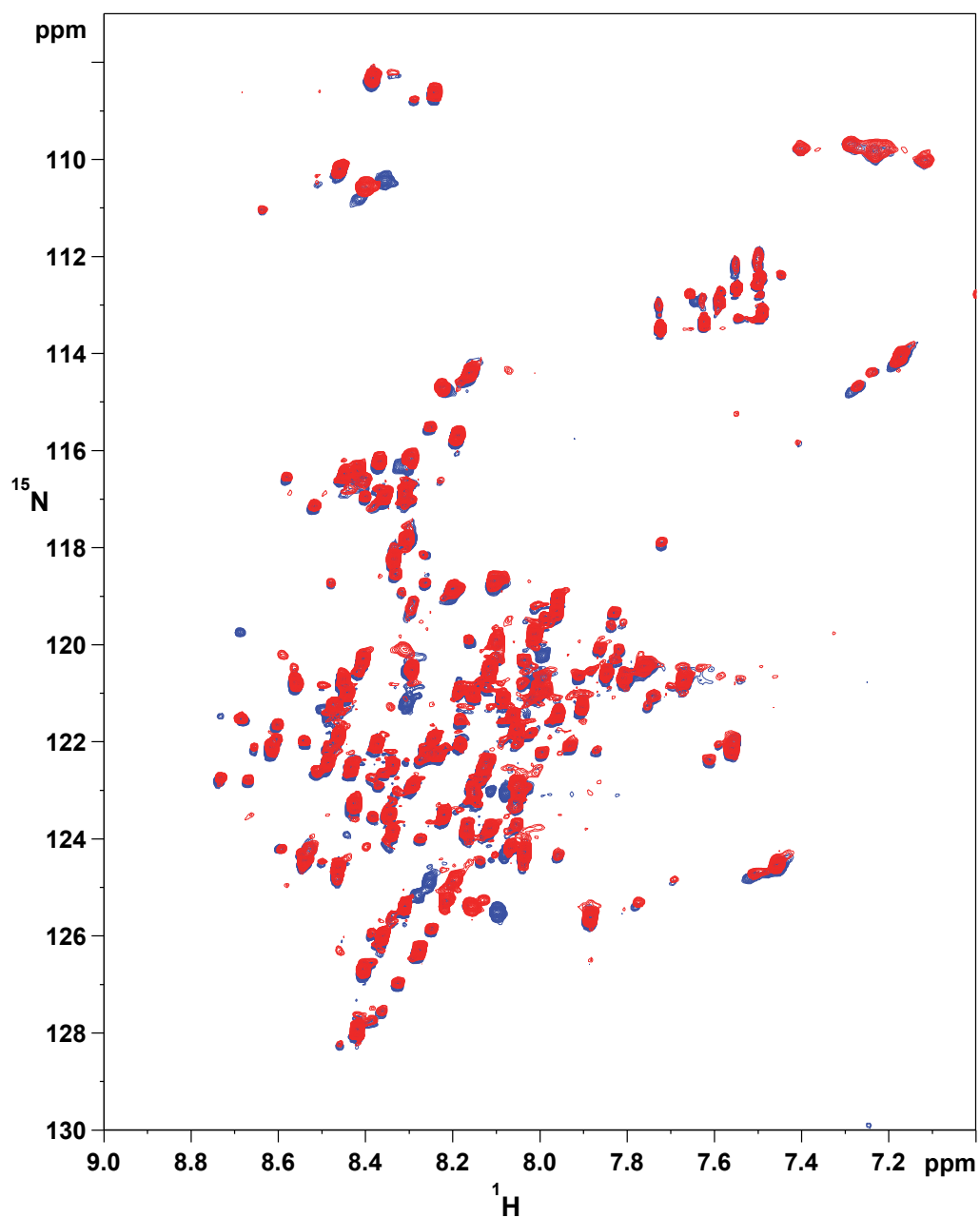


Figure 93. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P306A (rouge). Les domaines NS5A-D2 WT et NS5A-D2 P306A sont tous les deux à la concentration de 450 μM dans le tampon (NaPi 30 mM pH 6,4, NaCl 30 mM, 2 mM THP, 0,1 mM EDTA). Les spectres ont été enregistrés à 900 MHz, avec les mêmes paramètres d'acquisition et de traitement.

P306A

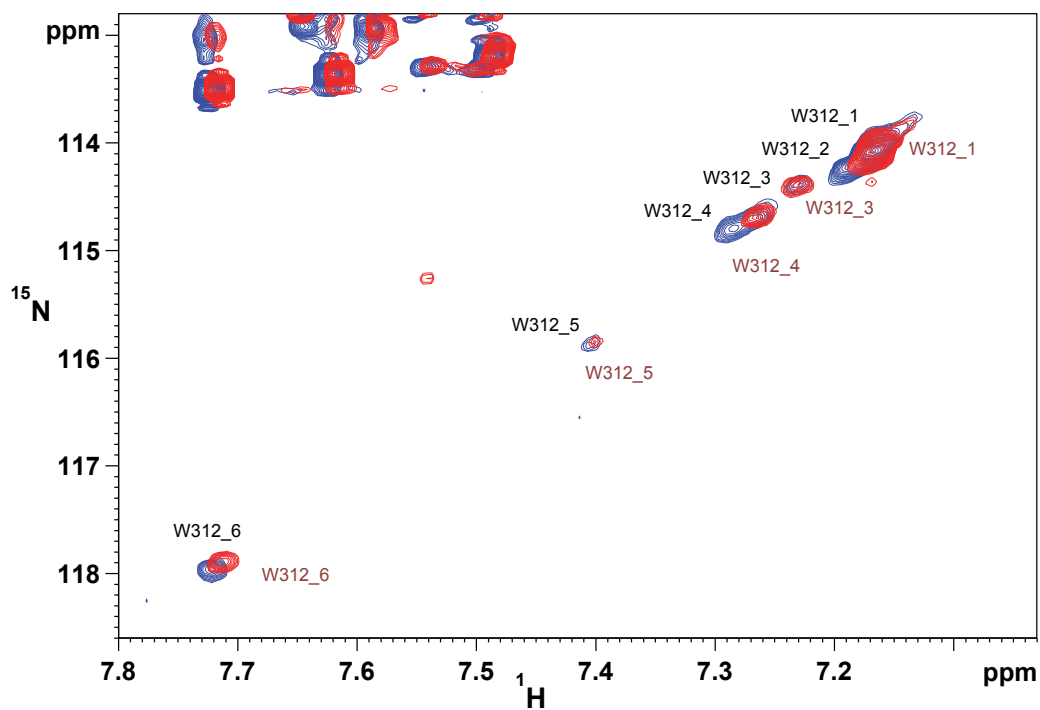


Figure 94. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P306A (rouge), détails des spectres sur les résonances du W312. Les spectres sont référencés par rapport au signal du TMS. On visualise la disparition de la forme minoritaire W312_2 sur le spectre NS5A-D2 P306A.

P320A

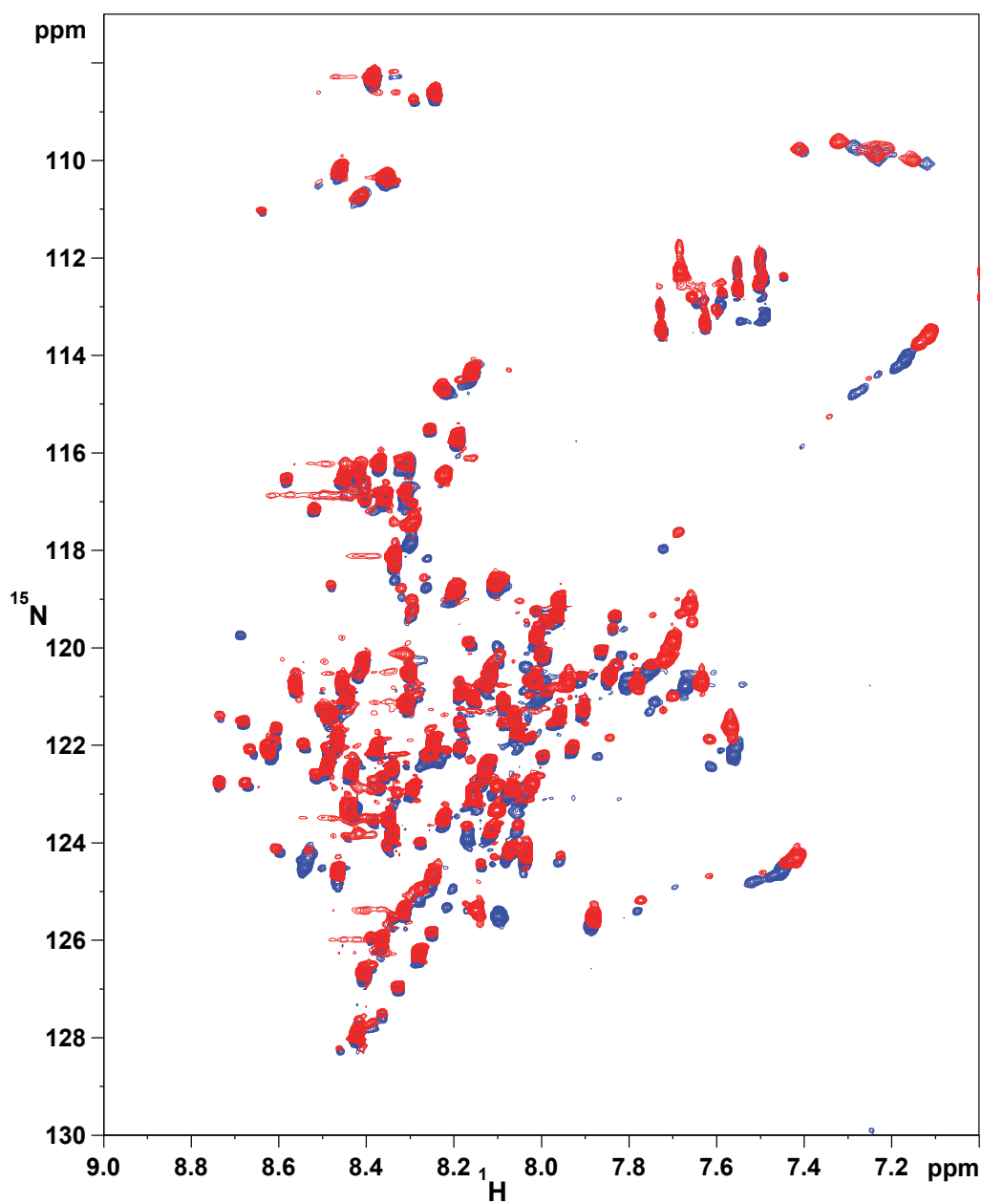


Figure 95. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P320A (rouge). Les domaines NS5A-D2 WT et NS5A-D2 P320A sont tous les deux à la concentration de 450 μM dans le tampon (NaPi 30 mM pH 6,4, NaCl 30 mM, 2 mM THP, 0,1 mM EDTA). Les spectres ont été enregistrés à 900 MHz, avec les mêmes paramètres d'acquisition et de traitement.

P320A

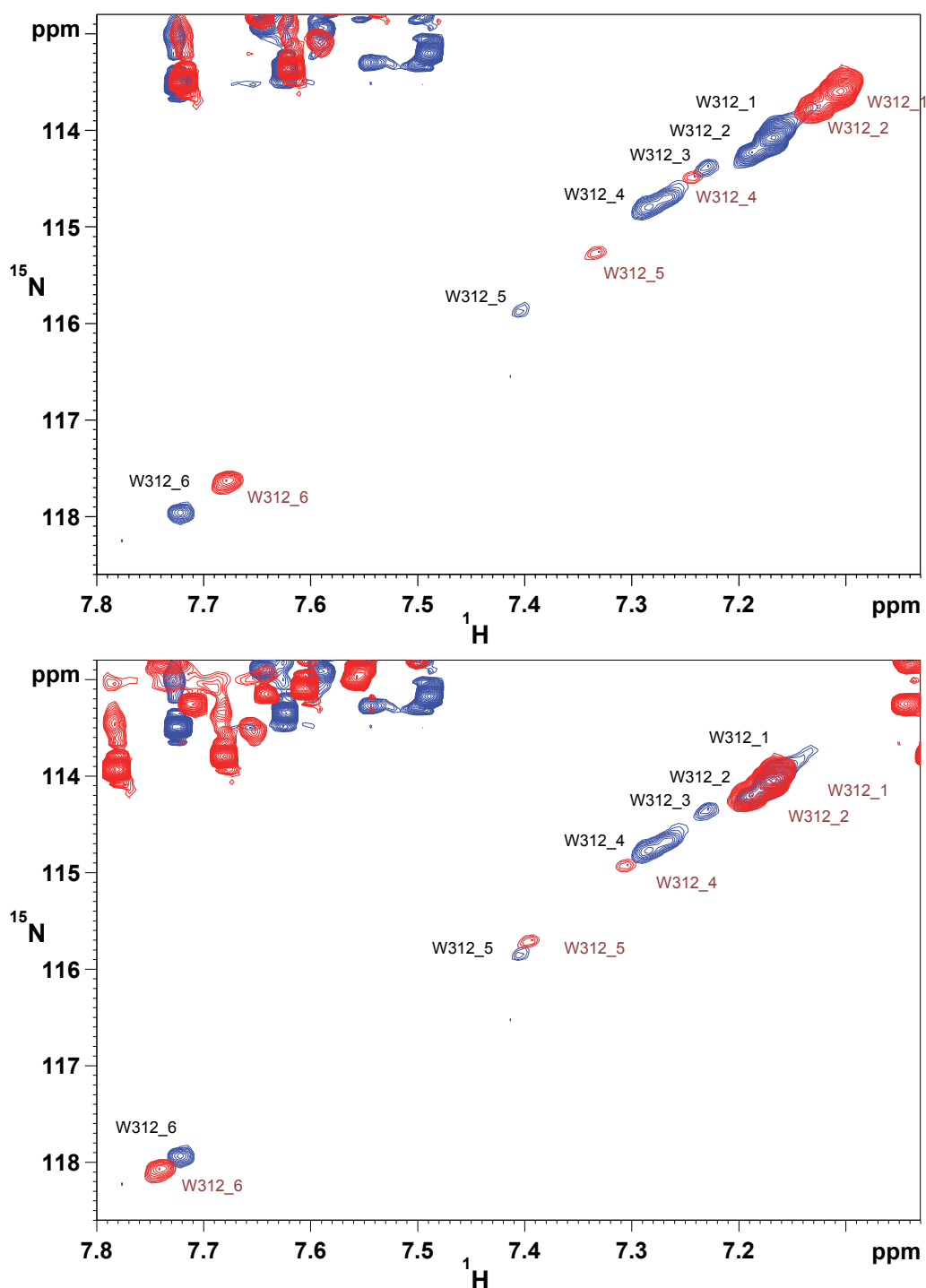


Figure 96. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P320A (rouge), (résonances du W312). En haut, les spectres sont référencés par rapport au signal du TMS. En bas, les spectres NS5A-D2 (WT) et NS5A-D2 P320A (rouge) sont superposés sur la forme majoritaire W312_1. Ceci permet de visualiser la disparition de la forme minoritaire W312_3.

P319A

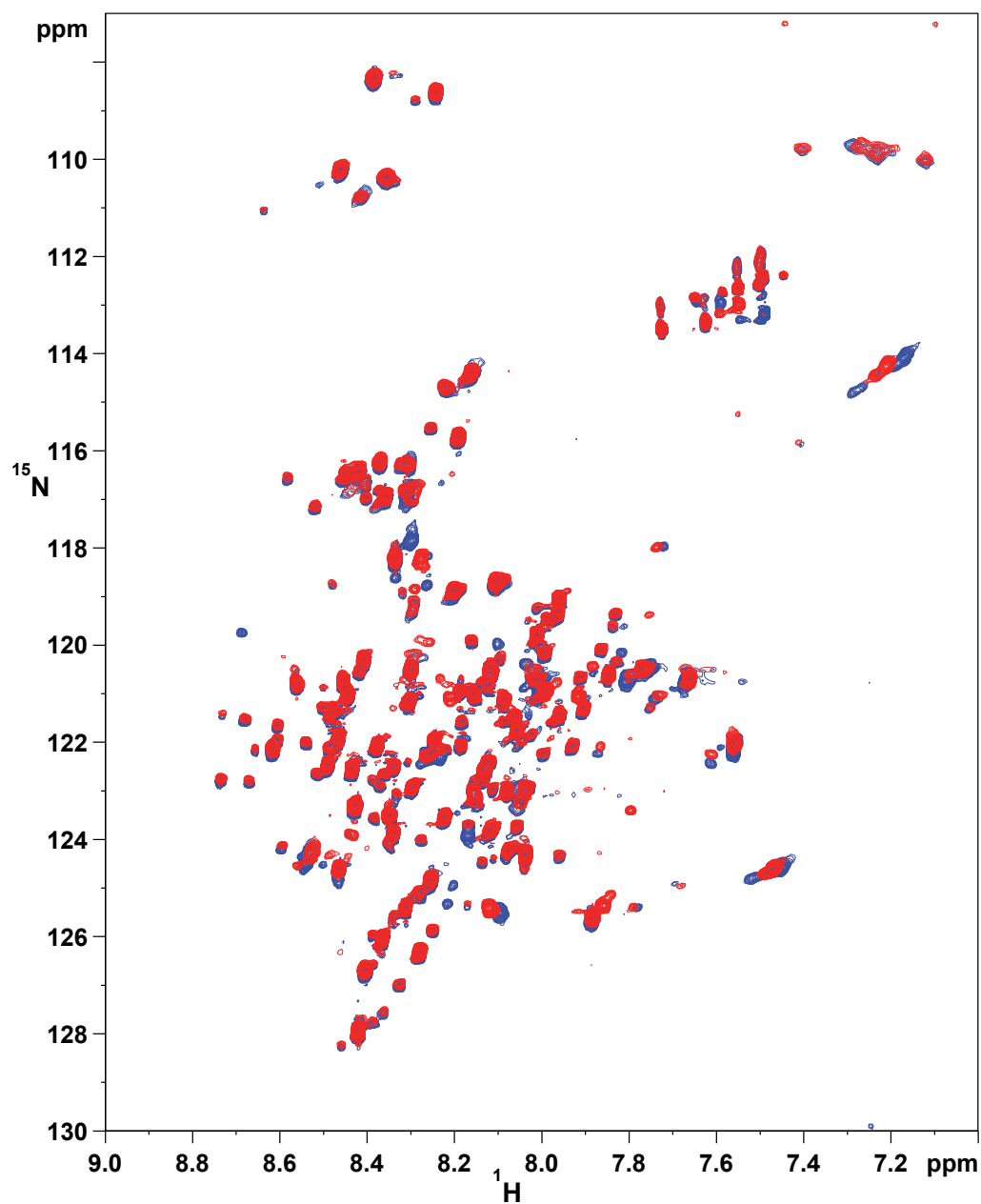


Figure 97. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P319A (rouge). Les domaines NS5A-D2 WT et NS5A-D2 P319A sont tous les deux à la concentration de 450 μM dans le tampon (NaPi 30 mM pH 6,4, NaCl 30 mM, 2 mM THP, 0,1 mM EDTA). Les spectres ont été enregistrés à 900 MHz, avec les mêmes paramètres d'acquisition et de traitement.

P319A

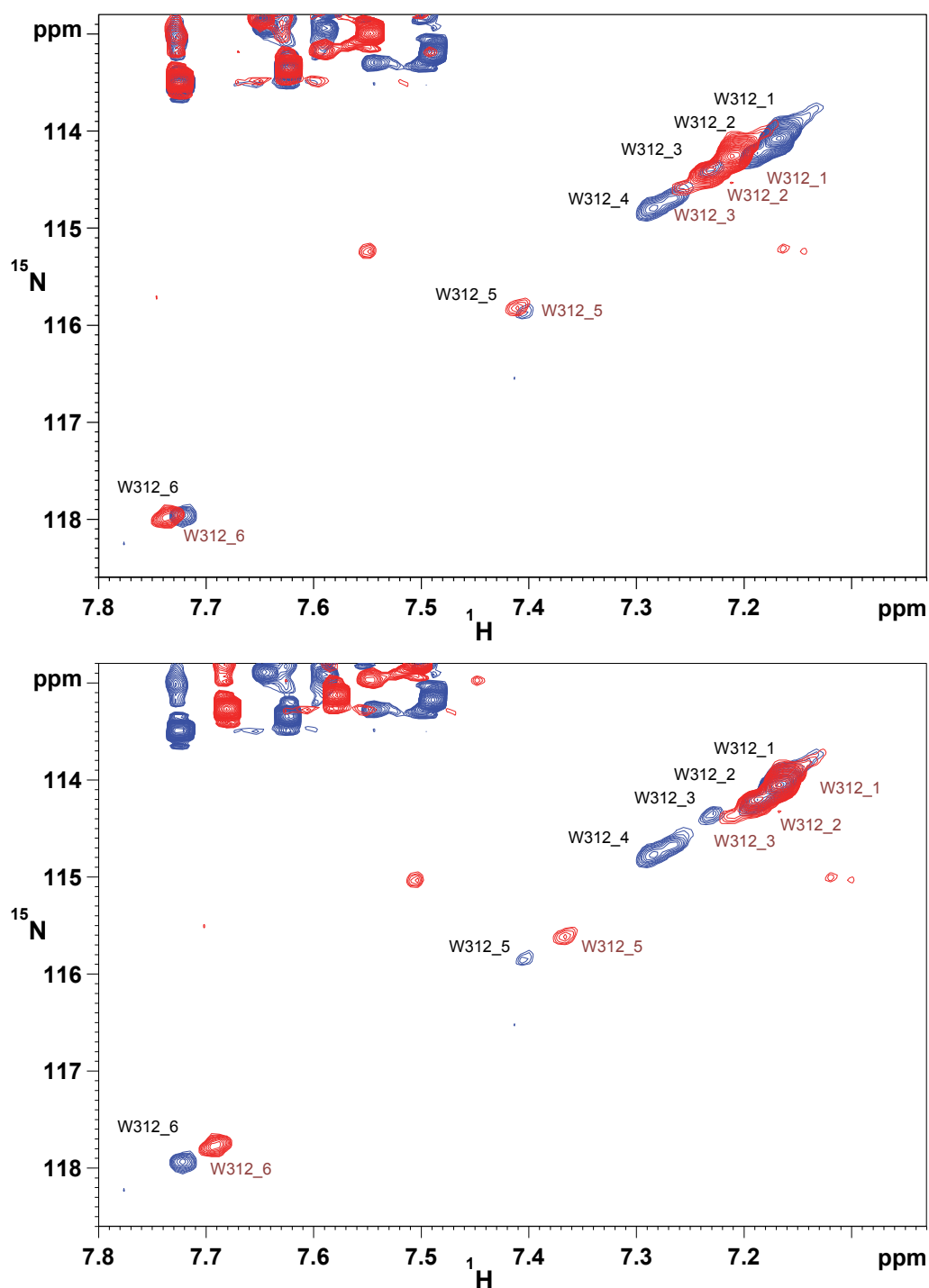


Figure 98. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P319A (rouge), (résonances du W312). En haut, les spectres sont référencés par rapport au signal du TMS. En bas, les spectres NS5A-D2 (WT) et NS5A-D2 P319A (rouge) sont superposés sur la forme majoritaire W312_1. Ceci permet de visualiser la disparition de la forme minoritaire W312_4.

P315A

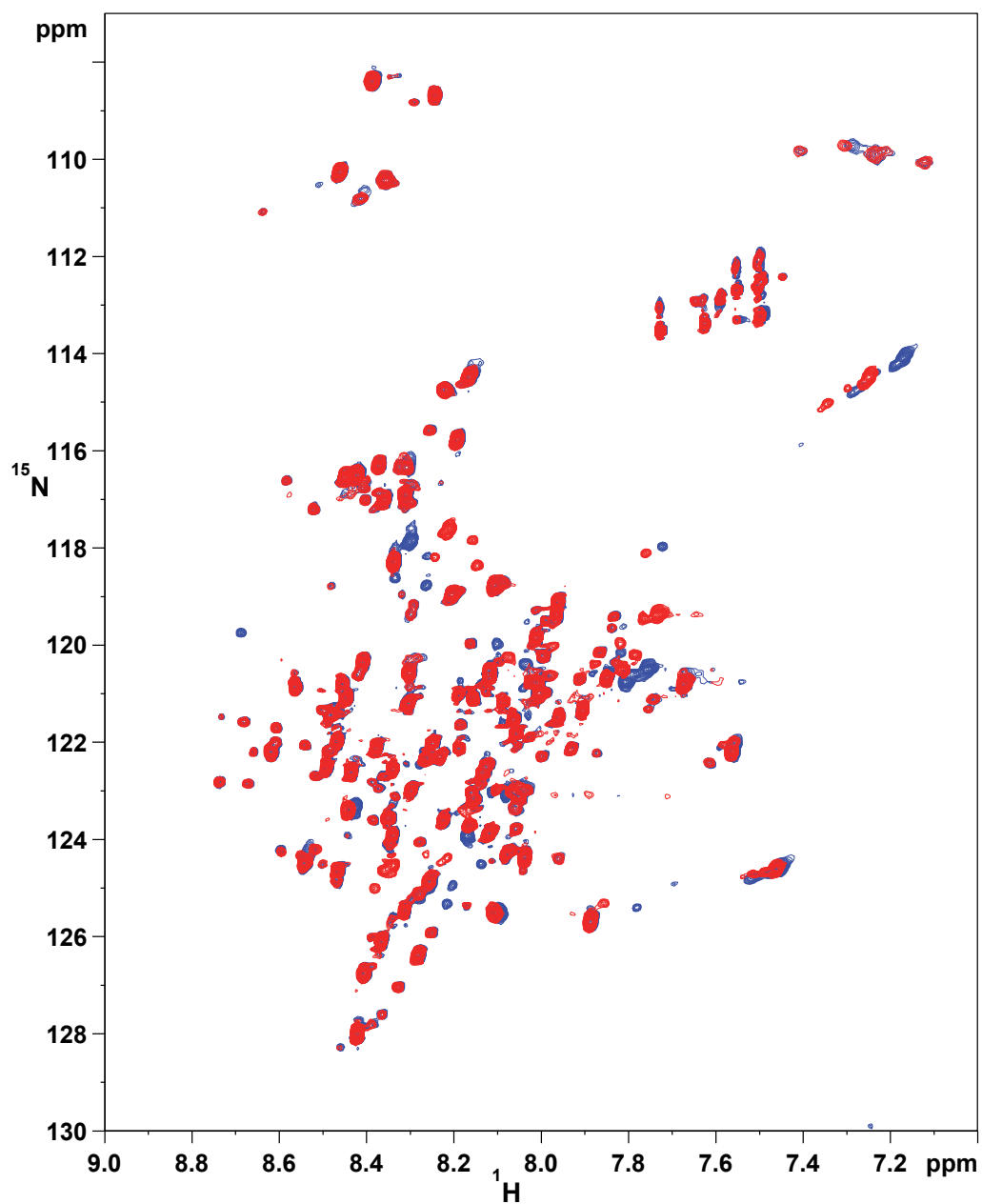


Figure 99. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P315A (rouge). Les domaines NS5A-D2 WT et NS5A-D2 P315A sont tous les deux à la concentration de $450\ \mu\text{M}$ dans le tampon (NaPi 30 mM pH 6,4, NaCl 30 mM, 2 mM THP, 0,1 mM EDTA). Les spectres ont été enregistrés à 900 MHz, avec les mêmes paramètres d'acquisition et de traitement.

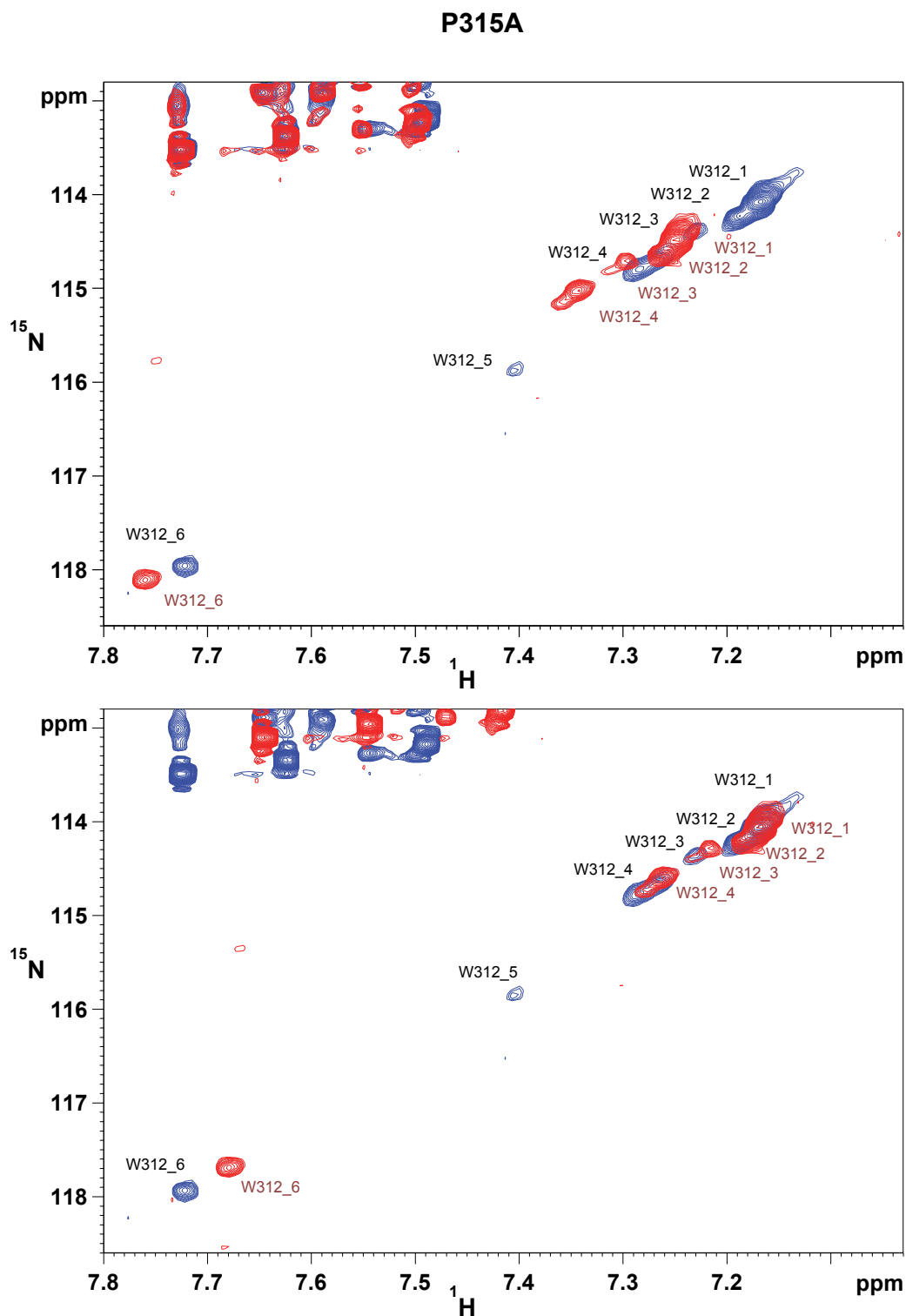


Figure 100. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P315A (rouge), (résonances du W312). En haut, les spectres sont référencés par rapport au signal du TMS. En bas, les spectres NS5A-D2 (WT) et NS5A-D2 P315A (rouge) sont superposés sur la forme majoritaire W312_1. Ceci permet de visualiser la disparition de la forme minoritaire W312_5.

P310A

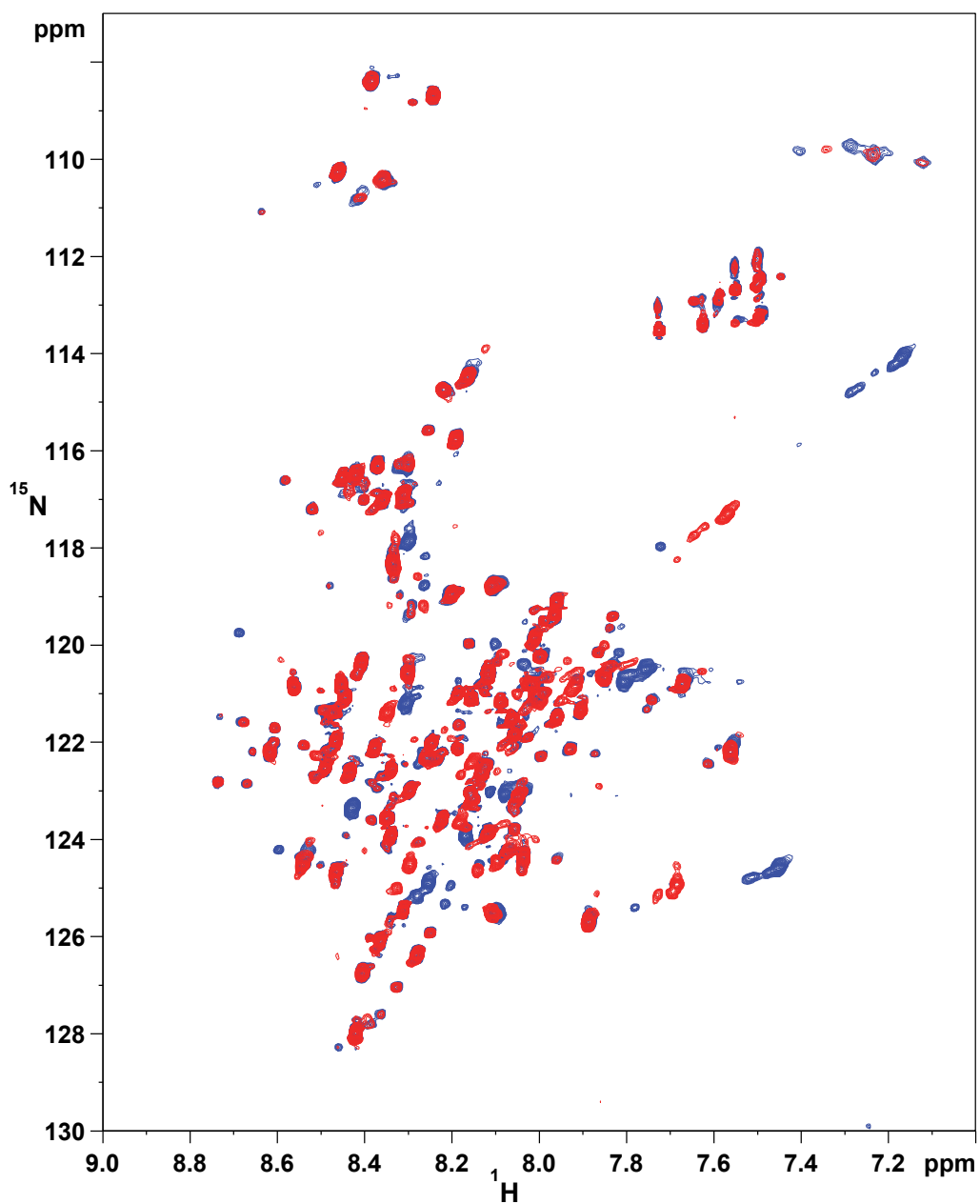


Figure 101. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P310A (rouge). Les domaines NS5A-D2 WT et NS5A-D2 P310A sont tous les deux à la concentration de 450 μM dans le tampon (NaPi 30 mM pH 6,4, NaCl 30 mM, 2 mM THP, 0,1 mM EDTA). Les spectres ont été enregistrés à 900 MHz, avec les mêmes paramètres d'acquisition et de traitement.

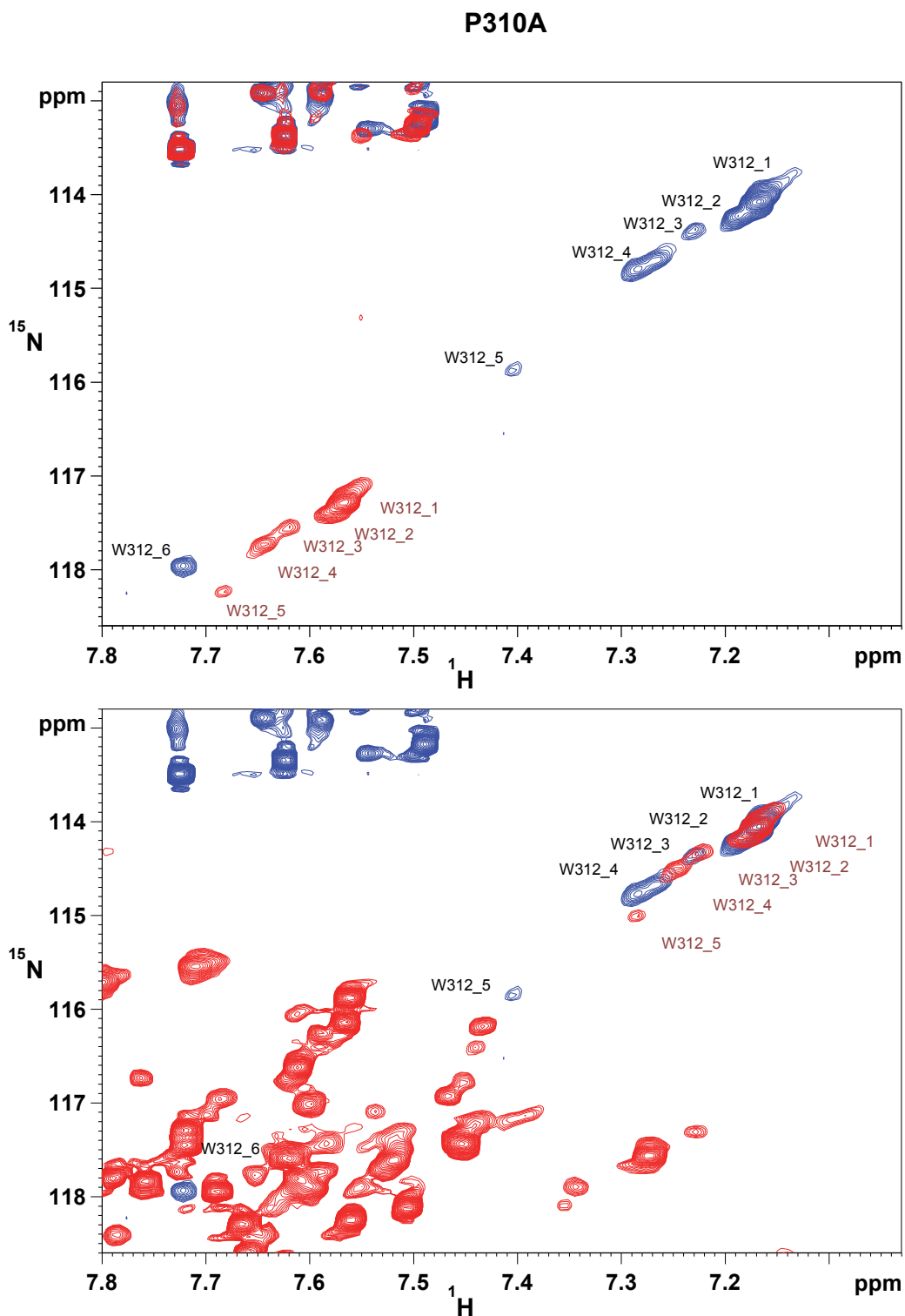


Figure 102. Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 P310A (rouge), (résonances du W312). En haut, les spectres sont référencés par rapport au signal du TMS. En bas, les spectres NS5A-D2 (WT) et NS5A-D2 P310A (rouge) sont superposés sur la forme majoritaire W312_1. On peut visualiser 5 formes minoritaires pour NS5A-D2 P310A.

A chaque forme minoritaire du W312 située sur la ligne sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC, nous avons attribué une proline en conformation *cis*. Chacune des formes minoritaires correspond donc bien à un équilibre *cis/trans* d'une des 5 prolines localisées dans le site d'interaction avec la CypA. Sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 P306A, la deuxième forme W312_2 disparaît, elle correspond donc au W312 quand la P306 est en conformation *cis*. Ceci a été confirmé grâce à une expérience ^1H - ^{15}N HSQC filtrée, à 600 MHz (Figure 103). Cette expérience permet d'obtenir des spectres RMN ^1H - ^{15}N HSQC séparés à partir d'une même expérience RMN en utilisant un filtre isotopique sur un mélange de deux protéines : une protéine marquée ^{15}N et une protéine marquée ^{15}N ^{13}C . Ici NS5A-D2 WT ^{15}N est mélangée à NS5A-D2 P306A ^{15}N ^{13}C , on obtient alors un spectre ^1H - ^{15}N HSQC de chaque domaine NS5A-D2, WT et mutant, strictement dans les mêmes conditions. Pour les autres mutants P-A de NS5A-D2, la mutation induit deux effets sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC: une disparition d'une forme minoritaire du W312 et une perturbation de déplacement chimique de l'ensemble des formes du W312 le long de la même ligne que celle des formes minoritaires du W312 dans le domaine NS5A-D2 WT ce qui complique l'attribution des formes minoritaires. En effet, il devient difficile de comparer les formes minoritaires du W312 des mutants par rapport au Wild Type. Nous avons alors superposé les spectres des mutants en positionnant la forme majoritaire W312_1 des mutants sur la forme majoritaire W312_1 de NS5A-D2 WT. Dans ces conditions nous avons pu mettre en évidence la disparition d'une forme minoritaire pour les différents mutants P-A de NS5A-D2. Sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 P320A on observe la disparition de la forme minoritaire W312_3 (Figure 95 et Figure 96) qui peut donc être attribuée au W312 lorsque la proline P320 est en conformation *cis*. De même, la mutation P319A provoque la disparition de la forme minoritaire W312_4 sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC (Figure 97 et Figure 98), qui peut donc être attribuée au W312 lorsque la proline P319 est en conformation *cis*. La mutation P315A fait disparaître la forme minoritaire W312_5 (Figure 99 et Figure 100), elle peut donc être attribuée au W312 lorsque la proline P315 est en conformation *cis*. Enfin, la mutation P310A induit une plus grande perturbation de déplacement chimique des différentes résonances du W312 sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC (Figure 101 et Figure 102), comme avec les autres mutations P-A il ne reste que 5 formes minoritaires du W312. La forme minoritaire W312_6 a été attribuée au W312 lorsque la proline 310 est en conformation *cis*, grâce aux expériences d'attributions tridimensionnelles. On peut également remarquer que l'intensité des formes minoritaires du W312 pour les différents mutants P-A n'est pas identique à celle du Wild Type, probablement parce que les mutations proline-alanine perturbent l'équilibre *cis/trans* des autres prolines induisant des changements de populations.

On peut remarquer que, plus la proline responsable d'une forme minoritaire du W312 est proche de ce résidu dans la séquence primaire, plus le déplacement chimique de cette forme minoritaire est éloigné de celui de la forme majoritaire du W312 (Figure 104). Il existe une exception pour la forme minoritaire W312_2 (cette forme a été attribuée au W312 lorsque la P306 est en conformation *cis*). En effet, la P306 n'est pas directement impliquée dans le motif structural, ce qui explique que pour cette forme minoritaire W312_2 il n'y a pas de corrélation entre la variation de déplacement en $^1\text{H}^{15}\text{N}$ entre la forme minoritaire W312_2 et la forme majoritaire W312_1 en fonction du nombre de résidu entre la P306 et le W312.

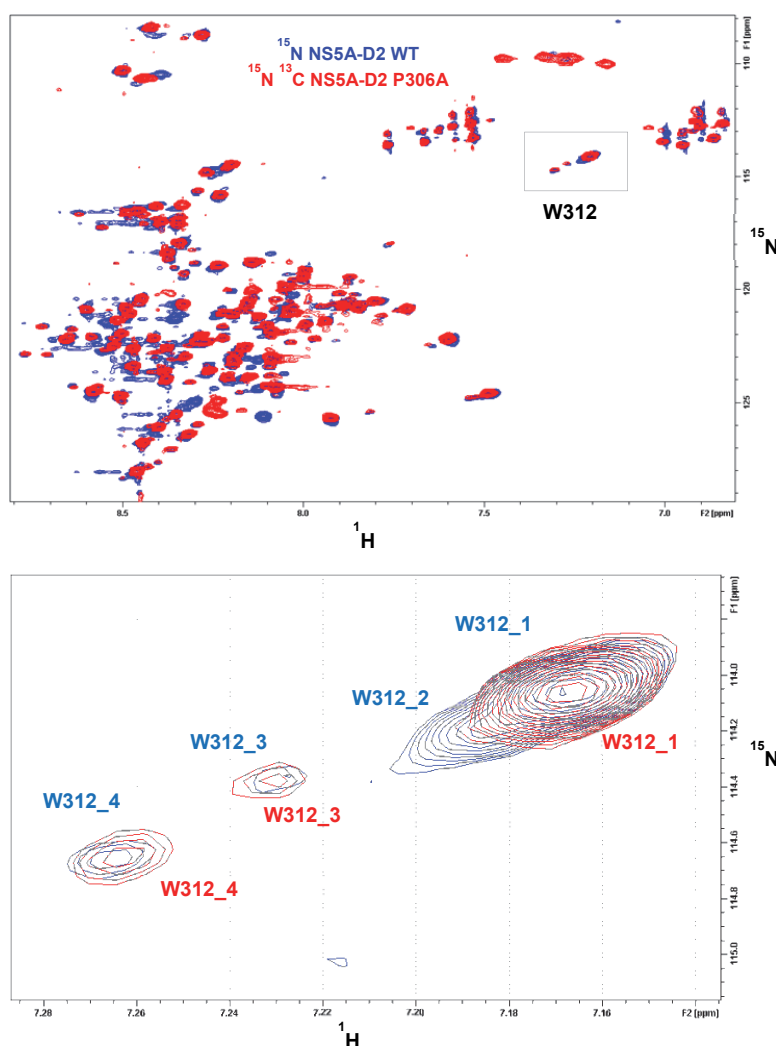


Figure 103. Spectres ^1H - ^{15}N HSQC filtrés de ^{15}N NS5A-D2 WT (bleu) et ^{15}N ^{13}C NS5A-D2 P306A (rouge) à 600 MHz. Les deux protéines NS5A-D2 WT ^{15}N et NS5A-D2 P306A ^{15}N ^{13}C sont dans un même tube RMN. En haut, spectres ^1H - ^{15}N HSQC entiers. En bas, détails des spectres sur les résonances W312_1, W312_2, W312_3, et W312_4.

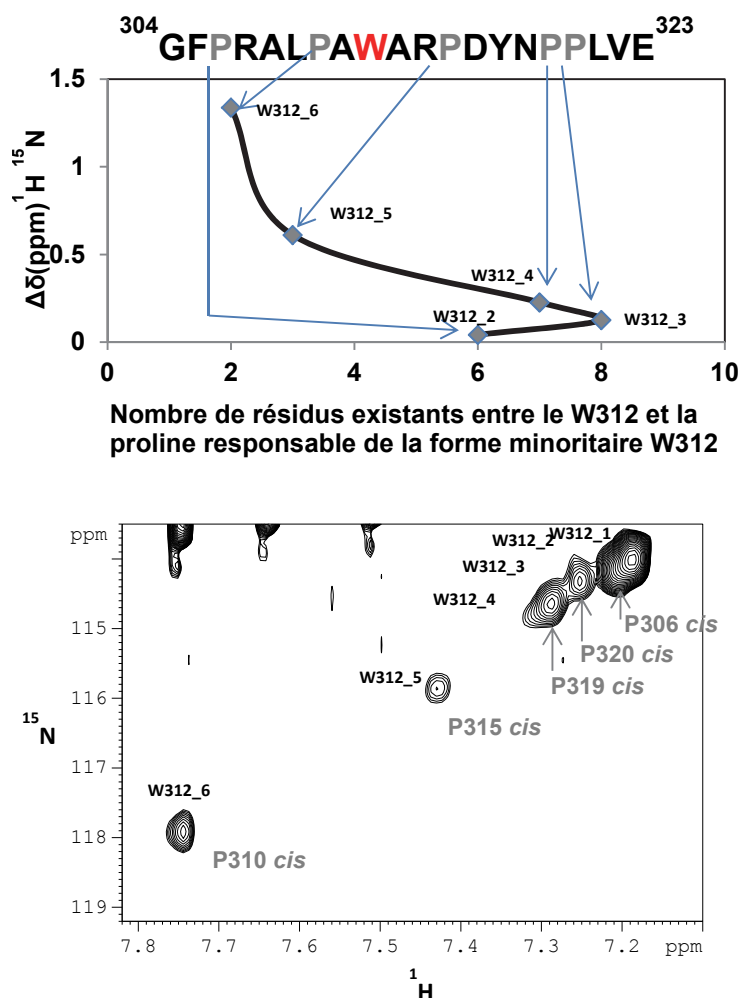


Figure 104. Variation de déplacement combiné en ^1H et ^{15}N (entre les formes minoritaires et la forme majoritaire du W312) en fonction du nombre de résidus qui sépare le W312 et la proline responsable de la forme minoritaire. En bas, le spectre ^1H - ^{15}N HSQC à 600MHz de NS5A-D2 WT centré sur les résonances du W312. La proline en conformation *cis* responsable de chaque forme minoritaire du W312 est indiquée en gris

2.5.3 Définition de l'étendue du motif structural

La superposition du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de référence (le domaine NS5A-D2 WT), avec le spectre des domaines mutés en proline-alanine et avec celui du domaine muté en A311G permet de visualiser les perturbations de déplacements chimiques des résonances des acides aminés induits par la présence de chacune des mutations ponctuelles (Figure 105). La Figure 105A montre que la majorité des résonances des acides aminés ne voit pas leurs déplacements chimiques perturbés par la mutation (le pic supplémentaire apparaissant sur chaque spectre correspond à l'acide aminé muté). On remarque pour les résonances du W312 et A313 une grande variation de déplacement chimique pour chaque mutant proline-alanine ainsi que pour la mutation A311G (Figure 105B et C). L'effet est beaucoup plus drastique pour les mutations

P310A et A311G car les résidus P310 et A311 sont au cœur de motif structural *PW-turn*. Pour chaque mutant, la perturbation de déplacement chimique des résonances du W312 et de l'A313 suit la même ligne que celle identifiée précédemment pour les formes minoritaires (Figure 106). Les spectres ^1H - ^{15}N HSQC permettent de calculer les perturbations de déplacements chimiques combinées en proton et azote induite par chacune des mutations selon cette formule : $\delta\Delta = |\delta\Delta(^1\text{H}_\text{N})| + 0.2 * |\delta\Delta(^{15}\text{N})|$, où $\delta\Delta(^1\text{H}_\text{N})$ et $\delta\Delta(^{15}\text{N})$ représentent les perturbations de déplacements chimiques dans les dimensions ^1H et ^{15}N respectivement. Il s'agit de la différence de déplacement chimique en ^1H et ^{15}N entre le spectre de NS5A-D2 WT et le spectre d'un mutant de NS5A-D2. Cette analyse a été réalisée sur chaque mutant de NS5A-D2 (Figure 107). Pour chacune des mutations, le changement d'un résidu induit une perturbation de déplacement chimique des résidus voisins de la mutation, ceci est dû à l'effet de séquence. On observe que les mutations P310A et A311G ont un impact plus important. Ces mutations ont des répercussions sur une séquence d'acides aminés allant du résidu R307 au résidu N318. La perturbation de déplacement chimique du W312 est importante : 0,65 (avec la mutation P310A) et 0,83 (avec la mutation A311G). Pour la mutation P310A, comme observé avec la mutation A311G, la résonance NH de la chaîne latérale du W312 est superposée à celle du W325 confirmant que la mutation P310A casse aussi le motif structural et que la proline P310 est impliquée dans le motif structural $\text{P}^{310}\text{W}^{312}$ -turn. Pour les autres mutations P-A, la répercussion est plus faible, mais on peut observer que la perturbation se propage toujours dans la région 310-320. Ceci est particulièrement visible pour le mutant P319A (Figure 107 F). Sans structure locale, l'effet des mutations ponctuelles serait limité à 1 ou 2 acides aminés de chaque côté du résidu muté. Cette analyse permet de mettre en évidence l'impact et la répercussion de chaque mutation et de confirmer que le motif structural *PW-turn* au sein de NS5A-D2, décrit précédemment à l'aide du modèle peptidique, s'étend plus loin dans la zone 310-320. De plus les analyses de relaxation (^{15}N R2, nOe hétéronucléaire ^1H - ^{15}N) mettent en évidence une rigidité plus importante de cette même zone (Figure 71). Nous avons également pu identifier des contacts longues distances au sein de NS5A-D2 entre les extrémités N- et C-terminales et la zone 306-320 (Figure 78). On en déduit que les résidus P310 et W312 sont essentiels dans une microstructure composée d'une dizaine de résidus (310-320).

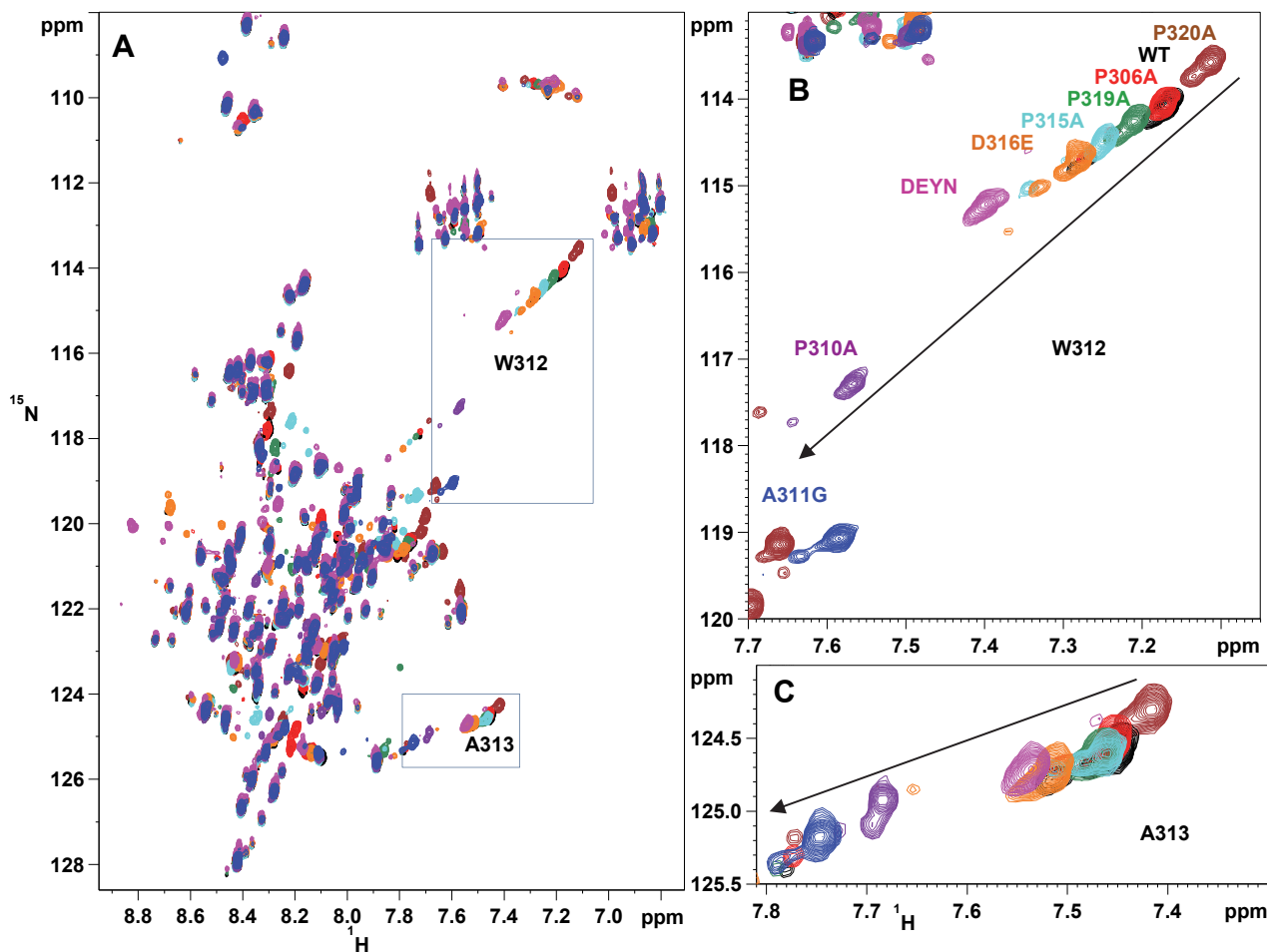


Figure 105. Comparaison entre les spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 Wild Type et mutés. Superposition du spectre de référence, NS5A-D2 WT (noir) avec les mutants P320A (marron), P306A (rouge), P319A (vert), P315A (cyan), D316E (orange), DEYN (rose), P310A (violet) et A311G (bleu). A, spectres entiers. B, Détails des spectres sur les résonances du W312. C, Détails des spectres sur les résonances de l'A313.

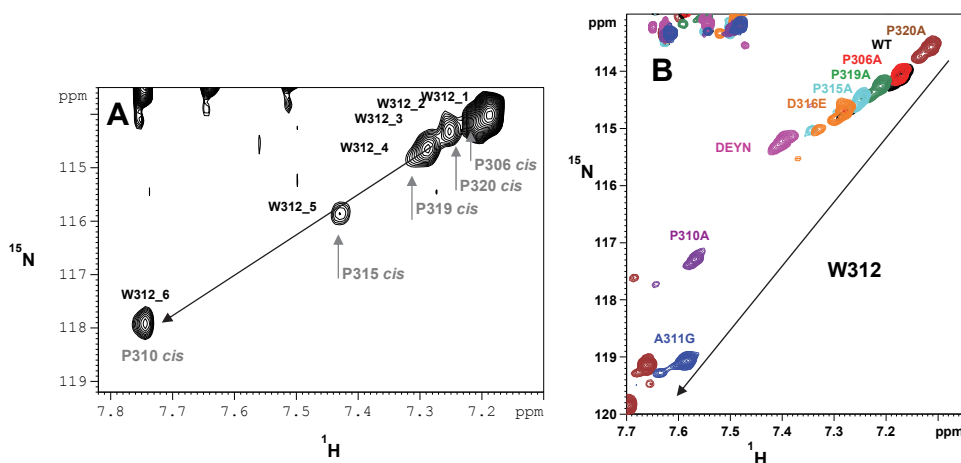


Figure 106. Pour chaque mutant de NS5A-D2, la perturbation de déplacement chimique de la résonance du W312_1 suit la même ligne que celle identifiée pour les formes minoritaires du W312 sur le spectre HSQC. A, Détails du spectre HSQC de NS5A-D2 WT sur les résonances du W312. B, Superposition des spectres HSQC des mutants de NS5A-D2 (comme défini sur la figure précédente Figure 105B).

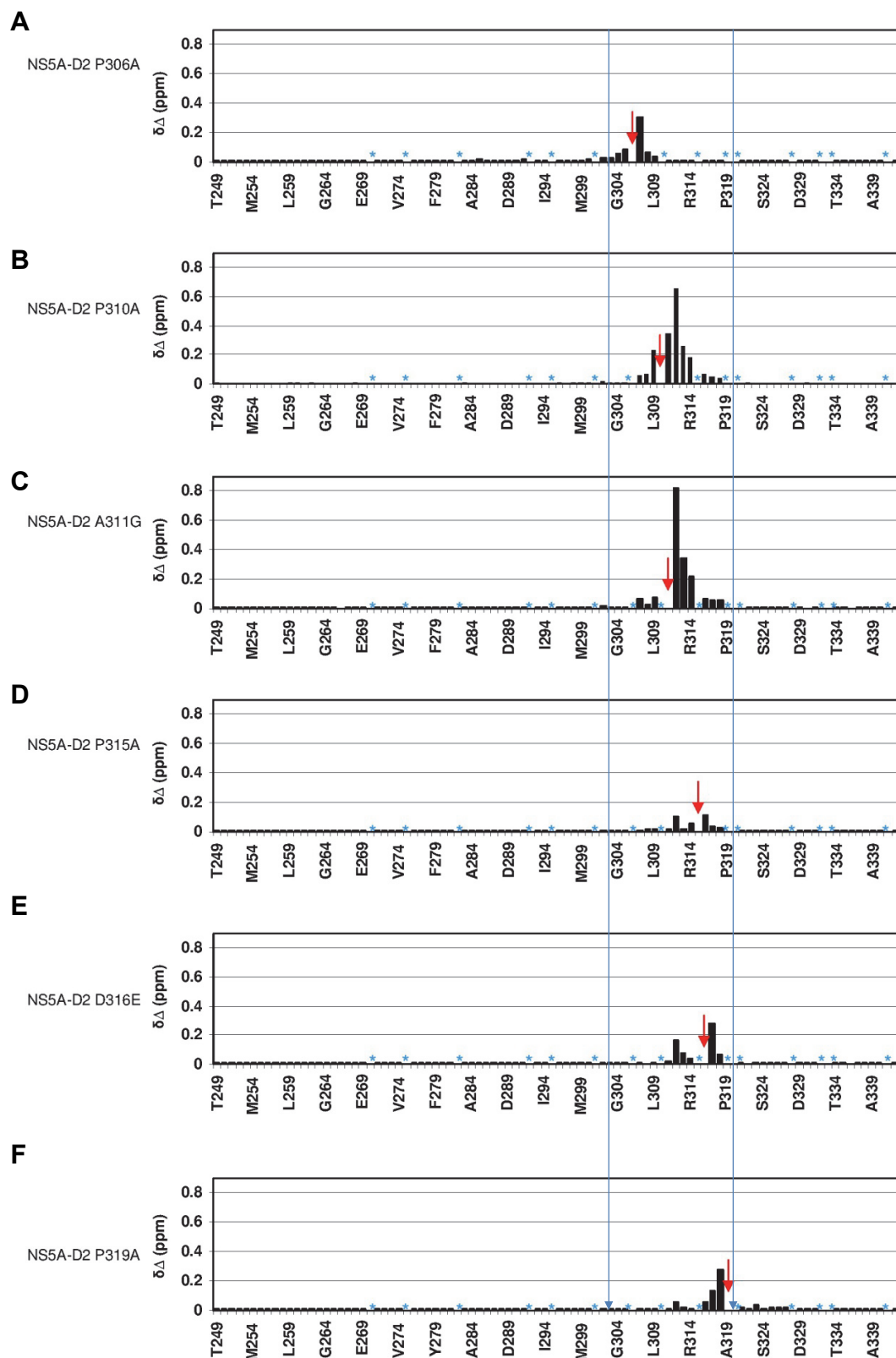


Figure 107. Perturbations de déplacements chimiques combinés en ^1H et ^{15}N par rapport à NS5A-D2 Wild Type dues aux mutations P306A (A), P310A (B), A311G (C), P315A (D), D316E (E), P319A (F). La flèche indique la mutation sur la séquence primaire en acides aminés. Les étoiles indiquent les prolines absentes sur les spectres HSQC, et où une valeur $\delta\Delta$ de 0 ppm a été fixée arbitrairement.

Plusieurs données expérimentales nous permettent d'étayer l'hypothèse que l'extension du motif $^{310}\text{PAWA}^{313}$ jusqu'au résidu 320 adopterait une conformation de type polyproline. Ce type de structure est difficile à caractériser, il n'existe pas de contact NOE caractéristiques pour ce type de conformation. Nous avons essayé de caractériser cette conformation en réalisant des mesures de couplages dipolaires résiduels $C_\alpha-C_o$ et $H_\alpha-C_\alpha$ sur le domaine entier NS5A-D2 (JFH1) $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$, permettant d'obtenir des informations sur l'orientation des prolines, cependant la sensibilité des spectres RDC n'était pas suffisante au niveau de la zone 304-320, en effet le rapport signal/bruit de cette région est toujours significativement plus faible en raison de la rigidité plus importante de cette zone. Des essais de RDC $C_\alpha-C_o$ et $H_\alpha-C_\alpha$ seront réalisés sur le peptide doublement marqué $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ pepD2(JFH1) à une concentration élevée afin d'obtenir une meilleure sensibilité. Si les résultats sont concluants, ces données seront ajoutées dans le protocole de modélisation sous contraintes expérimentales et permettront de caractériser avec précision la totalité du motif structural au sein de NS5A-D2 (JFH1).

Les conformations des domaines NS5A-D2 WT et mutés en P310A, et P315A ont également été caractérisées par dichroïsme circulaire (CD). Les spectres CD des domaines NS5A-D2 WT et mutants présentés dans la Figure 108 montrent tous une large bande négative à 198 nm qui est caractéristique de domaines intrinsèquement désordonnés. Une bande négative à 198 nm est également caractéristique de structure de type polyproline. De façon intéressante, on peut remarquer qu'en présence de la mutation P310A la contribution de la bande négative à 198 nm est moins importante par rapport au Wild Type. Ce changement de conformation ne peut pas s'expliquer par une perte de la contribution *random coil* étant donné que la mutation P310A casse le motif structural *PW-turn*, l'hypothèse la plus plausible est que cette mutation déstabilise une conformation de type polyproline dans cette région.

En conclusion, la caractérisation du motif structural (paragraphe 2.3.2), les analyses de dichroïsme circulaire ainsi que l'analyse de la perturbation de déplacements chimiques induit par chaque mutant de NS5A-D2 JFH1, indiquent que le motif structural au sein de NS5A-D2 n'est pas limité aux résidus $^{310}\text{PAWA}^{313}$ qui définissent le *PW-turn*. Il s'étendrait jusqu'au résidu P320, probablement dans une conformation de type polyproline, et serait caractérisé par un *stacking* entre le C_β du W312, la chaîne latérale Y317 et les prolines P319 et P320.

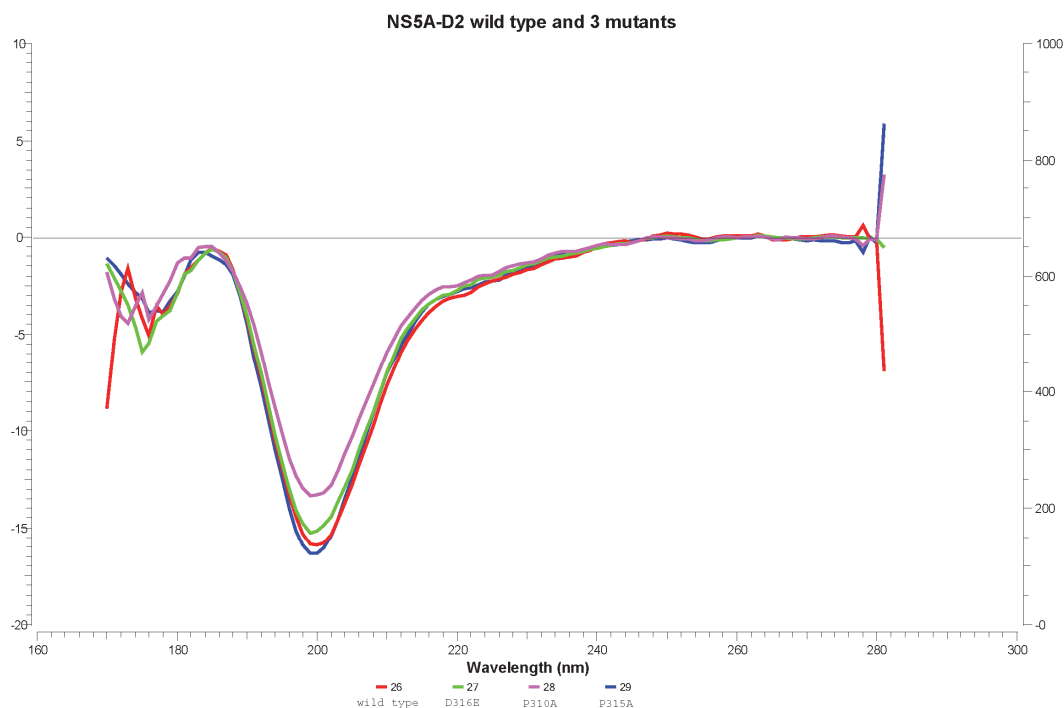


Figure 108. Analyse par dichroïsme circulaire de NS5A-D2 WT (rouge), NS5A-D2 D316E (vert), NS5A-D2 P310A (rose) et NS5A-D2 P315A (bleu).

2.5.4 Caractérisation des formes minoritaires du W312 de NS5A-D2 WT

Les mutations proline-alanine au sein de NS5A-D2 nous ont permis de délimiter l'étendue du motif structural du résidu P310 au résidu P320. Ceci nous a également permis d'attribuer chacune des résonances de plus faible intensité du W312 (W312_2, W312_3, W312_4, W312_5, W312_6) à une forme minoritaire du W312 lorsqu'une proline est conformation *cis*. Ces formes minoritaires étant visibles sur le spectre RMN, elles sont dues à des équilibres *cis/trans* lents de proline sur l'échelle de temps de la RMN (de l'ordre de la minute). Les formes minoritaires ainsi que la forme majoritaire du W312 sont retrouvées le long d'une ligne sur le spectre HSQC (Figure 106), ceci suggère que chaque pic (chaque forme minoritaire) correspondrait à un échange rapide entre deux formes dont les pics sont aux extrémités de la ligne, dont la position n'est pas connue et n'est pas visible sur le spectre HSQC. Dans l'hypothèse d'un échange rapide, $k_{ex} \gg \Delta\omega$, comme rappelé dans l'introduction, on observe un pic dont la position dépend du ratio des populations de A et B correspondant à deux états (aux extrémités de la ligne) en échange (section 7.6 de l'introduction). Plusieurs données expérimentales nous permettent d'ettayer l'hypothèse que la forme majoritaire du W312, en haut à droite de la ligne correspond à un état structuré du motif et la forme minoritaire W312_6, en bas à gauche de la ligne, correspond à une forme non structurée.

2.5.4.1 Déplacements chimiques ^1H , ^{15}N , ^{13}C

Nous avons calculé pour chacune des formes minoritaires du W312, les écarts entre les valeurs de déplacements chimiques ^1H , ^{15}N mesurées expérimentalement et les valeurs ncIDP prédite à partir de la séquence primaire. On observe une corrélation linéaire entre la diminution de l'écart entre les déplacements chimiques expérimentaux $^1\text{H}^{15}\text{N}$ et les prédictions ncIDP en fonction de la position de la forme minoritaire sur la ligne du spectre HSQC (Figure 109). Ainsi, plus la forme minoritaire du W312 sur la ligne possède des déplacements chimiques $^1\text{H}^{15}\text{N}$ élevés (en bas à gauche sur la ligne du spectre ^1H - ^{15}N HSQC), plus les valeurs de déplacements chimiques ^1H , ^{15}N des formes minoritaires du W312 sont proches des valeurs *random coil*.

Les déplacements chimiques C_α et C_β sont indicatifs de structure secondaire. Les spectres HNCACB et HNCOCACB de NS5A-D2 WT (JFH1) ont permis d'extraire les valeurs de déplacements chimiques C_α et C_β de chacune des formes minoritaires du W312 (Figure 110). L'écart entre les déplacements chimiques expérimentaux C_α de chacune des formes minoritaire du W312 et les valeurs prédites ncIDP montre que plus la forme minoritaire du W312 est en bas à gauche la ligne du spectre HSQC (déplacements chimiques ^1H , ^{15}N élevés), plus les déplacements chimiques C_α sont indicatifs d'une conformation non structurée (Figure 111). Ainsi, les valeurs de déplacements chimiques $^{13}\text{C}_\alpha$ et $^{13}\text{C}_\beta$, indicatifs de structures secondaires, se déplacent graduellement vers des valeurs *random coil* en fonction de la position de la forme minoritaire du W312 sur la ligne du spectre HSQC.

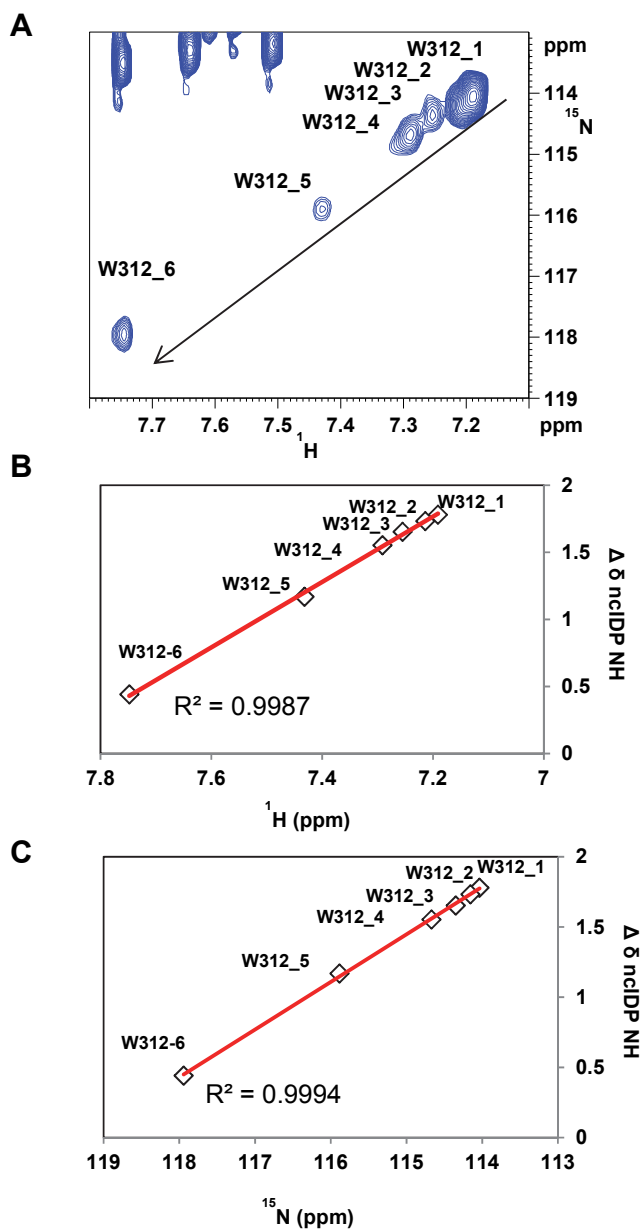


Figure 109. Evolution des déplacements chimiques NH de chaque forme minoritaires du W312 en fonction de leur position sur le spectre HSQC. A, Détails du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT sur les résonances du W312. B, C, Ecart entre les déplacements chimiques combinés NH expérimentaux et les prédictions nclDP ($\Delta\bar{\delta} = |\Delta\delta(^1\text{H})| + 0,2 |\Delta\delta(^{15}\text{N})|$) pour chaque forme minoritaire du W312 en fonction de leur déplacements chimiques protons (B) et azote (C). La ligne rouge correspond à la courbe de tendance linéaire. Plus l'écart par rapport aux prédictions nclDP est faible plus le niveau de structuration est faible. Il existe une corrélation linéaire ($R^2=0.99$) entre la diminution de la valeur $\Delta\bar{\delta}$ nclDP NH et la position de la forme minoritaire sur la ligne du spectre HSQC.

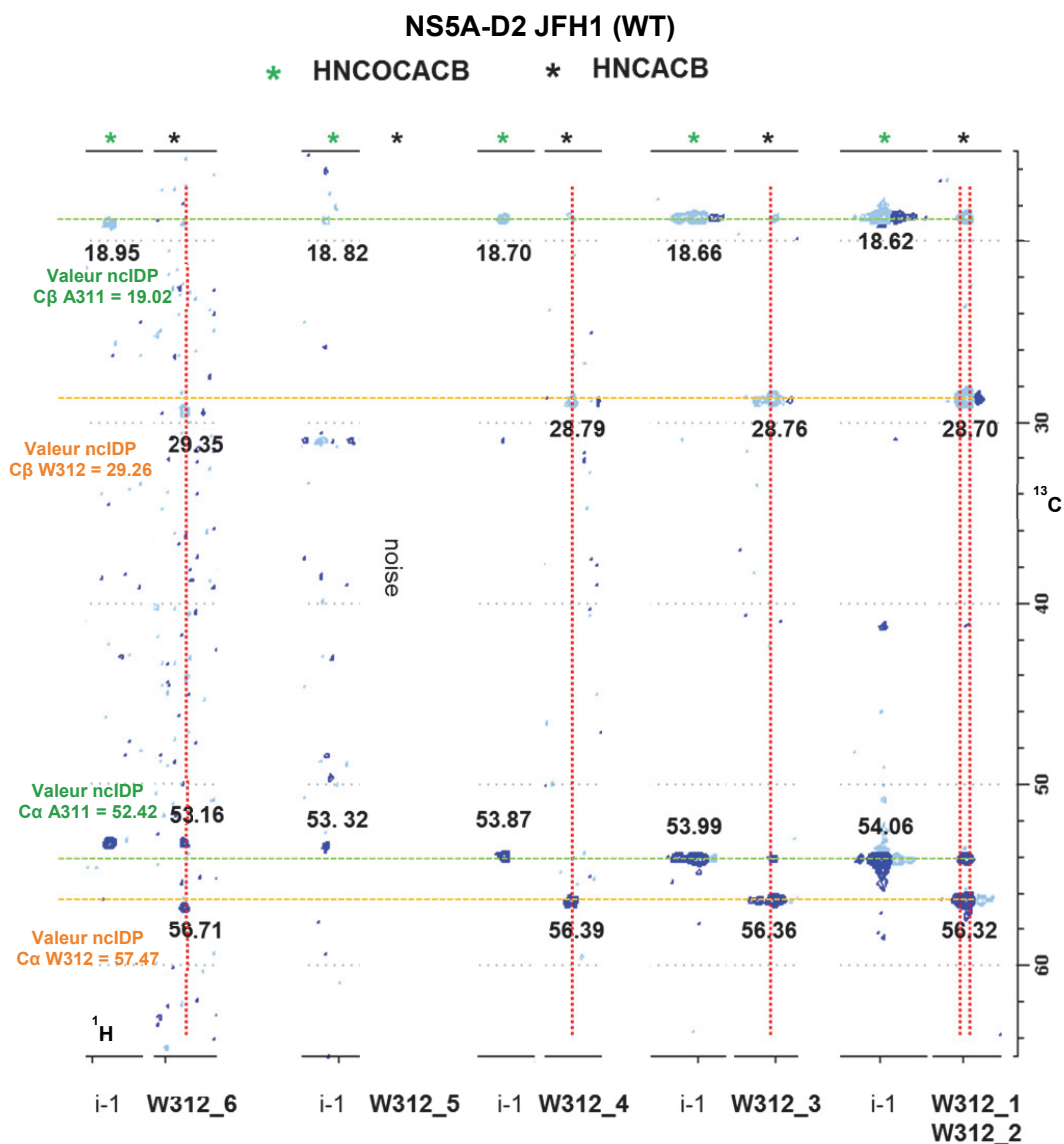


Figure 110. Plans ^1H , ^{13}C extraits à la fréquence ^{15}N des expériences tridimensionnelles HNCACB (*) HNCOCACB (*) aux déplacements chimiques des protons amides des différentes résonances du W312. Les lignes horizontales en pointillé orange indiquent les déplacements chimiques C_α (en bas) et C_β (en haut) des différentes formes du W312 et les lignes horizontales en pointillés vert indiquent les déplacements chimiques C_α (en bas) et C_β (en haut) du résidu i-1 (A311). Les valeurs nciDP C_α et C_β du W312 et de l'A311 sont indiquées sur la figure.

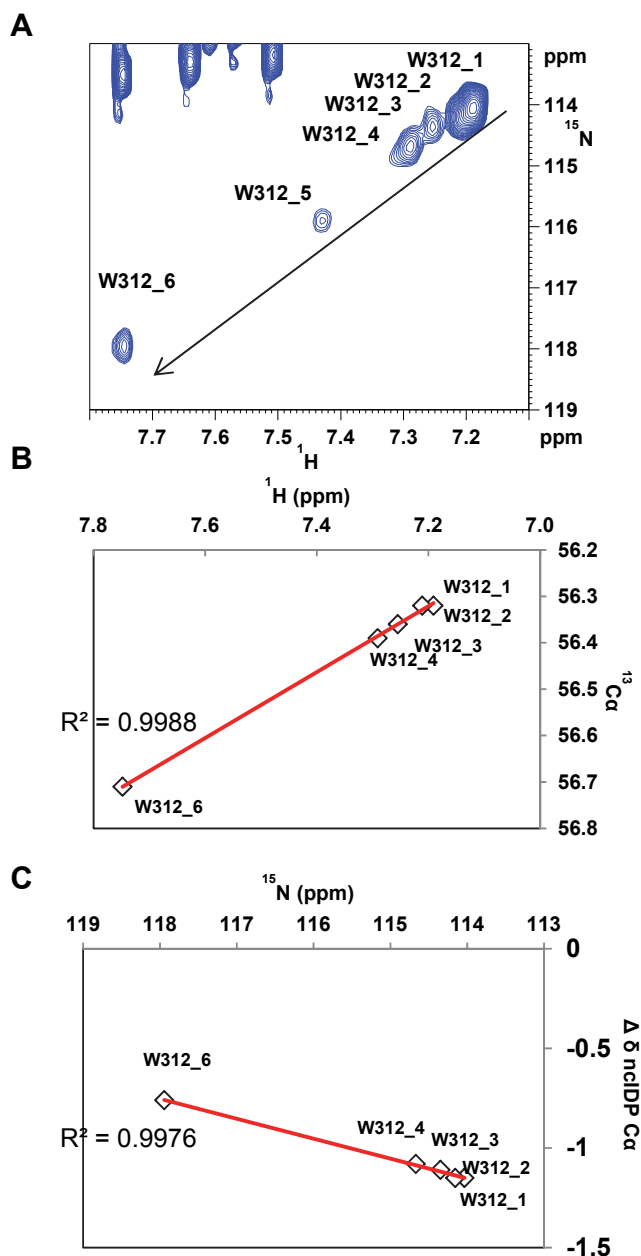


Figure 111. Evolution des déplacements chimiques $^{13}\text{C}_\alpha$ de chaque forme minoritaires du W312 en fonction de leur position sur le spectre HSQC. A, Détails du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (JFH1) sur les résonances du W312. B, Déplacements chimiques $^{13}\text{C}_\alpha$ des formes du W312 en fonction de leur déplacement chimique ^1H . C, Ecarts de déplacement chimique combiné C_α par rapport aux prédictions nclDP en fonction des déplacements chimiques azote de chacune des formes minoritaires. La ligne rouge correspond à la courbe de tendance linéaire. Plus l'écart par rapport aux prédictions nclDP est faible plus le niveau de structuration est faible. Il existe une corrélation linéaire ($R^2=0.99$) entre la diminution de la valeur $|\Delta\delta \text{ nclDP } C_\alpha|$ et la position de la forme minoritaire sur la ligne.

2.5.4.2 RDC

La présence de couplages dipolaires résiduels (RDC) révèle la présence de structures résiduelles au sein de la protéine. Le couplage dipolaire résiduel RDC_{NH} a également été mesuré pour chacune des formes minoritaires du W312. Plus la forme minoritaire du W312 possède des déplacements chimiques 1H , ^{15}N élevés (en bas à gauche sur la ligne du spectre HSQC), plus le couplage dipolaire résiduel RDC_{NH} diminue (Figure 112).

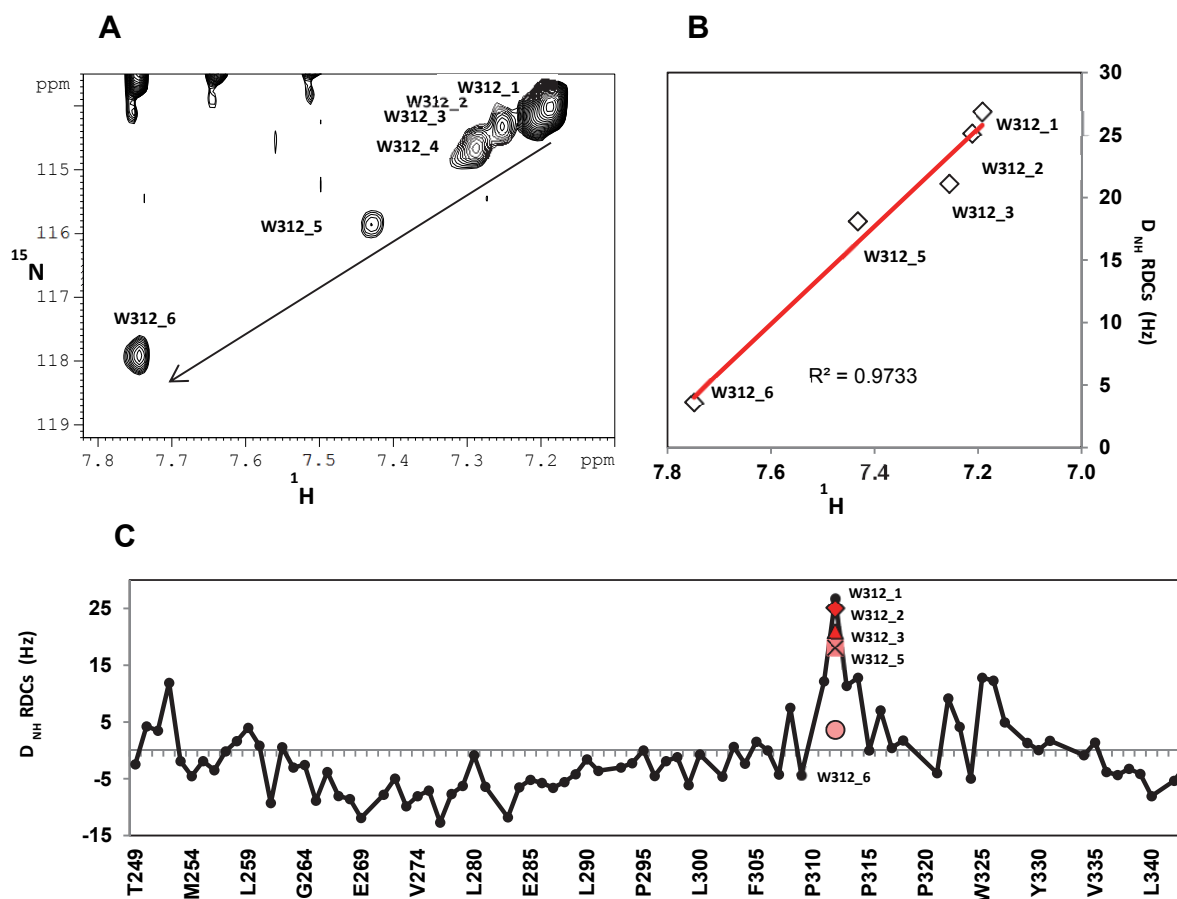


Figure 112. Evolution des RDC_{NH} des formes minoritaires du W312 en fonction de leur position sur le spectre HSQC. A, Détail du spectre HSQC de NS5A-D2 sur les résonances du W312. B, RDC_{NH} des formes minoritaires du W312 en fonction de leurs déplacements chimiques 1H . La courbe de tendance linéaire est en rouge. C, RDC_{NH} en fonction de la séquence primaire de NS5A-D2 WT (JFH1). Les RDC des formes minoritaires W312_2, W312_3, W312_4, W312_5 et W312_6 sont indiqués par un symbole en rouge. Nous n'avons pas pu déterminer le couplage dipolaire résiduel de la forme minoritaire W312_4 à cause d'une trop faible sensibilité de cette forme minoritaire en présence du milieu d'alignement PEG($C_{12}E_5$)/hexanol.

2.5.4.3 Relaxation R2

Plus une protéine est flexible, plus la valeur du paramètre de relaxation transversal R2 diminue. La relaxation transversale R2 a été mesurée pour chacune des formes minoritaires comme présentée dans le paragraphe (2.2.2.) (Figure 112). La résolution des spectres était insuffisante pour mesurer la relaxation de la forme minoritaire W312_2. La relaxation transversale est plus lente pour les formes minoritaires W312_5 et W312_6 par rapport à la forme majoritaire W312_1, indiquant une conformation plus flexible pour ces formes minoritaires. Les valeurs de R2 plus élevées pour les formes minoritaires W312_3 et W312_4 pourraient éventuellement s'expliquer par un phénomène d'échange dans la gamme de temps de la μ s-ms.

2.5.4.4 Différence de déplacement chimique entre les 2 H β du W312

Sur le spectre ^1H - ^1H TOCSY du peptide pepD2(JFH1), on remarque que les signaux des deux H β de chacune des formes minoritaire du W312 sont de moins en moins distincts, de la forme W312_1 vers la forme W312_6 (Figure 114A). Il existe une corrélation entre la position de la forme minoritaire sur la ligne du spectre HSQC et la diminution de la différence en déplacement chimique entre les deux H β du W312, $\Delta\omega_{\text{H}\beta}$ (Figure 114B). Ceci indique que plus la forme minoritaire du W312 est positionnée sur la ligne en bas à gauche du spectre HSQC (vers des déplacements chimiques ^1H et ^{15}N plus élevés) plus la chaîne latérale du W312 possède une grande mobilité.

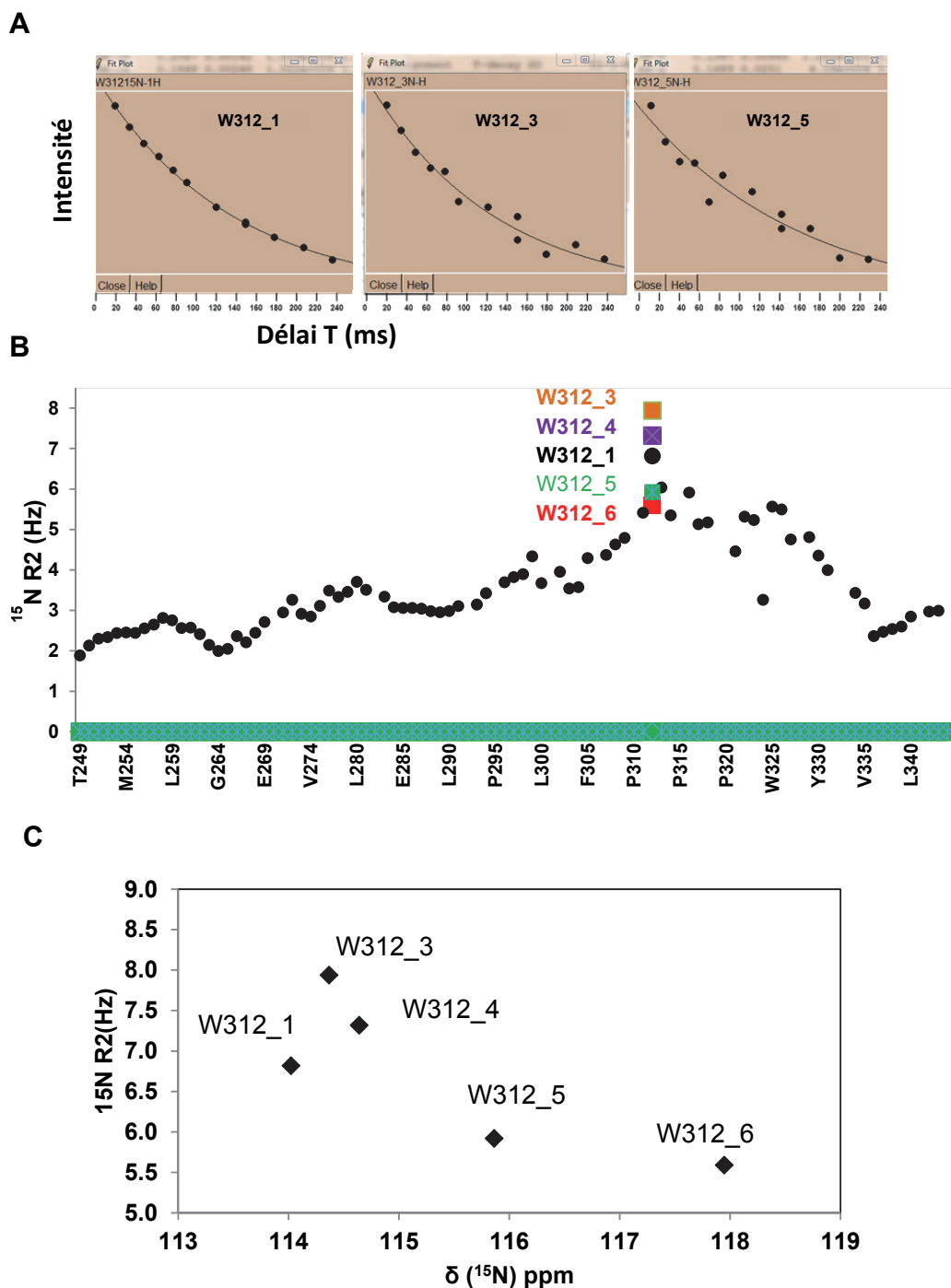


Figure 113. Relaxation transversale ^{15}N R2 des formes minoritaires du W312. A, Courbe de décroissance de l'intensité en fonction des différents délais T permettant d'extraire le taux de relaxation R2, pour le W312_1, W312_3 et W312_5. B, Relaxation transversale ^{15}N R2 réparties le long de la séquence de NS5A-D2 (JFH1). La relaxation ^{15}N R2 des formes minoritaires du W312 est indiquée par un marqueur de couleur. C, Relaxation transversale ^{15}N R2 des formes minoritaires du W312 en fonction de leur déplacement chimique ^{15}N sur le spectre HSQC.

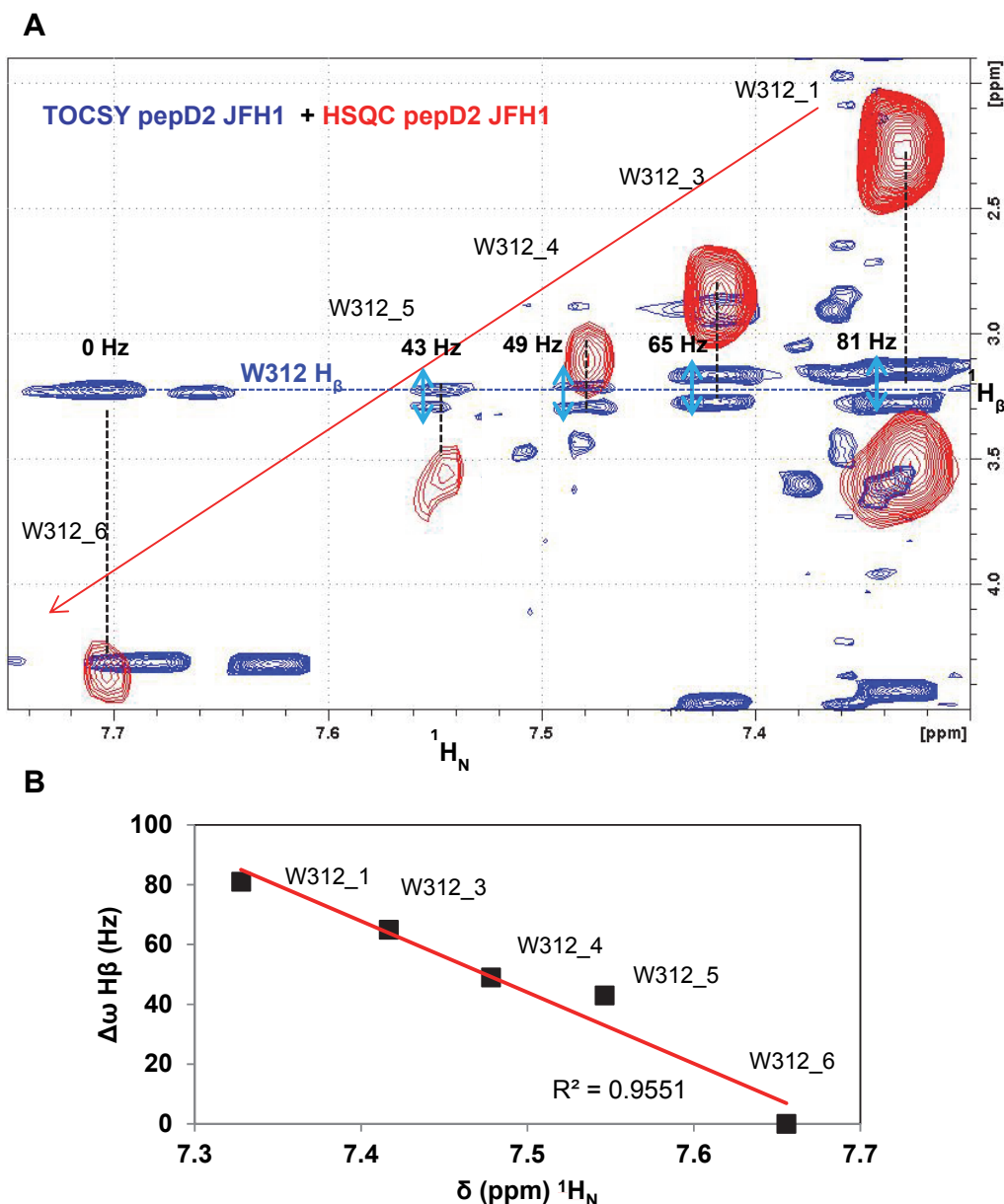


Figure 114. $\Delta\omega$ entre les 2 H_β des formes minoritaires du W312. A, Superposition du spectre ^1H - ^1H TOCSY (bleu) et du spectre ^1H - ^{15}N HSQC (rouge) du peptide pepD2(JFH1), centrés sur les résonances du W312. Différence de déplacement chimique en Hz ($\Delta\omega$) entre les deux H_β des formes minoritaires du W312 sont indiquées sur la figure. B, $\Delta\omega$ entre les deux H_β des formes minoritaires du W312 en fonction de leur déplacement chimique proton sur le spectre HSQC.

Tous les paramètres RMN mesurés précédemment (déplacements chimiques ^1H , ^{15}N , ^{13}C , RDC_{NH} , relaxation transversale R2 , différence de déplacement chimique entre les 2 H_β du W312) montrent que chaque forme minoritaire du W312, en partant du W312_1 vers le W312_6, correspond à un degré d'altération croissant du motif. Ces formes minoritaires correspondent au W312 lorsqu'une des prolines voisines (P306, P310, P315, P319, P320) est en conformation *cis*. Cela signifie que l'isomérisation *cis/trans* des prolines a tendance à déstabiliser le motif structural $^{310}\text{PAWA}^{313}$ que nous avons identifié auparavant. Par exemple, la forme minoritaire

W312_6 (qui a été attribué au W312 lorsque la P310 du PW-*turn* est en conformation *cis*) possède un faible couplage dipolaire résiduel D_{NH} , une relaxation ^{15}N R2 lente, des déplacements chimiques identiques pour les 2 H β , ainsi que des déplacements chimiques 1H , ^{15}N , ^{13}C caractéristiques d'un domaine désordonné. Ainsi lorsque la P310 est en conformation *cis* cela casse le PW-*turn*. Plus la proline en conformation *cis* est proche du W312 impliqué dans le motif structural, plus le motif PW-*turn* est déstabilisé et les paramètres mesurés tels que les déplacements chimiques, les RDC_{NH} , les paramètres de relaxation R2, tendent vers des valeurs *random coil*.

Etant donné que toutes les formes minoritaires du W312 sont retrouvées le long d'une ligne sur le spectre HSQC, cela évoque un échange rapide entre deux états (un état structuré en haut à droite de la ligne et un état non structuré en bas à droite de la ligne) dont les fréquences de résonances sont aux extrémités de la ligne et dont la position n'est pas connue. Dans l'hypothèse d'un échange rapide, chaque forme du W312 (correspondant au W312 lorsque toutes les Pro sont en conformation *trans* pour W312_1, ou lorsqu'une proline est en conformation *cis* pour les formes minoritaires) serait en équilibre entre un état structuré et un état non structuré de la séquence $^{310}PAWA^{313}$, et dont la position dépend du ratio de population entre l'état structuré et non structuré. De plus la valeur du paramètre R2 de la forme majoritaire du W312_1 est beaucoup plus élevée par rapport aux valeurs de R2 des autres résidus de NS5A-D2 (Figure 113B). Ceci peut indiquer un mécanisme supplémentaire contribuant à la relaxation transversale et correspondant à un échange conformationnel du W312 dans la gamme de la μ s-ms, apportant une contribution supplémentaire à R2, appelé $R2_{\text{échange}}$.

2.5.4.5 Analyse de la dispersion de relaxation

Nous avons alors émis l'hypothèse que l'échange rapide entre la forme structurée du W312 et la forme non structurée du W312 se réalise sur une échelle de temps de l'ordre de la μ s-ms. Afin de mettre en évidence cet échange, des mesures de dispersion de relaxation CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) ont été réalisées sur ^{15}N NS5A-D2 (JFH1). Les premières expériences CPMG que nous avons effectuées ont été réalisées à 800 MHz, 25°C, avec un délai de 40 ms permettant de déterminer la valeur R2 et 10 pulses de fréquences CPMG allant de 0 à 3000 Hz (Figure 115). Pour certains résidus, le paramètre R2 reste constant en fonction de la fréquence CPMG alors que pour d'autres résidus, comme le W312, il varie de manière aléatoire ce qui ne nous a pas permis de mettre en évidence un échange sur cette échelle de temps. Cette variation aléatoire pourrait être la conséquence d'un mauvais rapport signal/bruit. Nous avons alors effectué d'autres tests en

essayant d'améliorer le rapport signal/bruit des expériences, soit en augmentant le nombre de délais afin de déterminer plus précisément le paramètre R_2 , soit en réalisant ces expériences sur le peptide pepD2(JFH1) ^{15}N concentré à 1 mM. Cependant ces résultats n'ont pas été concluants.

Nous avons estimé la vitesse de l'échange du W312 entre les deux conformations afin de comprendre pourquoi la dispersion de relaxation n'a pas été mise en évidence. La relaxation due à l'échange, $R_{2\text{échange}}$, entre deux états A et B s'exprime selon cette formule :

$$R_{2\text{échange}} = \frac{(P_A \times P_B \times \Delta\omega^2)}{k_{\text{échange}}}$$

Où P_A et P_B représentent les populations de A et de B, $\Delta\omega$ représente la différence de déplacements chimiques en Hz entre les états A et B et $k_{\text{échange}}$ la vitesse due à l'échange. Soit A et B, deux états extrêmes de la ligne du W312 en haut à droite et en bas à gauche respectivement. De manière très approximative, il est possible d'estimer à partir de l'intensité des pics W312_1 et W312_6, les populations A et B dont la position n'est pas connue. Bien qu'on ne peut mesurer directement P_A et P_B , on peut estimer P_A à 80%, P_B à 20%, la relaxation due à l'échange ($R_{2\text{échange}}$) peut être estimée à environ 5Hz (31,4 rad/s) d'après l'écart de la valeur de R_2 du W312 par rapport à la tendance du R_2 des autres résidus, et le $\Delta\omega$ est de l'ordre de 2512 rad/s en azote. Donc on en déduit que la vitesse d'échange $k_{\text{échange}}$ serait d'environ 200 000 Hz, on serait donc dans le cas d'un échange très rapide de l'ordre de 5 μs . Pour pouvoir observer cet échange il faudrait donc réaliser des expériences CPMG à des fréquences CPMG au-delà de 200 00 Hz, or la séquence d'impulsion des expériences CPMG n'est pas adaptée à des fréquences CPMG aussi élevées. Le système étudié serait probablement trop rapide pour être étudié par ces expériences. Afin de contourner ce problème nous avons enregistré des expériences CPMG à 4°C pour ralentir l'échange mais là encore les expériences ne se sont pas révélées concluantes. Même si nous n'avons pas pu analyser, par des expériences de dispersion de relaxation, l'échange rapide entre les deux conformations, structurée et non structurée du W312, l'observation des déplacements chimiques ^{15}N et ^1H des différentes résonances du W312 sur une ligne constitue une preuve suffisante d'un échange rapide entre deux conformations sur l'échelle de temps de la RMN. Le même phénomène de déplacements chimiques linéaires a été observé dans d'autres études RMN (Ruschak and Kay, 2012; Tzeng and Kalodimos, 2012; Volkman et al., 2001). Les auteurs ont interprété ce phénomène comme étant un échange rapide entre deux états ou deux conformations.

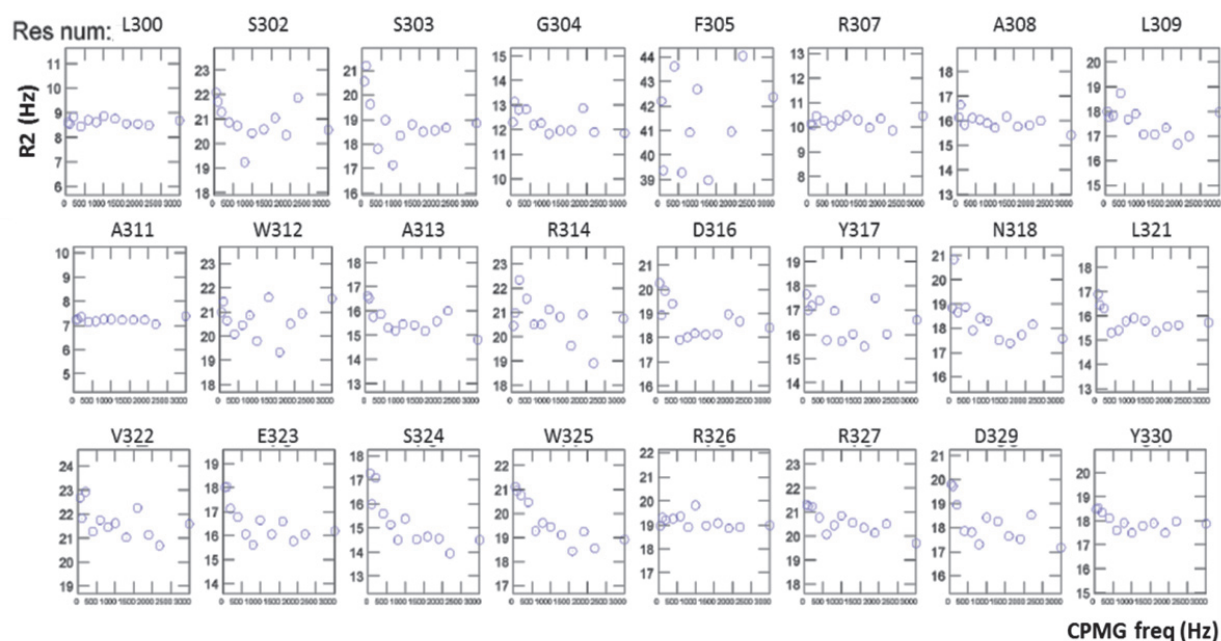
¹⁵N NS5A-D2 (JFH1) WT

Figure 115. Expériences CPMG sur ¹⁵N NS5A-D2 (JFH1) WT à 800 MHz à 298K. Les expériences ont été effectuées avec un délai de 40 ms et 10 pulses fréquences CPMG de 0 à 3000 Hz.

2.5.4.6 Effets de la température et du sel (NaCl)

Des expériences RMN en fonction de la température et de la concentration en sel (NaCl) permettent de renforcer l'hypothèse d'un échange rapide entre une conformation structurée et non structurée du motif ³¹⁰PAWA³¹³.

➤ Effet de la température

La superposition des spectres ¹H-¹⁵N HSQC de NS5A-D2 WT (JFH1) enregistrés à différentes températures (277K → 315K) induit une variation des déplacements chimiques et de la largeur de raie (Figure 116A). Une augmentation de la température induit une augmentation des interactions hydrophobes, néanmoins à des températures supérieures à 45°C, les interactions hydrophobes sont réduites. Nous n'avons donc pas dépassé 42°C pour ne pas réduire les interactions hydrophobes. Afin de pouvoir analyser au mieux l'effet de la température sur les formes minoritaire du W312, les spectres sont superposés sur la forme majoritaire du W312 (Figure 116 B). On remarque que les formes minoritaires subissent une perturbation de déplacement chimique toujours sur la même ligne. De plus, la différence de déplacement chimique, $\Delta\omega$, entre la forme majoritaire W312_1 et la forme minoritaire W312_6 diminue quand la température augmente

(Figure 116 C). On peut donc émettre l'hypothèse que les positions des deux états extrêmes sur le spectre HSQC (conformation structurée et conformation non structurée) se rapprochent en augmentant la température. Étant donné qu'une augmentation de la température favorise les interactions hydrophobes, et que le *PW-turn* est un motif structural caractérisé par des interactions hydrophobes, on peut émettre l'hypothèse que la population de conformation non structurée diminue aux profits de la conformation structurée lorsque la température augmente.

➤ Effet de la concentration en NaCl

Une augmentation de la concentration en NaCl induit une diminution des interactions électrostatiques et une augmentation des interactions hydrophobes. La superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (JFH1) à des concentrations croissantes en NaCl (5 mM \rightarrow 400 mM) montre que la majorité des pics ne subit pas de perturbations de déplacements chimiques, excepté pour le W312 et l'A313 ainsi que leurs formes minoritaires. Une fois encore, les différents pics du W312 ont des déplacements chimiques perturbés sur la même ligne identifiée précédemment sur le spectre HSQC. Quand la concentration en NaCl augmente, les déplacements chimiques du W312 et de ses formes minoritaires tendent vers des déplacements chimiques moins élevés à la fois en ^{15}N et ^1H (en haut à droite de la ligne), indicatifs d'une conformation plus structurée, indiquant une augmentation des interactions hydrophobes au niveau du motif structural *PW-turn*. En augmentant la concentration en NaCl, la population de la conformation structurée augmenterait aux dépens de la conformation non structurée. Cette expérience de titration en NaCl permet également de montrer que la position exacte des deux conformations en échange aux extrémités de la ligne n'est pas connue. En effet, en augmentant la concentration en NaCl, il est possible d'avoir un niveau de structuration plus élevé du W312. Donc la position de la forme majoritaire W312_1 ne correspond pas à la position extrême de la ligne (en haut à droite du spectre HSQC), mais à une position intermédiaire qui dépend du ratio de population entre l'état structuré et l'état non structuré.

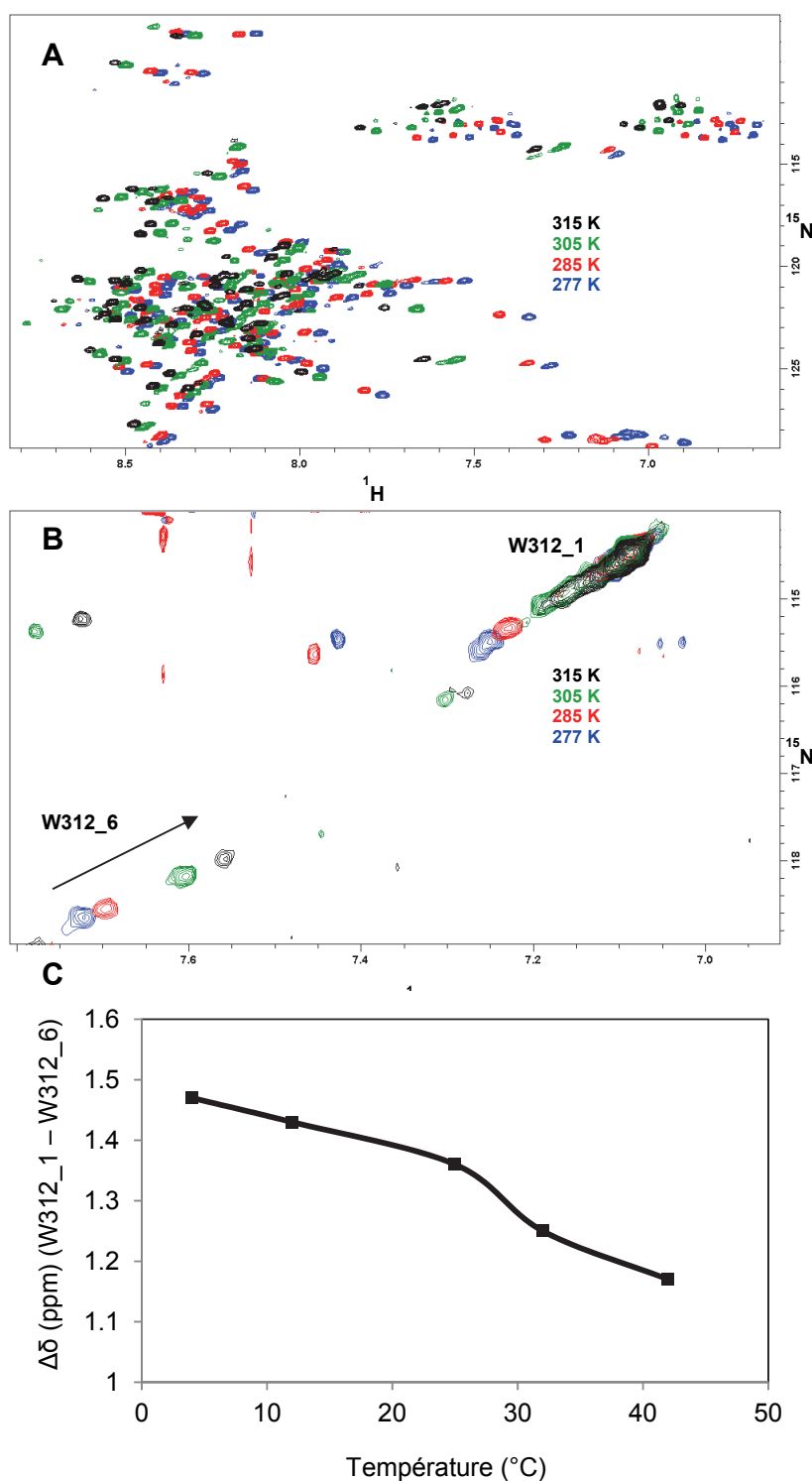


Figure 116. Effet de la température sur NS5A-D2 WT (JFH1). A, Spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (JFH1) enregistrés à différentes températures : 277 K en bleu, 285 K en rouge, 305 K en vert et 315 K en noir. B, Détails des spectres sur les résonances du W312, les spectres à différentes température sont superposés artificiellement sur la forme majoritaire du W312 du spectre à 277 K afin de visualiser plus facilement l'impact de la température sur les formes minoritaires du W312. C, Pour chaque spectre aux différentes températures, l'écart de déplacement chimique combiné NH entre la forme majoritaire du W312_1 et la forme minoritaire du W312_6 est calculée selon cette formule $\Delta\delta = |\Delta\delta(^1\text{H})| + 0.2 |\Delta\delta(^{15}\text{N})|$ où $\Delta\delta(^1\text{H})$ et $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ représentent la différence entre les déplacements chimiques du W312_1 et du W312_6 en ^1H et ^{15}N . Cet écart est tracé en fonction de la température.

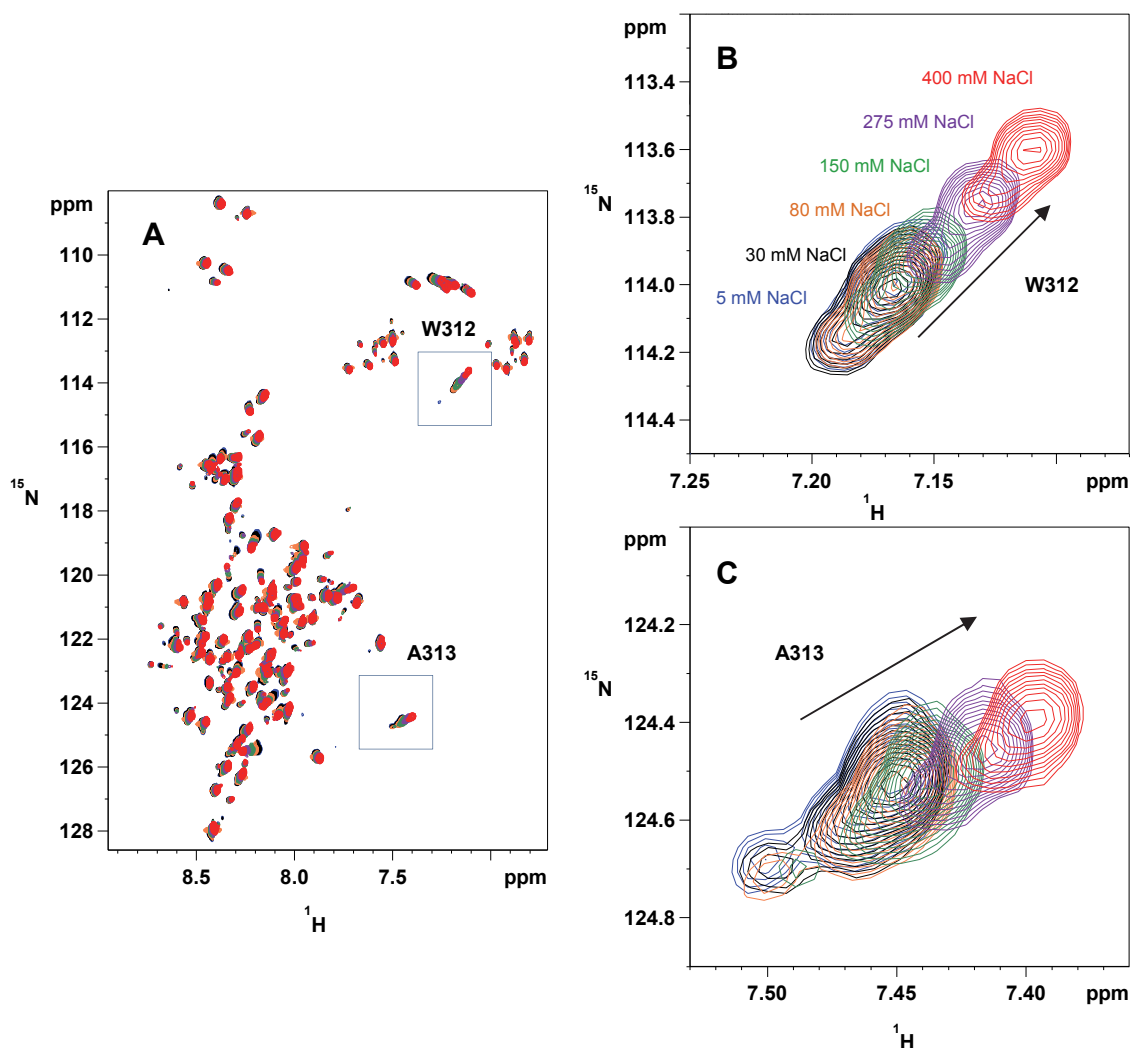


Figure 117. Effet de la concentration en NaCl sur NS5A-D2 WT (JFH1). Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (JFH1) enregistrés à différentes concentrations en NaCl : 5 mM en bleu, 30 mM en noir, 80 mM en vert, 150 mM en violet et 400 mM en rouge. A Spectres en entiers. B Détails des spectres sur la résonance du W312_1. C Détails des spectres sur la résonance de l'A313_1.

2.6 Les mutants Proline-Alanine modifient l'équilibre du motif *PW-turn* entre un état structuré et un état non structuré

La superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC des mutants proline-alanine et A311G de NS5A-D2 (JFH1) permet également de mettre en évidence une corrélation linéaire des déplacements chimiques ^{15}N et ^1H de la résonance du W312 (Figure 105B). Plus la forme minoritaire du W312 de chaque mutant sur la ligne du spectre HSQC possède des déplacements chimiques en ^1H , ^{15}N élevés (en bas à gauche du spectre), plus l'écart entre les valeurs expérimentales ^1H , ^{15}N du W312 de chaque mutant et les valeurs prédites ncIDP diminue (Figure 118).

La même analyse peut-être réalisée pour les déplacements chimiques ^{13}C qui sont indicatifs de structures secondaires. Les spectres HNCACB et HNCOCACB de NS5A-D2 WT (JFH1) ont permis d'extraire les valeurs de déplacements chimiques C_α et C_β du W312 de chaque mutant Figure 119. Plus le W312 de chaque mutant sur la ligne du spectre HSQC possède des déplacements chimiques en ^1H , ^{15}N élevés (en bas à gauche du spectre), plus l'écart entre les valeurs expérimentales $^{13}\text{C}_\alpha$ du W312 de chaque mutant et les valeurs prédites ncIDP diminue (Figure 120).

Tous les déplacements chimiques ^1H , ^{15}N et ^{13}C du W312 (et des différentes formes minoritaires du W312) des mutants NS5A-D2 (JFH1) sont retrouvés selon une ligne indiquant le degré de structuration du motif (Figure 118 et Figure 119). Ainsi, comme pour la caractérisation structurale des formes minoritaires du W312 (partie 2.5.4), il est possible de faire une corrélation entre la position de la forme majoritaire du W312 de chaque mutant sur la ligne et le niveau de structuration du motif *PW-turn*. Les mutations proline-alanine modifient l'équilibre du motif structural *PW-turn* entre un état structuré et un état non structuré.

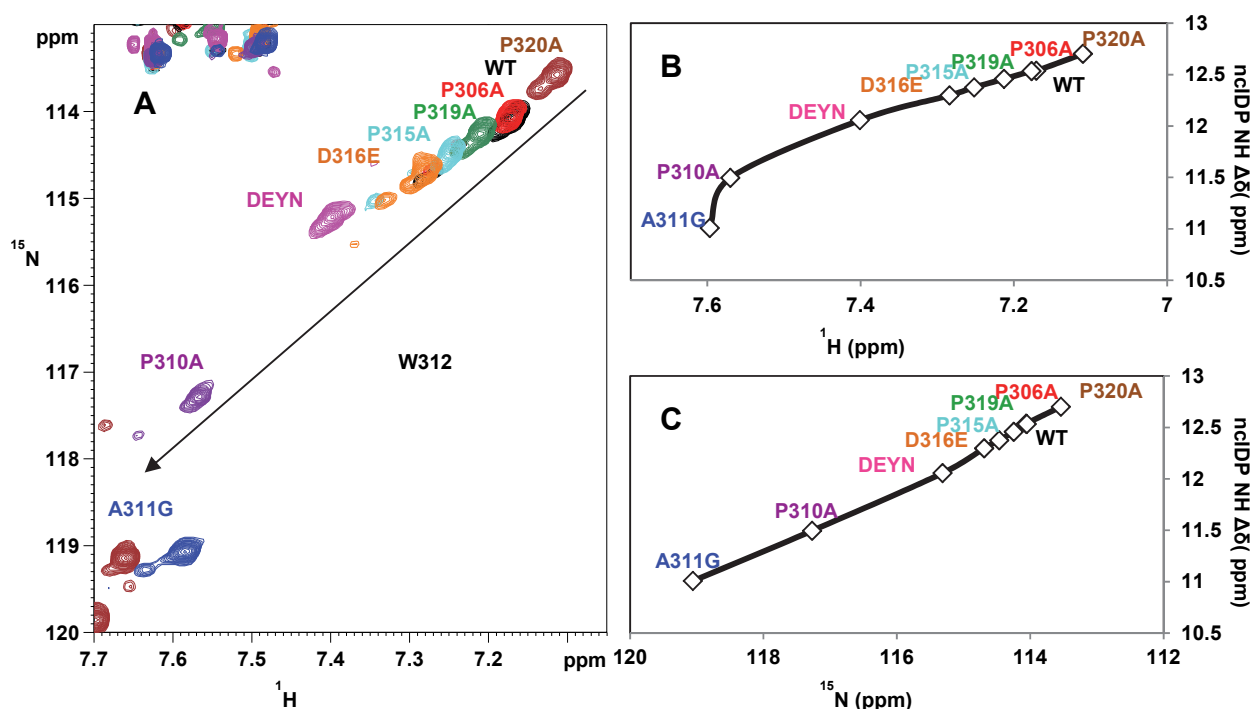


Figure 118. Evolution des déplacements chimiques NH du W312 de chaque mutant de NS5A-D2 en fonction de leur position sur le spectre HSQC. A, Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT et de ces mutants, zoom du spectre sur la résonance du W312. B, C, Ecart entre les valeurs expérimentales en ^1H ^{15}N du W312 de chaque mutant et les valeurs prédites ncIDP (ncIDP NH $\Delta\delta$ (ppm)) tracés en fonction du déplacement chimique ^1H (B) et ^{15}N (C) du W312.

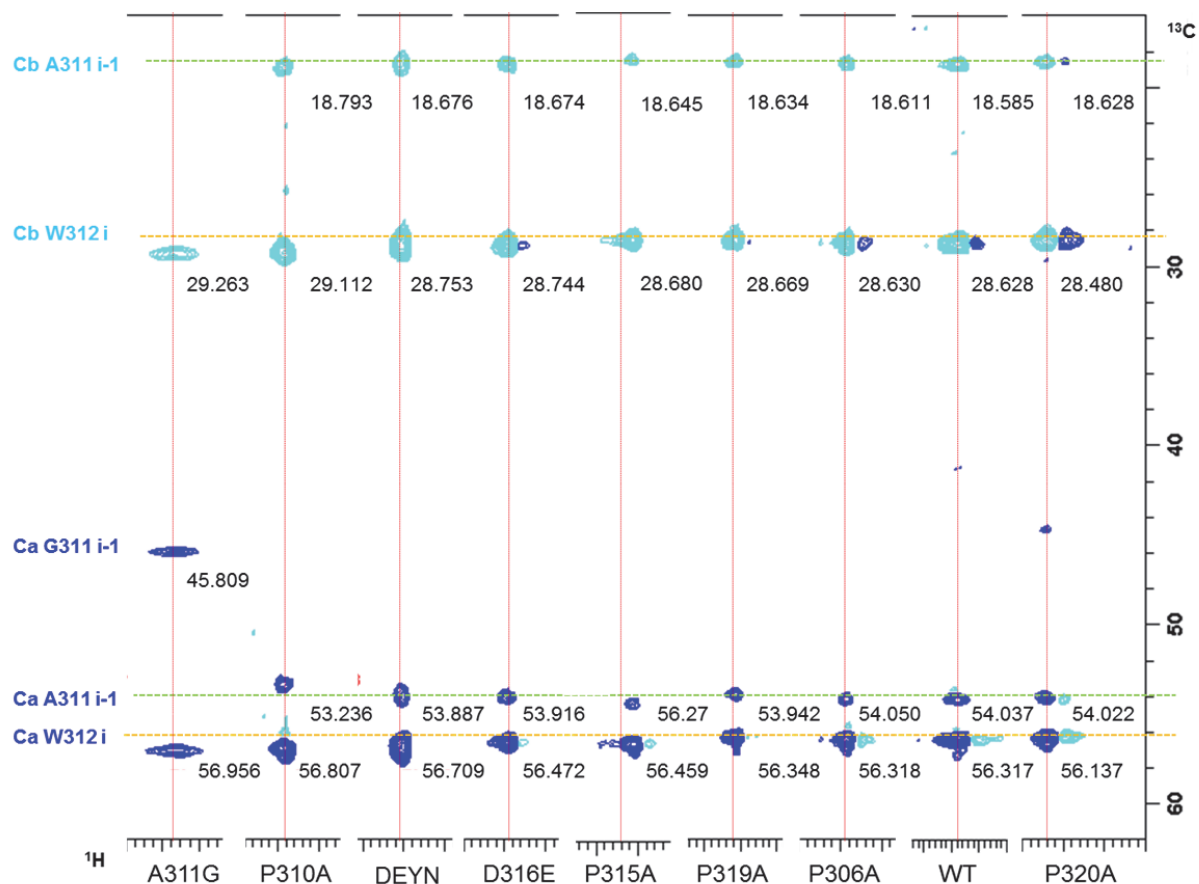


Figure 119. Plans ^1H , ^{13}C extraits à la fréquence ^{15}N de l'expérience tridimensionnelle HNCACB aux déplacements chimiques des protons du W312 de chaque mutant de NS5A-D2. Les lignes horizontales en pointillé orange indiquent les déplacements chimiques C_α (en bas) et C_β (en haut) du W312 et les lignes horizontales en pointillés vert indiquent les déplacements chimiques C_α (en bas) et C_β (en haut) du résidu i-1 (A311).

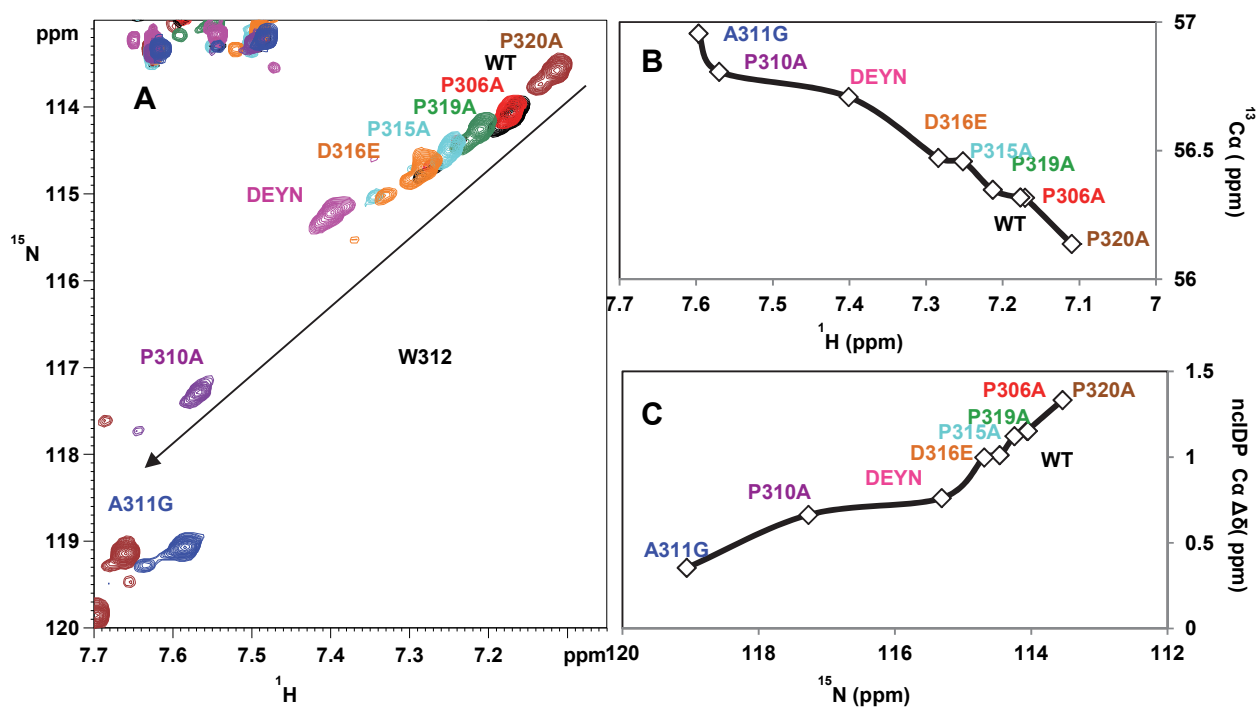


Figure 120. Evolution des déplacements chimiques $^{13}\text{C}_\alpha$ du W312 de chaque mutant de NS5A-D2 en fonction de leur position sur le spectre HSQC. A, Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT et de ces mutants, détails des spectres sur la résonance du W312. B, Déplacement chimique $^{13}\text{C}_\alpha$ du W312 de chaque mutant en fonction de son déplacement chimique ^1H . C, Ecart entre les valeurs expérimentales en $^{13}\text{C}_\alpha$ du W312 de chaque mutant et les valeurs prédites nCIDP (nCIDP $\text{C}_\alpha \Delta\delta$ (ppm)) tracés en fonction du déplacement ^{15}N du W312.

Comme rappelé au paragraphe 2.4, la mutation A311G casse le motif structural, les déplacements chimiques du W312 sont caractéristiques d'une conformation non structurée. Avec ce mutant, la résonance du W312 n'est pas sur la ligne car la mutation A311G est voisine du W312, il y a donc un effet local de séquence en plus d'une altération du motif structural.

Concernant les mutations proline-alanine, plus la proline mutée est proche du W312 dans la séquence primaire, plus la perturbation du motif structural est importante. Avec ces mutants il existe également une disparition d'une forme minoritaire du W312 comme expliqué au paragraphe 2.5.2. La mutation de la proline P310, qui est directement impliquée dans le *PW-turn*, casse de manière drastique le motif. En effet la résonance du W312 possède des déplacements chimiques (^1H , ^{15}N , ^{13}C) proches des valeurs prédites nCIDP (en bas à gauche du spectre).

La mutation P306A, ne modifie pas l'équilibre du *PW-turn* entre la conformation structurée et non structurée, car la forme majoritaire W312_1 du mutant P306A est superposée à celle du wild type (Figure 103). Une explication peut-être apportée : nous avons vu au paragraphe 2.3.2 et 2.5.3 que le motif structural n'est pas limité au *PW-turn* mais qu'il s'étend plus loin jusqu'au résidu P320 probablement dans une conformation de type polyproline. On peut supposer que la

mutation P306A ne perturbe pas l'équilibre du *PW-turn* car la proline P306 n'est pas impliquée dans le motif P310-P320.

Les mutations P319A et P315A altèrent légèrement le motif structural (la résonance du W312 est décalée sur la ligne vers le bas à gauche) avec un effet plus important pour la mutation P315A étant donné que cette proline est plus proche du W312 dans la séquence primaire. Avec ces mutations, la population de conformation non structurée augmente légèrement aux dépens de la conformation structurée.

Enfin de manière surprenante, la mutation P320A est la seule où les déplacements chimiques ^1H , ^{15}N et ^{13}C de la résonance du W312 sont indicatifs d'une conformation plus structurée (déplacements chimiques ^1H , ^{15}N , ^{13}C moins élevés, en haut à droite du spectre) par rapport au Wild Type. La suppression de cette proline permet donc un niveau de structuration plus important du *PW-turn*, ceci peut probablement s'expliquer par la présence de cette proline dans un motif P-P. Comme pour les autres mutations proline-alanine, la mutation P320A induit une disparition de forme minoritaire ici la forme W312_3, donc la proline P320 en conformation *cis* déstabilise le motif structural. Néanmoins la mutation P320A est la seule qui induit un niveau de structuration plus important du motif structural *PW-turn*.

En conclusion, l'alignement du W312 et de l'A313 que ce soit pour chacune des formes minoritaires, ou en présence des mutations proline-alanine (Figure 105 et Figure 106) permet d'émêtrer l'hypothèse que le motif structural *PW-turn* serait en échange rapide entre un état structuré (dont la position exacte en haut à droite sur la ligne du spectre HSQC n'est pas connu) et un état non structuré (dont la position exacte en bas à gauche du spectre HSQC n'est pas connue). Avec chaque mutants P-A (excepté pour le mutant P306A), on observe le W312 (et l'A313) à une position intermédiaire entre les deux états extrêmes de la ligne, et cette position dépendrait du ratio de population entre l'état structuré et l'état non structuré de la séquence $^{310}\text{PAWA}^{313}$.

2.7 Le motif structural interagit avec la CypA et est un substrat pour son activité PPIase

2.7.1 Activité PPIase de la CypA sur NS5A-D2 WT (JFH1)

Afin de confirmer que chacune des formes minoritaires du W312 correspond à des équilibres *cis/trans* de prolines, nous avons souhaité mettre en évidence une activité PPIase de la CypA sur les prolines avoisinants le W312. Précédemment, il avait été montré que la CypA possède une activité PPIase sur les 15 prolines de NS5A-D2 (JFH1) (Hanouille et al., 2009b), ceci a été déterminé par RMN à l'aide des expériences ^1H - ^{15}N z-exchange. Pour ces expériences, la CypA non marquée est introduite en quantité catalytique en rapport $1/10^{\text{ème}}$ par rapport à ^{15}N NS5A-D2 (JFH1). Avec cette quantité catalytique de CypA, les formes minoritaires correspondant à des résidus situés à proximité de proline en conformation *cis* s'élargissent. Nous avons alors réalisé des expériences ^1H - ^{15}N z-exchange, avec soit le peptide pepD2 (JFH1) WT ^{15}N soit le domaine entier NS5A-D2 WT (JFH1) ^{15}N , avec un rapport $1/80^{\text{ème}}$ de CypA pour ne pas élargir les formes minoritaires. Nous nous sommes focalisés sur l'activité PPIase de la CypA au niveau des prolines voisines du W312 et on s'est servi des différentes résonances du W312 pour suivre cette activité. Dans ces conditions, nous avons pu mettre en évidence la présence de pics d'échanges entre la forme majoritaire du W312 et les formes minoritaires du W312_4, W312_5 et W312_6 en présence de CypA. Ceci montre que la CypA catalyse un changement conformationnel de prolines avoisinants le W312 durant le temps de mélange de l'expérience ^1H - ^{15}N z-exchange (400 ms pour NS5A-D2 (JFH1) et 100 ms pour pepD2(JFH1)) (Figure 121). Cette expérience permet de confirmer que chaque forme minoritaire de la ligne du W312 est liée à des équilibres *cis/trans* lents de prolines, et ces équilibres lents sont catalysés par la CypA. Le motif structural au sein de NS5A-D2 est donc un substrat pour l'activité PPIase de la CypA.

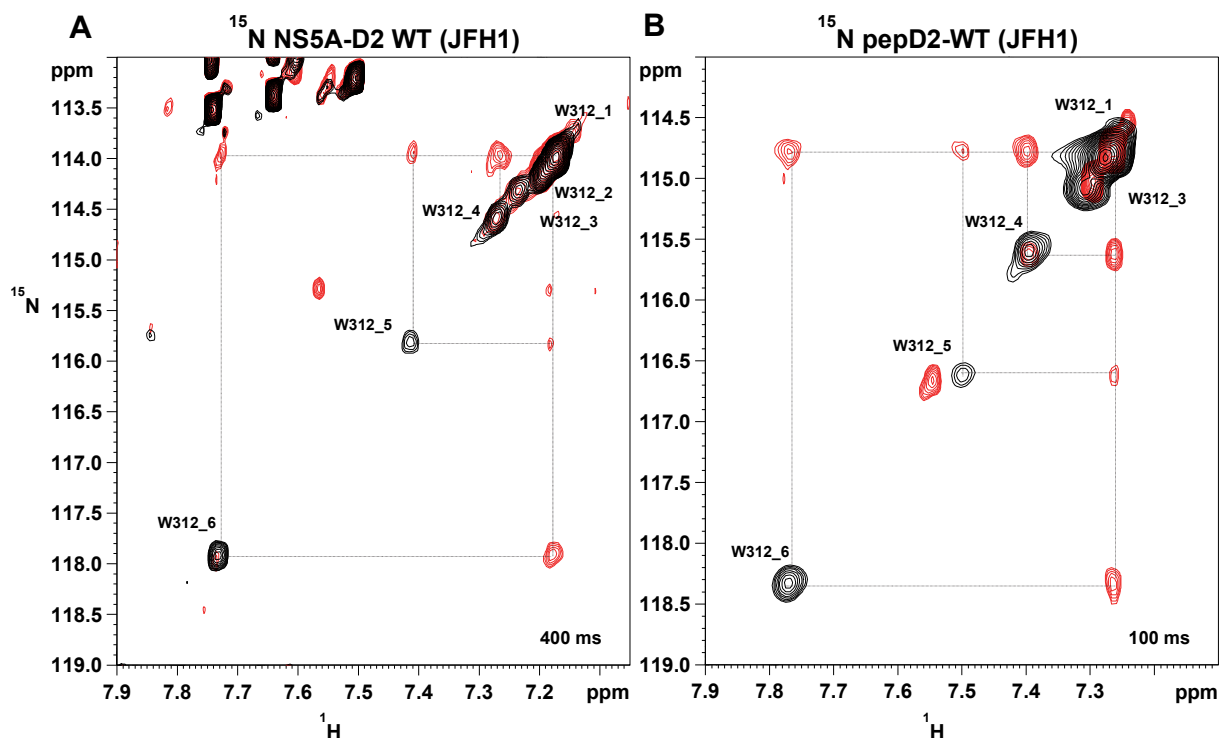


Figure 121. Activité PPIase de la CypA sur (A) ^{15}N NS5A-D2 WT (JFH1) et (B) ^{15}N pepD2-WT (JFH1), détails du spectre sur la résonance du W312. A, Cette figure correspond à la superposition des spectres ^1H - ^{15}N z-exchange de ^{15}N NS5A-D2 WT en présence de CypA (rouge) et en l'absence de CypA (noir) avec un temps de mélange de 400 ms. B, Cette figure est semblable à la A mais l'expérience est réalisée avec le peptide pepD2-WT (JFH1) avec un temps de mélange de 100 ms. La présence de pics d'échanges entre la forme majoritaire du W312 et les formes minoritaires W312_4, W312_5 et W312_6, indiquent que la CypA catalyse l'isomérisation *cis/trans* de prolines avoisinant le W312. D'après l'attribution des formes minoritaires réalisée précédemment il s'agit de l'isomérisation des prolines P319, P315 et P310.

2.7.2 Interaction de la CypA avec NS5A-D2

Pour étudier l'interaction entre NS5A-D2 et la CypA, ces deux partenaires sont introduits en rapport (1/1) à une concentration de 200 μM . La méthode consiste à comparer le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 en présence de CypA avec celui de ^{15}N NS5A-D2 seul. La concentration de ^{15}N NS5A-D2 doit être la même entre l'expérience contrôle et l'expérience d'interaction. La comparaison des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (JFH1) en présence et en absence de CypA non marquée montre un élargissement des pics de ^{15}N NS5A-D2 correspondant aux acides aminés en interactions avec la CypA (Figure 122 A). L'élargissement des pics montre que la vitesse d'échange entre l'état libre et l'état lié est du même ordre de grandeur que la différence de déplacement chimique entre l'état libre et l'état lié, $k_{\text{ex}} \sim \Delta\omega$. Le pourcentage d'intensité résiduelle de NS5A-D2 en présence de CypA est tracé en fonction de la séquence primaire de NS5A-D2, on observe une diminution d'intensité dans la zone 306-323 (Figure 122 B). Ainsi, NS5A-D2 (JFH1) interagit directement avec la CypA au niveau du motif structural P310-P320

que nous avons identifié. C'est dans ce site d'interaction que des mutations de résistances à des inhibiteurs de CypA ont été identifiées, il s'agit des mutations D316E ou DEYN (D316E-Y317N) (Coelmont et al., 2010 ; Yang et al., 2010). Ces mutations permettent au virus de se répliquer avec une dépendance réduite à la CypA et confèrent également au virus un niveau de résistance bien plus élevé à la CsA et à l'Alisporivir. La mutation DEYN induit un niveau de résistance aux inhibiteurs de CypA encore plus élevé par rapport à la mutation D316E (Yang et al., 2010). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que les mutations de résistances aux inhibiteurs de CypA n'affectaient pas l'interaction entre NS5A-D2 et la CypA (Coelmont et al., 2010 ; Yang et al., 2010). Les conséquences structurales et fonctionnelles de ces mutations de résistance ne sont donc pas connues. L'étude structurale et fonctionnelle de ces mutants va nous permettre de mieux comprendre dans quels mécanismes moléculaires intervient la CypA au cours du processus de répllication. Ces mutations de résistance étant localisées juste à coté du PW-turn, et donc au niveau du motif structural que nous avons délimité du résidu P310 au résidu P320, elles pourraient induire un changement conformationnel du motif structural ainsi qu'une modification de l'activité PPIase et/ou de la liaison de la CypA sur NS5A-D2.

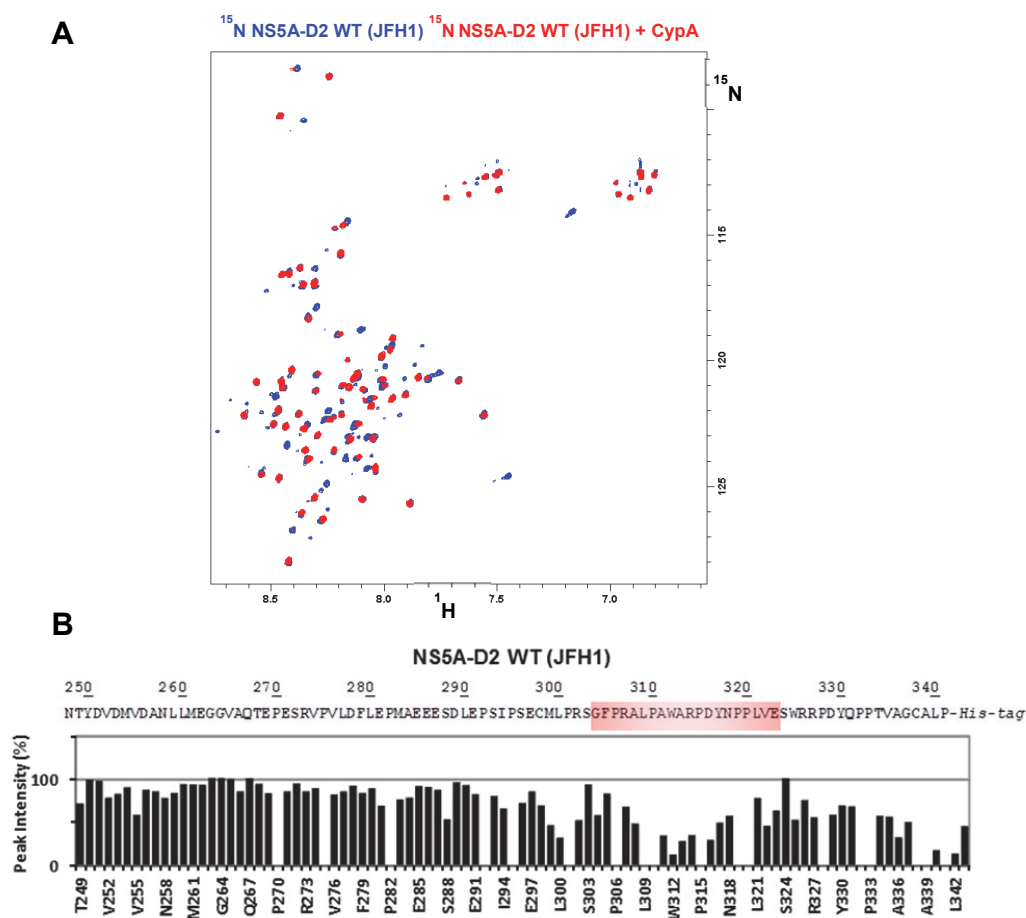


Figure 122. Interaction entre NS5A-D2 WT (JFH1) et la CypA. A Superposition du spectre ¹H-¹⁵N HSQC de ¹⁵N NS5A-D2 WT (bleu) avec le spectre de ¹⁵N NS5A-D2 WT en présence de CypA (rouge) non

marquée (rapport 1 :1). On observe un élargissement et une diminution d'intensité pour les résonances correspondant aux acides aminés de NS5A-D2 WT en interaction avec la CypA. B, Profil d'interaction de NS5A-D2 WT avec la CypA. Rapport d'intensité des résonances des spectres HSQC (présentés en A) en présence et en absence de CypA, répartie le long de la séquence de NS5A-D2. La zone 306-323 de NS5A-D2 (JFH1) interagit avec la CypA

2.8 Etude des mutations de résistance à des inhibiteurs des CypA

2.8.1 Conséquences structurales des mutations de résistance à des inhibiteurs de CypA

2.8.1.1 Les mutations de résistances déstabilisent le motif structural

Nous avons étudié les mutations NS5A-D2 D316E et NS5A-D2 DEYN de résistance à la CsA ou à l'Alisporivir. L'analyse des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 D316E et NS5A-D2 DEYN montre une perturbation des déplacements chimiques des résonances du W312 et de l'A313 le long de la ligne identifiée précédemment, vers des valeurs de déplacements chimiques ^1H , ^{15}N plus élevés (en bas à gauche du spectre) (Figure 105, Figure 118). Avec ces mutations, la résonance du W312 a une position intermédiaire sur la ligne du spectre HSQC, entre d'une part les mutants P310A, A311G qui cassent le motif structural *PW-turn* et d'autre part les mutants P320A, WT, P306A, P319A et P315A où le motif structural est toujours présent (mais dans une moindre mesure pour les mutants P319A et P315A). De même les déplacements chimiques $^{13}\text{C}_\alpha$ et $^{13}\text{C}_\beta$ des mutants D316E et DEYN ont des valeurs intermédiaires comprises entre celle de NS5A-D2 A311G où le motif structural est absent et le mutant NS5A-D2 P320A où le motif structural est présent (Figure 119, Figure 120). Ainsi l'équilibre entre les 2 conformations structurée et non structurée est déplacé avec ces mutations de résistances D316E et DEYN. Ces mutations pourraient provoquer une déstabilisation du motif structural *PW-turn*, la population de conformation non structurée augmenterait aux dépens de la conformation structurée. L'effet est plus important pour la mutation de résistance DEYN dont les déplacements chimiques ^1H , ^{15}N et ^{13}C du W312 sont plus déviés par rapport à la forme structurée du W312 au sein de NS5A-D2 WT. Les données indiquent que le motif structural est toujours présent mais dans une moindre mesure.

2.8.1.2 Comparaison des formes minoritaires de NS5A-D2 WT et NS5A-D2 D316E

2.8.1.2.1 Comparaison des formes minoritaires du W312 sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC

Nous avons vu ci-dessus que la mutation de résistance D316E semble déstabiliser le motif structural *PW-turn*, en déplaçant l'équilibre du motif $^{310}\text{PAWA}^{313}$ entre un état structuré et un état non structuré, étant donné que la résonance W312_1 de NS5A-D2 D316E est retrouvée en position intermédiaire entre la résonance W312_1 de NS5A-D2 WT et la résonance W312_1 de NS5A-D2 P310A sur le spectre HSQC. Cependant nous n'avons pas expliqué comment cette mutation D316E peut induire une déstabilisation du motif. Les formes minoritaires du W312 retrouvées sur la ligne du spectre HSQC ont été attribuées au W312 lorsqu'une proline voisine est en conformation *cis*. Plus les formes minoritaires du W312 ont des déplacements chimiques ^1H , ^{15}N élevés (en bas à gauche du spectre), moins la séquence $^{310}\text{PAWA}^{313}$ est en conformation structurée (paragraphe 2.5.2 et 2.5.4). En conséquence, lorsqu'une proline est en conformation *cis* cela déstabilise le motif structural, la population de conformation non structurée augmente aux dépens de la conformation structurée. On peut donc émettre l'hypothèse que la mutation de résistance D316E déstabilise le motif structural en changeant le rapport *cis/trans* d'une (des) proline(s) avoisinante(s). Pour étudier cette hypothèse nous avons comparé l'intensité des résonances des différentes formes du W312 entre NS5A-D2 WT et NS5A-D2 D316E sur leurs spectres ^1H - ^{15}N HSQC (Figure 123). La forme majoritaire du W312 correspond au W312 lorsque toutes les prolines avoisinantes sont en conformation *trans* et les formes minoritaires lorsqu'une proline voisine est en conformation *cis*. En comparant l'intensité de la forme majoritaire du W312 par rapport aux formes minoritaires du W312, on peut estimer de manière indirecte les populations *cis* et *trans* des prolines. En moyenne, au sein de NS5A-D2 WT, 60,6 % des conformères possèdent les 5 prolines avoisinantes le W312 en conformation *trans* alors qu'au sein de NS5A-D2 D316E la moyenne est de 58,3 % (Figure 123B). Ainsi, l'intensité des formes minoritaires du W312 est légèrement plus élevée pour NS5A-D2 D316E par rapport à NS5A-D2 WT, indiquant que NS5A-D2 D316E possède une population légèrement plus grande de prolines avoisinantes le W312 en conformation *cis*. L'état *cis/trans* des prolines avoisinantes le W312 sera également étudié dans les paragraphes suivants avec des spectres différents.

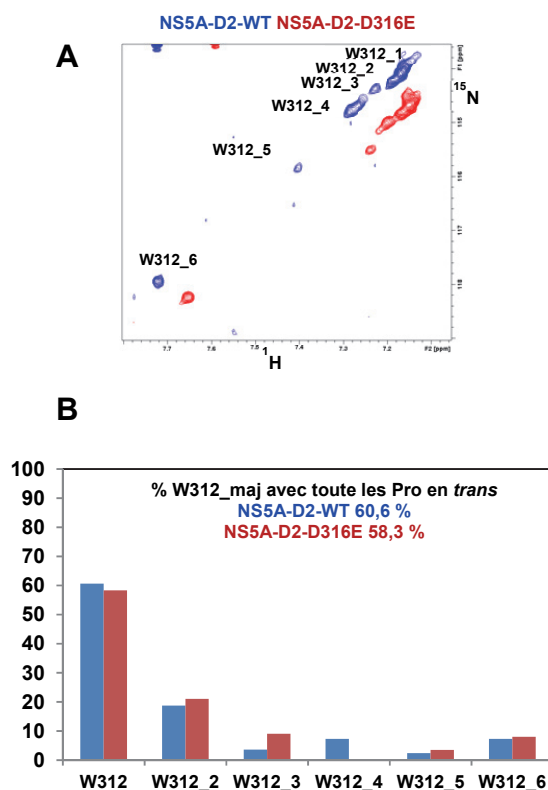


Figure 123. Comparaison de l'intensité des formes minoritaires du W312 pour NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 D316E (rouge). A, Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 WT (bleu) et NS5A-D2 D316E (rouge), les spectres sont centrés sur les différentes populations du W312 (sur cette figure, les spectres ne sont pas référencés de la même façon en proton afin de visualiser au mieux les formes du W312 de NS5A-D2 WT et NS5A-D2 D316E). B, Pourcentage d'intensité des formes du W312 pour NS5A-D2 WT (en bleu) et NS5A-D2 D316E (en rouge) calculés à partir des spectres présentés en A.

2.8.1.2.2 Comparaison des formes minoritaires des peptides *pepD2-WT* et *pepD2-D316E* sur les spectres ^1H - ^{15}N HSQC

Nous avons étudié de manière comparative, entre NS5A-D2 WT et NS5A-D2 D316E, les formes minoritaires sur les résidus situés en $i+1$ d'une proline sur les spectres ^1H - ^{15}N HSQC.

Nous avons vu au paragraphe 2.5.1 que la détermination de la conformation des prolines des formes minoritaires sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC ne peut se faire que si la proline est en $i-1$ du résidu observé. En effet les spectres HNCACB et HNCOCACB permettent d'observer uniquement les déplacements chimiques C_α et C_β du résidu i et du résidu $i-1$. (Il existe toutefois des cas où il est possible de connecter une forme minoritaire à une proline en conformation *cis* situé en $i-2$ du résidu observé, comme c'est le cas pour la forme minoritaire W312_6 qui est liée à la proline P310 en conformation *cis*). Sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC du domaine 2 entier de NS5A WT, la forme minoritaire du D316 correspondant à la P315 en conformation *cis* n'a pas pu être identifiée à cause des nombreuses superpositions dans le spectre.

Nous avons fait cette même analyse sur les peptides pepD2-WT et pepD2-D316E marqués ^{15}N ^{13}C , ceci permet de réduire le nombre de recouvrements puisqu'il n'y a plus que 20 résonances majoritaires sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC. Les expériences tridimensionnelles HNCACB et HNCOCACB ont été enregistrées sur les échantillons doublement marqués ^{15}N ^{13}C pepD2-D316E (JFH1) et pepD2-WT (JFH1) concentrés à 1 mM à 298 K, à 600 MHz. Dans ces conditions, nous avons obtenu une sensibilité suffisante permettant d'attribuer la totalité des formes minoritaires du spectre ^1H - ^{15}N HSQC. Les spectres ^1H - ^{15}N HSQC des peptides pepD2-D316E et pepD2-WT attribués sont illustrés Figure 124. Sur les spectres ^1H - ^{15}N HSQC de pepD2-WT et pepD2-D316E, de nombreux résidus possèdent plusieurs formes minoritaires. Pour ceux possédant une proline en $i-1$, l'état *cis/trans* de la proline a pu être déterminé grâce aux déplacements chimiques $C_{\beta\ i-1}$ sur les spectres HNCACB et HNCOCACB (Figure 125 et Figure 126). D'après la séquence primaire du peptide ($^{304}\text{GFPRALPAWARPDYNNPPLVE}^{323}$), il s'agit des résidus R307, A311, D316 et L321 pour lesquels nous avons identifié une forme minoritaire correspondant à la proline en $i-1$ en conformation *cis*. Sur les spectres ^1H - ^{15}N HSQC, ces pics sont annotés R307_2 (P306 *cis*), A311_2 (P310 *cis*), D316_2 (P315 *cis*) et L321_2 (P320 *cis*) (Figure 124). La déstabilisation du motif structural en présence de la mutation de résistance D316E pourrait s'expliquer par un changement de populations des conformations *cis* et *trans* des prolines avoisinantes. Nous avons donc quantifié l'état *cis/trans* des prolines, de manière comparative entre le peptide pepD2-WT et le peptide pepD2-D316E, en mesurant l'intensité des formes majoritaires et minoritaires des résidus R307, A311, D316 et L321 situés en $i+1$ d'une proline. Les résultats de cette étude sont présentés Figure 127. Nous n'observons pas de changements drastiques d'intensité des formes minoritaires (R307_2 (P306 *cis*), A311_2 (P310 *cis*), E316_2 (P315 *cis*) et L321_2 (P320 *cis*)) en présence de la mutation de résistance D316E. On remarque tout de même, en présence de la mutation D316E, une intensité très légèrement plus importante des formes minoritaires E316_2 et A311_2 correspondant respectivement aux prolines P315 et P310 en conformation *cis*, toutefois ces résultats ne sont pas très significatifs.

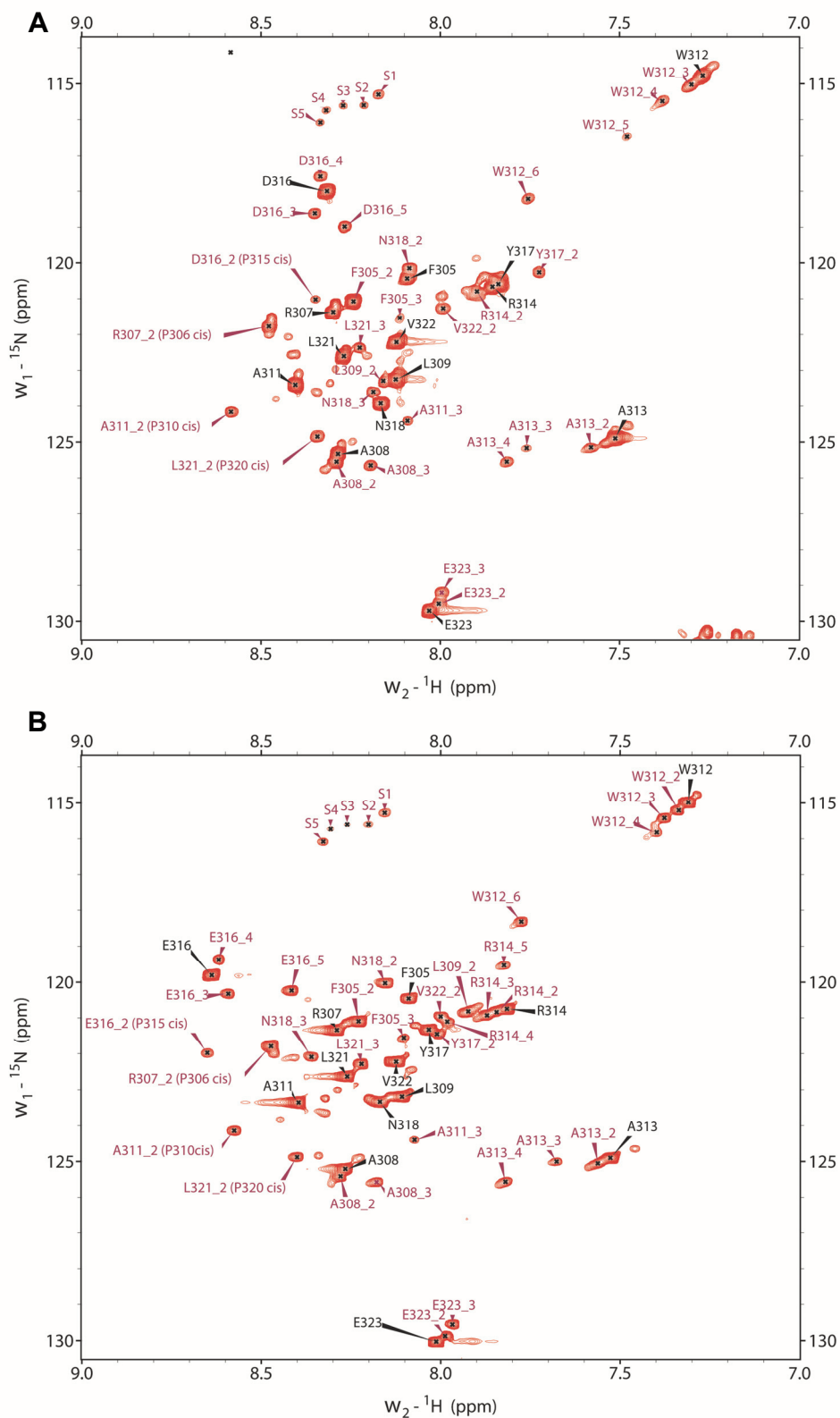


Figure 124. Attribution du spectre $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC des peptides (A) pepD2-WT (JFH1) ^{15}N ^{13}C et (B) pepD2-D316E (JFH1) ^{15}N ^{13}C à 298K (600 MHz). Les formes majoritaires sont annotées en noir, et les formes minoritaires en marron.

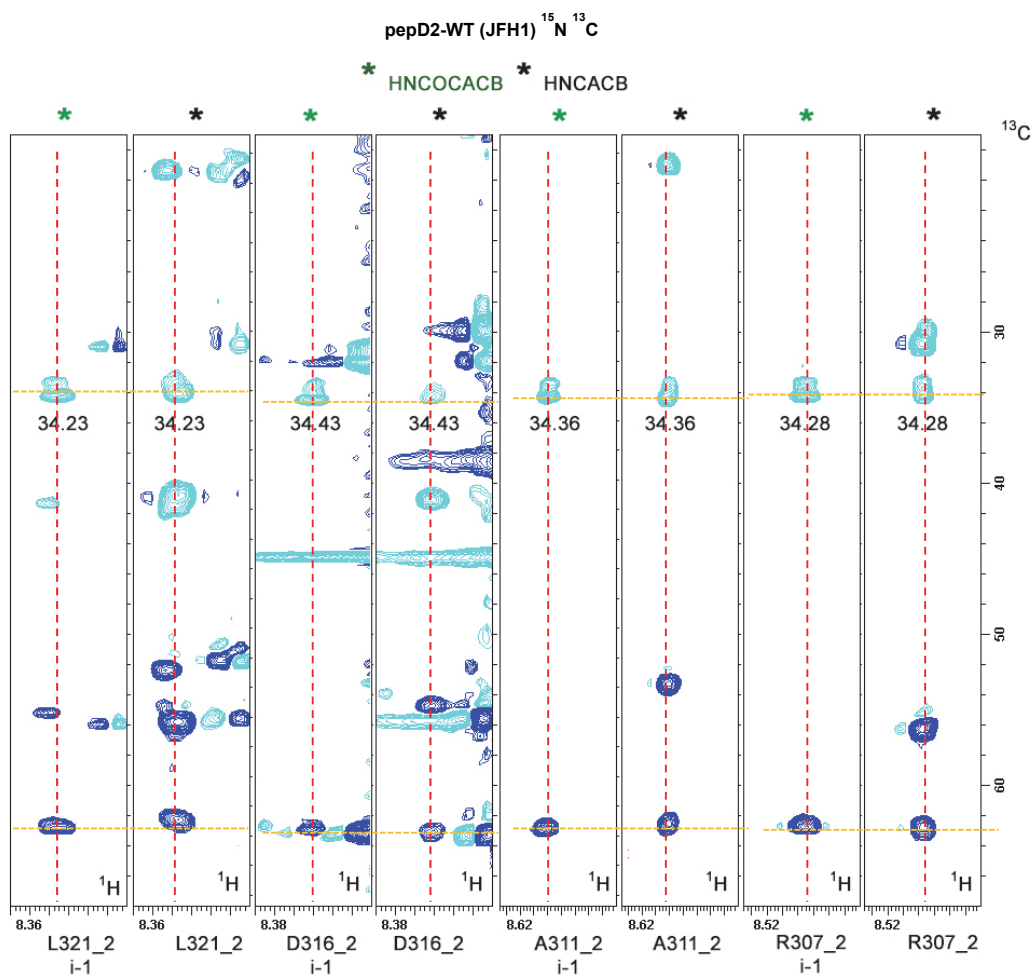


Figure 125. Expériences tridimensionnelles enregistrée sur pepD2-WT (JFH1) ^{15}N ^{13}C . Plans ^1H , ^{13}C extraits à la fréquence ^{15}N des expériences tridimensionnelles HNCACB (*) HNCOCACB (*) aux déplacements chimiques des protons amides des formes minoritaires R307_2, A311_2, D316_2 et L321_2 possédant une proline en conformation *cis* en *i-1* comme le montre le déplacement chimique $\text{C}_{\beta\ i-1}$ à environ 34 ppm. Les lignes horizontales en pointillé orange indiquent les déplacements chimiques C_{α} (en bas) et C_{β} (en haut) et les lignes verticales en pointillés rouge indiquent les déplacements chimiques protons amides.

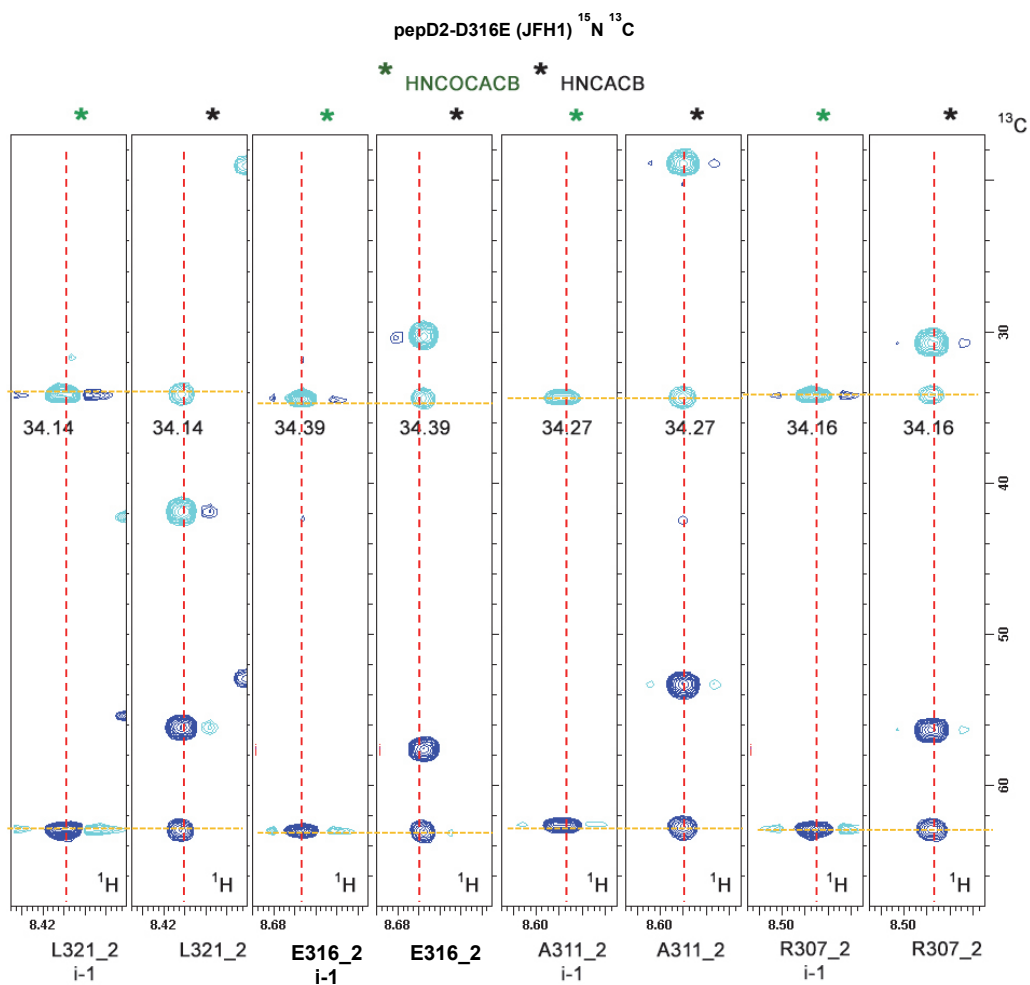


Figure 126. Expériences tridimensionnelles enregistrée sur pepD2-D316E (JFH1) ^{15}N ^{13}C . Plans ^1H , ^{13}C extraits à la fréquence ^{15}N des expériences tridimensionnelles HNCACB (*) HNCOCACB (*) aux déplacements chimiques des protons amides des formes minoritaires R307_2, A311_2, E316_2 et L321_2 possédant une proline en conformation *cis* en *i-1* comme le montre le déplacement chimique $\text{C}_{\beta\ i-1}$ à environ 34 ppm. Les lignes horizontales en pointillé orange indiquent les déplacements chimiques C_{α} (en bas) et C_{β} (en haut) et les lignes verticales en pointillé rouge indiquent les déplacements chimiques protons amides

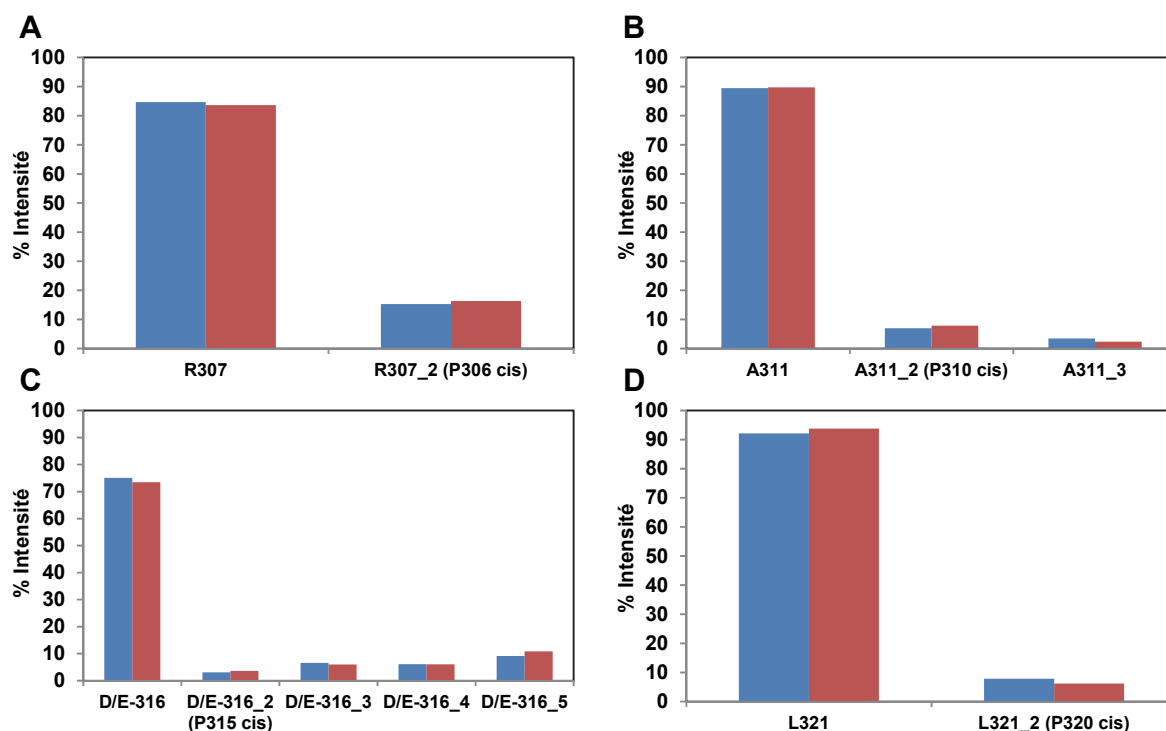


Figure 127. Quantification des formes minoritaires des résidus possédant une proline en i-1 à partir des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de pepD2-WT et pepD2-D316E présentés dans la Figure 124. Le pourcentage d'intensité des populations de pepD2-WT est en bleu et celui de pepD2-D316E est en rouge. Une seule forme minoritaire a été identifiée pour les résidus R307 et L321 correspondant à la proline en i-1 en conformation *cis*. Pour l'A311, 2 formes minoritaires ont été identifiées, dont une correspondant à la P310 *cis*. Pour le résidu D316 ou E316 4 formes minoritaires ont été identifiées, dont une correspondant à la P315 *cis*.

2.8.1.2.3 Quantification de l'état *cis/trans* des prolines sur les spectres ^1H - ^{15}N $\text{H}_\alpha(\text{C}_\alpha)\text{N}$ des peptides pepD2-WT et pepD2-D316E

Jusqu'à présent, nous avons étudié de manière indirecte l'état *cis/trans* des prolines sur des résonances de résidus voisins de prolines. Ici, nous avons travaillé directement sur les résonances RMN des prolines grâce à des spectres ^1H - ^{15}N $\text{H}_\alpha(\text{C}_\alpha)\text{N}$ enregistrés sur les peptides pepD2-WT et pepD2-D316E ^{15}N ^{13}C . Ces expériences sont les mêmes que celles que nous avons utilisées pour l'étude du peptide pepD2(Con1) (article de la partie 1).

Un schéma du spectre obtenu à partir de cette expérience est présenté Figure 128. Ces spectres en deux dimensions permettent d'observer des pics de corrélation entre le proton $^1\text{H}_\alpha$ et l'azote ^{15}N du squelette peptidique grâce à un transfert d'aimantation à travers le C_α , il est ainsi possible d'observer tous les résidus de la protéine, y compris les résidus de prolines. Les pics de corrélation $^1\text{H}_\alpha$ - ^{15}N des prolines sont séparés des pics de corrélation $^1\text{H}_\alpha$ - ^{15}N des autres résidus car la proline possède un déplacement chimique ^{15}N particulier compris entre 132 et 140 ppm,

cela permet d'analyser spécifiquement les résidus de prolines. Comme les constantes de couplage $C_{\alpha-N}$ et $C_{\delta-N}$ des prolines sont très proches, dans la zone de déplacement chimique 132-140 ppm, on observe les corrélations $^1H_{\alpha}-^{15}N$ des prolines compris entre 4,0 et 5,0 ppm en dimension 1H et également les corrélations $^1H_{\delta}-^{15}N$ des prolines compris entre 3,0 et 3,9 ppm. L'attribution des spectres $^1H-^{15}N$ $H_{\alpha}(C_{\alpha})N$ est réalisée en incluant, à l'expérience en deux dimensions $H_{\alpha}(C_{\alpha})N$, une troisième dimension ^{13}C , en ajoutant une étape de transfert C_{β} . Cette expérience tridimensionnelle $^1H-^{13}C-^{15}N$ $H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}N$ permet d'attribuer l'état *cis/trans* des prolines à partir de leurs déplacements chimiques C_{β} , si $\delta C_{\beta} \sim 32$ ppm alors la proline est en conformation *trans* et si $\delta C_{\beta} \sim 34$ ppm alors la proline est en conformation *cis* (Figure 128).

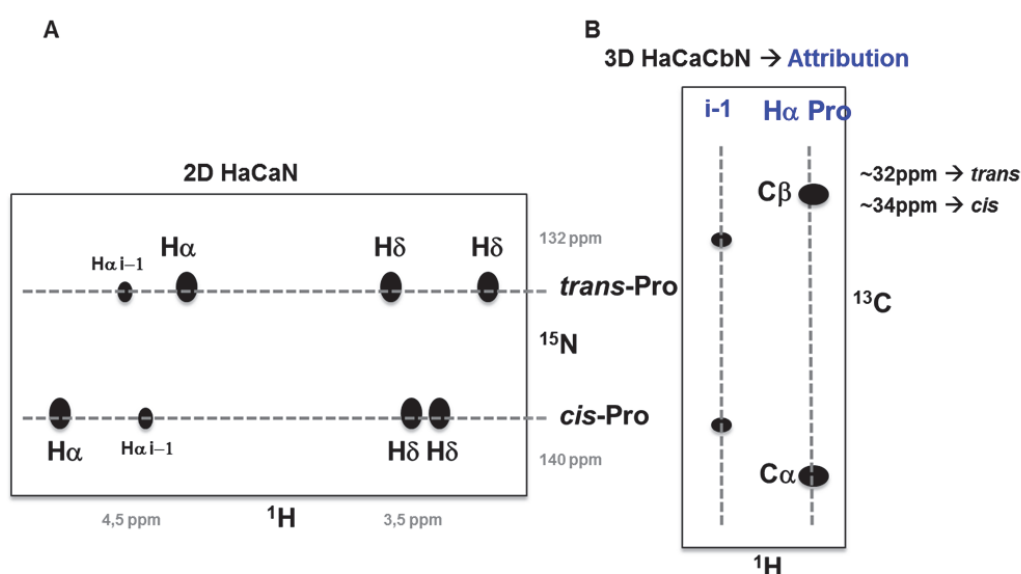


Figure 128. Schéma des spectres obtenus à partir des expériences 2D $^1H-^{15}N$ $H_{\alpha}(C_{\alpha})N$ et des expériences 3D $^1H-^{13}C-^{15}N$ $H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}N$. A, Schéma du spectre 2D $^1H-^{15}N$ $H_{\alpha}(C_{\alpha})N$ centré au niveau des résonances des prolines. B, Plans $^1H,^{13}C$ extraits à la fréquence ^{15}N de l'expérience tridimensionnelles $^1H-^{13}C-^{15}N$ $H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}N$ au déplacements chimiques H_{α} d'une proline.

L'attribution des résidus de prolines sur le spectre 2D $^1H-^{15}N$ $H_{\alpha}(C_{\alpha})N$ du peptide ^{15}N ^{13}C pepD2-WT est présentée Figure 129. Cette attribution a été réalisée à l'aide de l'expérience 3D $H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}N$. Nous avons identifié plusieurs populations pour les différents résidus de prolines, une population majoritaire et deux populations minoritaires. La population majoritaire correspond toujours à la conformation *trans* (T) (comme c'est le cas dans le motif structural). Les populations minoritaires correspondent à une conformation *cis* (c) ou une conformation *trans* (t) supplémentaire pour chaque résidu de proline. Cette forme minoritaire *trans* supplémentaire révèle l'effet à longue distance de l'isomérisation des prolines voisines sur le déplacement chimique de la proline observée. L'attribution du peptide pepD2-D316E a été réalisée par analogie avec celle de pepD2-WT, la plus grande différence entre ces deux spectres correspond

aux déplacements chimiques de la proline P315 (Figure 130). On observe également pour pepD2-D316E différentes populations pour chaque proline, une population majoritaire *trans* (T) une population minoritaire *cis* (c) et une population minoritaire *trans* (t). Nous avons comparé l'intensité des différentes populations de chacune des prolines pour ces deux peptides (Figure 131). Pour les deux peptides, la P306 possède un ratio *cis/trans* plus élevé, environ 16% des conformères possèdent la P306 en conformation *cis*. Cela peut s'expliquer par la présence d'un résidu aromatique (F305) en *i-1* de la proline, en effet la liaison peptidique en conformation *cis* précédant un résidu de proline est stabilisée par des interactions entre un résidu aromatique et la proline (Wu and Raleigh, 1998). Pour chaque proline, le peptide D316E possède un pourcentage de proline en conformation *cis* légèrement supérieur par rapport au peptide WT. Par exemple, 4,16 % des conformères de pepD2-D316E possèdent la P315 en conformation *cis* contre 3,13 % pour le peptide pepD2-WT.

En conclusion, l'observation des formes minoritaires du W312, des formes minoritaires des résidus situés en *i+1* d'une proline et les différentes populations observées directement sur les résidus de prolines, permet de mettre en évidence une très légère augmentation du ratio *cis/trans* des prolines en présence de la mutation de résistance D316E. Le pourcentage légèrement plus important de conformères possédant des prolines en conformation *cis* en présence de la mutation de résistance D316E, pourrait donc éventuellement donner une explication rationnelle à la déstabilisation du motif structural PW-*turn* en présence de cette mutation.

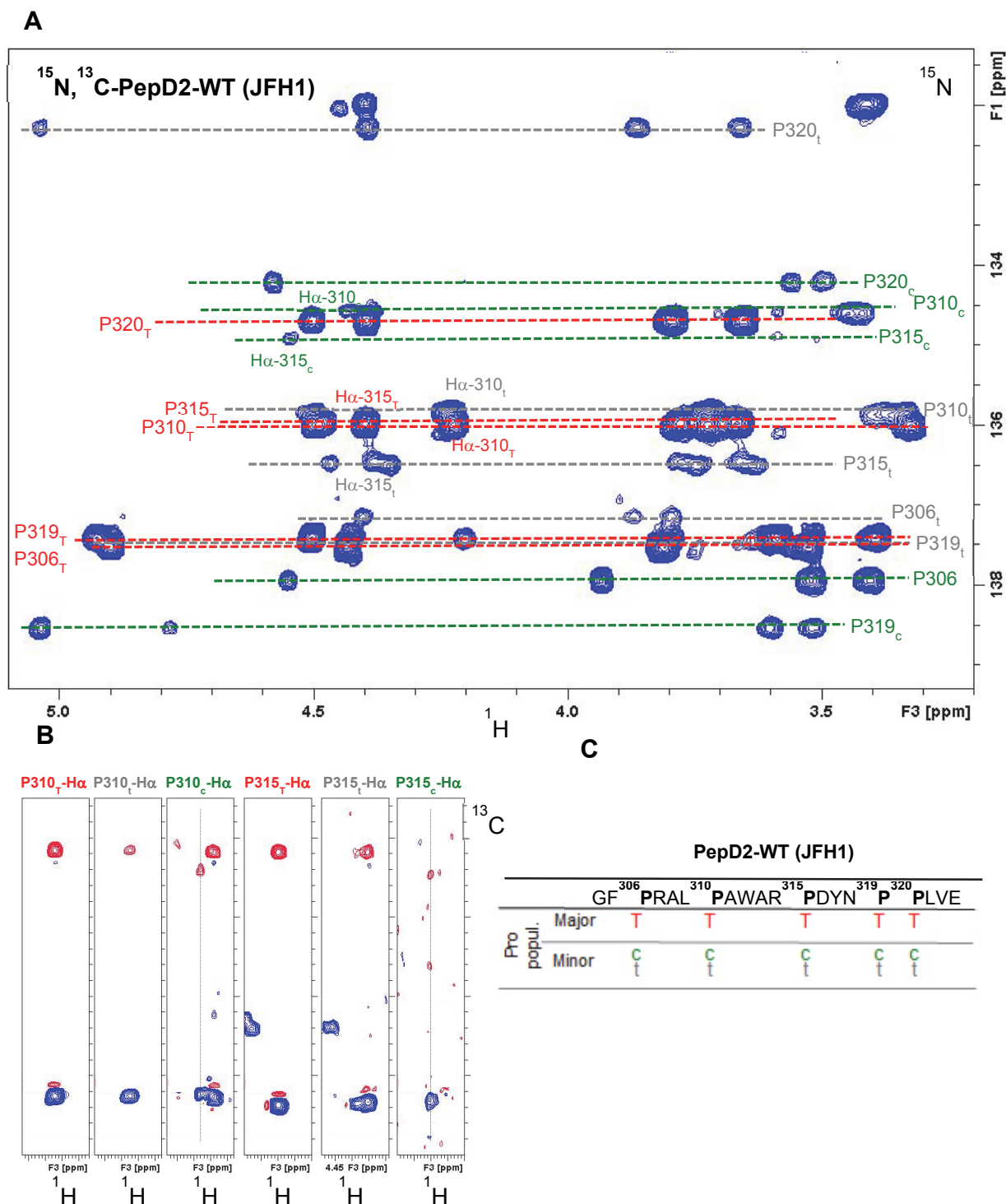


Figure 129. Attribution des résonances prolines dans le spectre $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ $\text{H}_\alpha(\text{C}_\alpha)\text{N}$ de ^{15}N ^{13}C pepD2-WT. A, Spectre 2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ $\text{H}_\alpha(\text{C}_\alpha)\text{N}$ centré sur la région $\text{H}_\alpha\text{-H}_\delta/\text{N}$ des résidus de prolines. Pour un résidu de proline donné on observe à sa fréquence ^{15}N deux résonances (dans la zone à 4,0 – 5,0 ppm) correspondant au H_α de cette proline et au H_α du résidu i-1 (de plus faible intensité). On observe également les déplacements chimiques des protons H_δ de ces prolines à la même fréquence ^{15}N . Nous avons identifié pour chaque proline différentes populations : Une forme majoritaire et deux formes minoritaires. La forme majoritaire correspond toujours à la conformation *trans* (T) annotée en rouge, les formes minoritaires correspondent soit à la conformation *cis* (c) (annoté en vert) soit à une conformation *trans* (annoté en gris). La résonance à environ 132 ppm (^{15}N) correspond à la proline supplémentaire en N-terminal résultant de la coupure chimique DP. B, L'attribution des résonances et la détermination des conformations des prolines ont été réalisées à l'aide d'expériences 3D $^1\text{H}-^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ $\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha\text{C}_\beta\text{N}$. Les

panneaux correspondent aux plans ^1H - ^{13}C du spectre 3D ^1H - ^{13}C - ^{15}N $\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha\text{C}_\beta\text{N}$ extraits à la fréquence ^{15}N correspondant (de gauche à droite) à la conformation majoritaire *trans* (T), minoritaire *trans* (t) et minoritaire *cis* (c) de la P310 et à la conformation majoritaire *trans* (T), minoritaire *trans* (t) et minoritaire *cis* (c) de la P315. C, Le tableau résume les différentes populations observées pour chaque proline dans le peptide pepD2-WT.

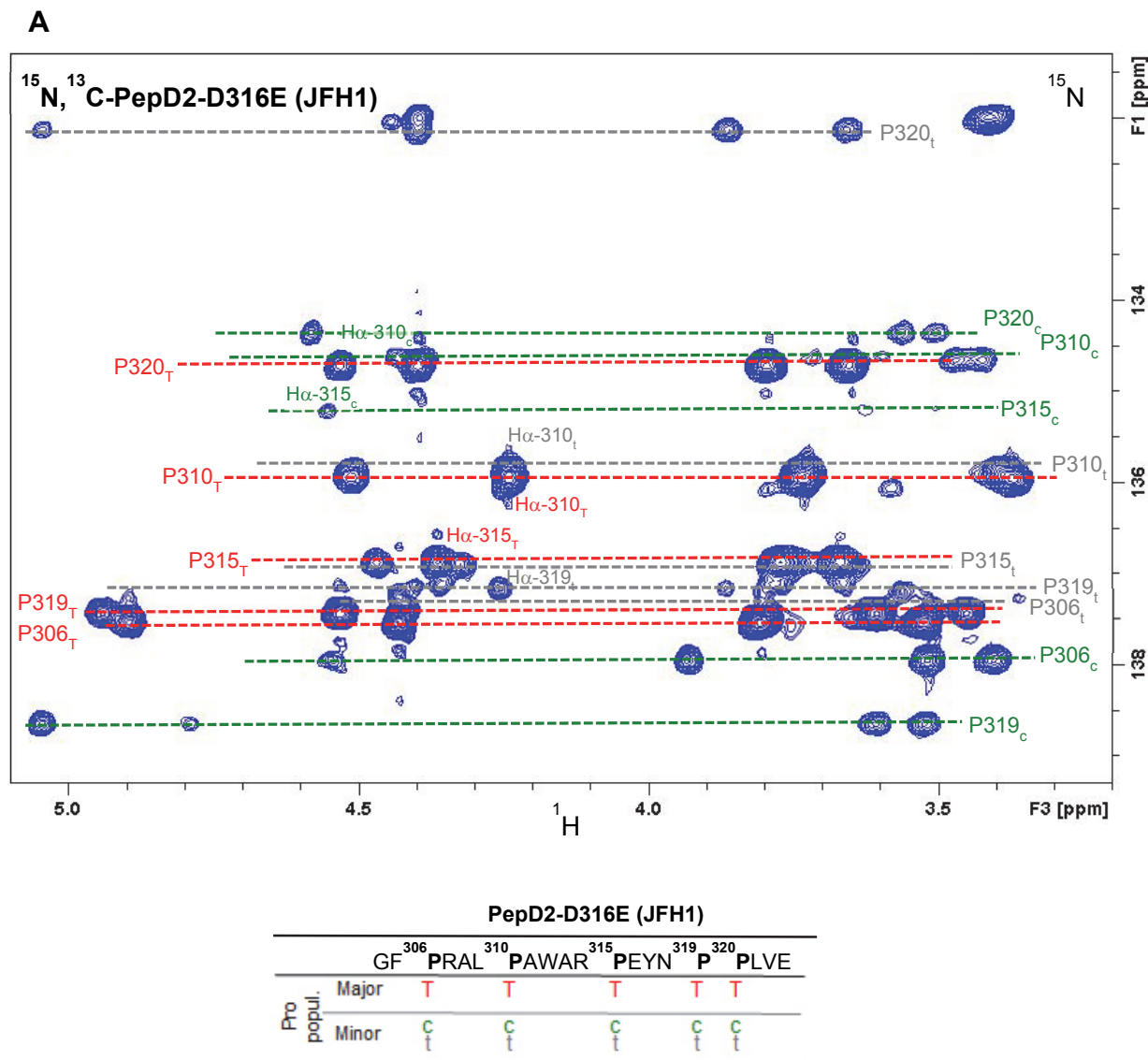


Figure 130. Attribution des résonances prolines dans le spectre ^1H - ^{15}N $\text{H}_\alpha(\text{C}_\alpha)\text{N}$ de ^{15}N ^{13}C pepD2-D316E. A, Spectre 2D ^1H - ^{15}N $\text{H}_\alpha(\text{C}_\alpha)\text{N}$ centré sur la région $\text{H}_\alpha\text{-H}_\delta/\text{N}$ des résidus de prolines, de la même manière que pour pepD2-WT, on observe pour chaque proline différentes populations : Une forme majoritaire *trans* (T) (annoté en rouge) et deux formes minoritaires *cis* (c) (annoté en vert) et *trans* (t) (annoté en gris). La résonance à environ 132 ppm (^{15}N) correspond à la proline supplémentaire en N-terminal résultant de la coupure chimique DP. C, Le tableau résume les différentes populations observées pour chaque proline dans le peptide pepD2-D316E.

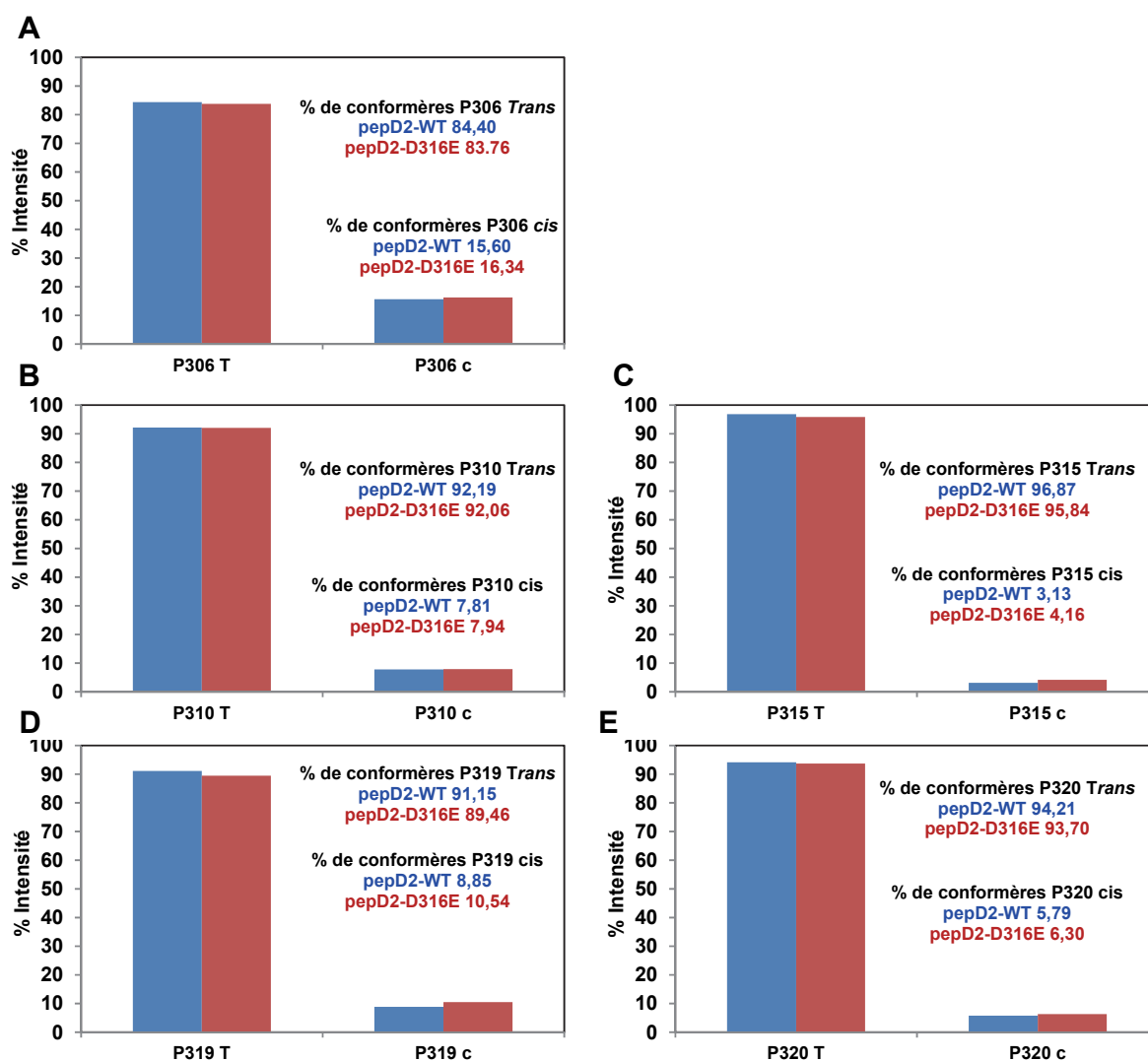


Figure 131. Quantification des population *cis* et *trans* de chaque proline (P306 (A) ; P310 (B) ; P315 (C) ; P319 (D) ; P320 (E)) pour le peptide pepD2-WT (bleu) et le peptide pepD2-D316E (rouge) à partir des spectres 2D ^1H - ^{15}N H α (Ca)N présentés dans les figures précédentes Figure 129 et Figure 130.

2.8.2 Corrélation entre le niveau de structuration du motif et l'efficacité de réplication de l'ARN viral

Nous avons montré précédemment dans la partie 1 que le *PW-turn* au sein de NS5A-D2 est strictement requis pour la réplication de l'ARN viral. Ici, nous allons plus loin en réalisant les tests de réplication de l'ARN viral avec les différents mutants de NS5A-D2, mutants pour lesquels nous avons montré que l'équilibre entre la conformation structurée et non structurée du motif *PW-turn* est modifié.

Comme dans la première partie, ces tests de réplication de l'ARN viral ont été réalisés à l'aide du réplicon sous-génomique, en collaboration avec l'équipe du Pr. Bartenschlager (Department of Molecular Virology, Heidelberg, Germany). Les tests ont été réalisés avec le domaine NS5A-D2 WT (JFH1), le mutant NS5A-D2 DEYN de résistance aux inhibiteurs de la CypA, les mutants de NS5A-D2 (JFH1) P310A et A311G qui cassent le motif structural. La mutation A311I est un contrôle positif à la mutation A311G qui permet de contrôler qu'en présence d'un résidu retrouvé parmi les différents génotypes du VHC (isoleucine au sein de NS5A-D2 Con1), la réplication a lieu, alors que si une glycine est présente à cette position la réplication est abolie. On observe une corrélation entre la position de la résonance du W312 sur la ligne du spectre HSQC et l'efficacité de réplication de l'ARN viral (Figure 132). Là encore, on peut mettre en évidence une relation colinéaire. Il y a donc un lien entre le niveau de structuration du motif et l'activité de réplication de l'ARN viral. Plus le motif structural est déstabilisé, moins l'ARN viral se réplique. Le motif structural est strictement nécessaire pour la réplication de l'ARN viral puisque les mutations A311G et P310A cassant le motif structural abolissent la réplication de l'ARN viral à un niveau comparable à celui d'un témoin négatif ou l'ARN polymérase virale est non fonctionnelle. L'effet fonctionnel est drastique puisque dans un domaine désordonné d'une centaine de résidus on enlève juste un groupement CH₃ avec la mutation A311G. La mutation de résistance DEYN a un effet intermédiaire entre le niveau de réplication de NS5A-D2 WT et le niveau de réplication des mutants au motif structural absent. Quand le motif structural est déstabilisé par cette mutation de résistance cela permet au virus de se répliquer mais de manière moins efficace par rapport au Wild Type. Cette mutation n'est donc pas favorable au virus, ce qui explique la barrière génétique élevée à la résistance aux inhibiteurs de CsA *in vitro*. Etant donné que ces mutations D316E et DEYN permettent au virus de se répliquer avec une dépendance réduite à la CypA, elles devraient reproduire le rôle de la CypA sur NS5A-D2. C'est-à-dire qu'elles devraient avoir un effet comparable à l'action de la CypA sur NS5A-D2. Dans les paragraphes suivants nous décrivons les conséquences fonctionnelles de la mutation de résistance D316E vis-à-vis de la liaison et de l'activité PPIase de la CypA.

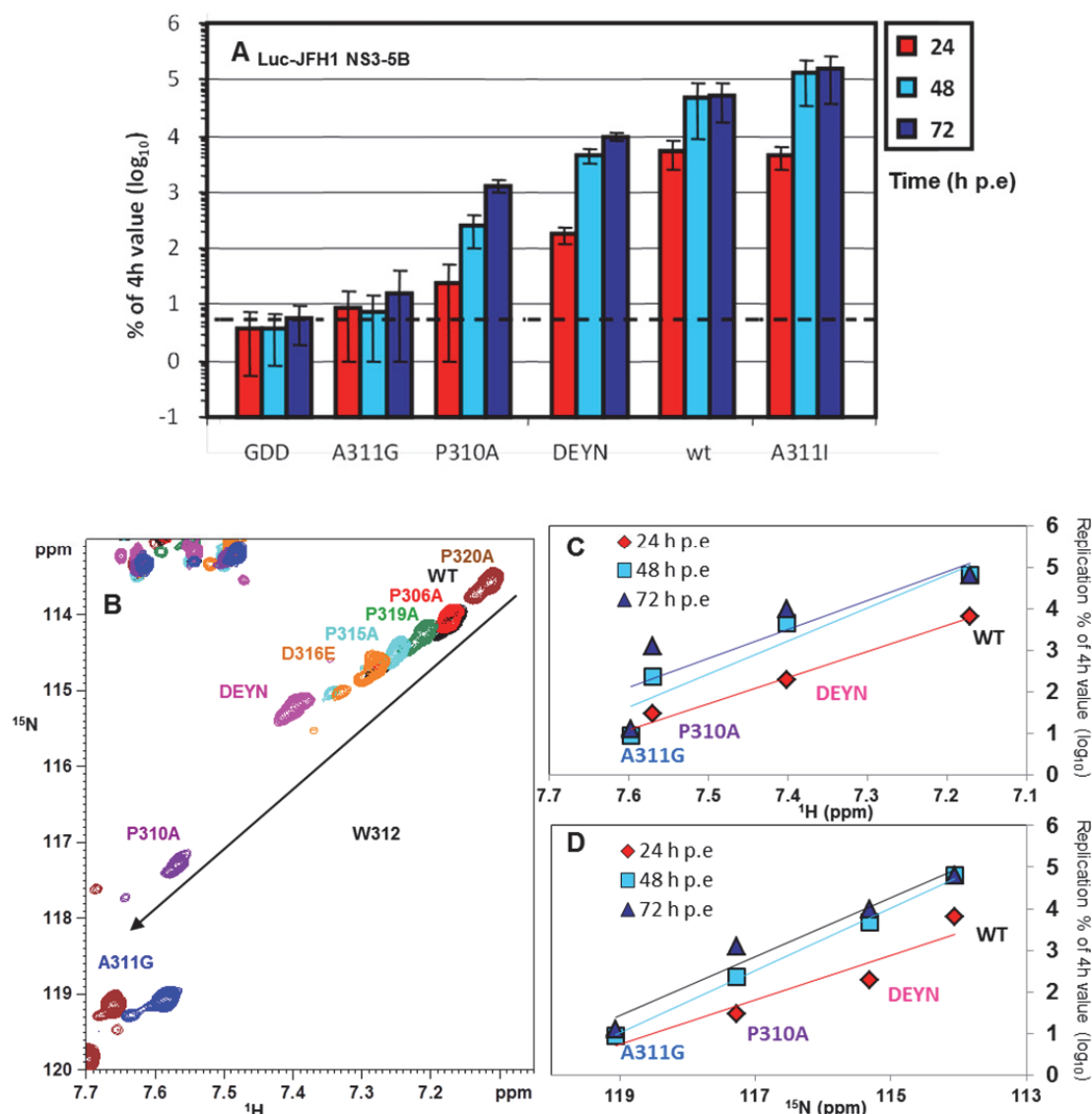


Figure 132. Corrélation entre le niveau de réplcation de l'ARN viral et la position de la résonance du W312 sur la ligne du spectre HSQC. A, Réplication de l'ARN viral en système réplicon sous-génomique avec soit NS5A-D2 WT, NS5A-D2 A311I, NS5A-D2 DEYN, NS5A-D2 P310A, NS5A-D2 A311G. Le contrôle négatif GDD correspond à un témoin négatif ou la polymérase NS5B est inactive. B, Superposition des spectres ¹H-¹⁵N HSQC de NS5A-D2 WT et de ces mutants, détails des spectres sur la résonance du W312. C, D, Niveau de réplcation de chaque mutant en fonction du déplacement chimique ¹H (C) et ¹⁵N (D) du W312.

2.8.3 Conséquences fonctionnelles des mutations de résistances aux inhibiteurs de la CypA

La CypA est indispensable pour la réplcation de l'ARN viral mais on ignore si c'est son activité PPIase ou son interaction avec NS5A-D2 qui est nécessaire pour la réplcation. Afin de mieux comprendre ce rôle nous avons réalisé une étude comparative de son activité PPIase et de l'interaction de la CypA sur trois peptides : le peptide pepD2-WT contenant le motif structural, le

peptide pepD2-A311G qui casse le motif structural et le peptide pepD2-D316E. La mutation de résistance à des inhibiteurs de CypA, D316E, est localisée à côté du *turn* P³¹⁰-W³¹², au sein du site d'interaction avec la CypA, séquence riche en proline qui adopte probablement une conformation de type polyproline s'étendant du résidu 310 à 320.

2.8.3.1 Expériences de titrations avec la CypA

Des tests d'interactions comparatifs entre les différents mutants P-A, A311G, D316E de NS5A-D2 WT et la CypA ont été réalisés avec la méthode décrite au paragraphe 2.7.2. Le profil d'interaction de la CypA avec les mutants NS5A-D2 est semblable à celui obtenu avec NS5A-D2 WT. Cela confirme par RMN que NS5A-D2 D316E interagit avec la CypA. Cependant cette méthode ne permet pas de mettre en évidence des affinités différentes des différents mutants de NS5A-D2 pour la CypA, leur profil d'interaction étant très similaire.

Nous avons alors réalisé des expériences de titration entre la CypA ¹⁵N et les 3 peptides non marqués (pepD2-WT, pepD2-D316E et pepD2-A311G) de manière comparative, de la même manière que dans la première partie. L'interaction entre la CypA ¹⁵N et un peptide pepD2(JFH1) non marqué n'induit pas un élargissement des pics mais une perturbation de déplacement chimique pour les acides aminés de la CypA impliqués dans l'interaction avec le peptide. Cette fois la vitesse d'échange entre l'état libre et l'état lié est rapide sur l'échelle de temps de la RMN, $k_{ex} \gg \Delta\omega$, on observe un pic dont la position dépend du ratio de population entre l'état libre et l'état lié. Nous avons calculé la perturbation de déplacement chimique combinée en ¹H et ¹⁵N selon l'équation (1), où $\Delta\delta(^1H)$ et $\Delta\delta(^{15}N)$ représentent la différence entre les déplacements chimiques d'une protéine en l'absence et en présence d'un partenaire d'interaction, ce qui permet de calculer la constante de dissociation du complexe K_D .

$$\Delta\delta = |\Delta\delta(^1H)| + 0.2 |\Delta\delta(^{15}N)| \quad (1)$$

La constante de dissociation d'un complexe d'interaction bi-moléculaire d'une protéine P et d'un ligand L formant un complexe PL ($[P] + [L] \rightleftharpoons [PL]$) s'écrit:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{([P]_0 - [PL])([L]_0 - [PL])}{[PL]} \quad (2)$$

Avec $[P]_0$ et $[L]_0$ les concentrations initiales de P et de L. $[PL]$ peut alors s'écrire :

$$[PL] = \frac{1}{2} \left([P]_0 + [L]_0 + K_D - \sqrt{([P]_0 + [L]_0 + K_D)^2 - 4[P]_0[L]_0} \right) \quad (3)$$

Sachant que la variation de déplacement chimique observée, $\Delta\delta$, sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine P s'écrit selon l'équation (4) avec $\Delta\delta_{max}$ la différence de déplacement chimique entre la protéine libre et la protéine liée:

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{max} \times \frac{[PL]}{[P]_0} \quad (4)$$

En divisant (3) par $[P]_0$, on obtient :

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{max}}{2} \left(1 + \frac{[L]_0}{[P]_0} + \frac{K_D}{[P]_0} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_0}{[P]_0} + \frac{K_D}{[P]_0} \right)^2 - 4 \frac{[L]_0}{[P]_0}} \right) \quad (5)$$

En mesurant la perturbation de déplacement chimique $\Delta\delta$ (calculé selon l'équation 1) en fonction du ratio $[L]_0/[P]_0$, nous avons déterminé la constante de dissociation K_D , en ajustant les valeurs $\Delta\delta_{max}$ et K_D afin que la courbe théorique obtenue à partir de l'équation (5) représente au mieux les valeurs expérimentales. Ceci nous a permis de déterminer de manière comparative les constantes de dissociation K_D entre la CypA ^{15}N et les peptides pepD2(JFH1).

La CypA ^{15}N à 400 μM est titrée par des quantités croissantes de peptides non marqués dont les ajouts lyophilisés sont repris successivement par la solution de protéine CypA afin de maintenir sa concentration constante. Pour chaque point de titration, l'acquisition d'un spectre ^1H - ^{15}N HSQC est effectuée avec 1024 x 256 points et 16 scans à 600 MHz. L'addition de peptide non marqué à l'échantillon de ^{15}N CypA induit une perturbation de déplacements chimiques pour les résonances des acides aminés en interaction avec la CypA (Figure 133). L'affinité entre la CypA et le peptide pepD2 WT ($K_D = 738 \mu\text{M}$) contenant le motif structural est environ deux fois supérieures à celle du peptide *random coil* pepD2 A311G ($K_D = 1367 \mu\text{M}$), indiquant que le motif structural est nécessaire pour l'interaction avec la CypA. Ceci confirme les résultats obtenus avec les peptides de la souche Con1 (partie 1). L'affinité du peptide pepD2-D316E pour la CypA est intermédiaire ($K_D = 1180 \mu\text{M}$) entre celle obtenue avec le peptide pepD2-WT et le peptide pepD2-A311G. Plus le motif structural est déstabilisé plus l'affinité CypA-pepD2 diminue.

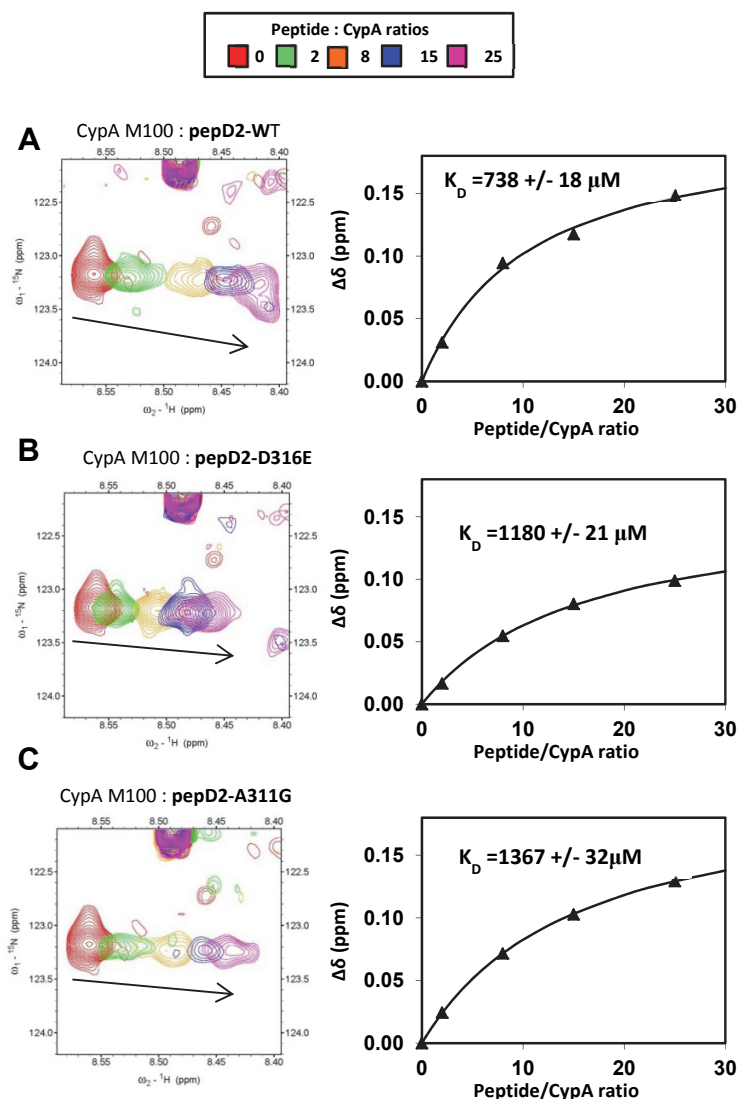


Figure 133. Interaction de la CypA avec (A) pepD2-WT, (B) pepD2-D316E et (C) pepD2-A311G. Les panneaux de gauche correspondent à la superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N CypA, centrés sur la résonance M100, en présence de quantité croissante de peptide pepD2 non marqué, (A) pepD2-WT ; (B) pepD2-D316E ; (C) pepD2-A311G. Les ratios utilisés sont indiqués dans le rectangle en haut de la figure. Les panneaux de droite correspondent aux courbes de titrations, la perturbation de déplacements chimiques combinés en ^1H et ^{15}N est tracée en fonction du ratio peptide/CypA. La valeur du K_D est la moyenne calculée sur 5 résonances de CypA (M100, L98, S110, G124, I56).

2.8.3.2 Activité PPIase de la CypA

Comme la liaison et l'activité PPIase de la CypA sont étroitement liées, nous avons également étudié l'activité PPIase de la CypA de manière comparative sur les domaines NS5A-D2 WT, NS5A-D2 D316E, NS5A-D2 DEYN et NS5A-D2 A311G. Des séries d'expériences ^1H - ^{15}N z-exchange ont été réalisées sur les domaines NS5A-D2 marqués ^{15}N à $320 \mu\text{M}$ en présence de quantité catalytique de CypA (1 : 80) avec différents temps de mélange : 100, 150, 200 et 400 ms. L'expérience contrôle est réalisée sans CypA avec un temps de mélange de 200 ms. Nous

nous sommes intéressés à l'activité PPIase de la proline P310 impliquée dans le petit motif structural *PW-turn*. En présence de CypA des pics d'échange (I_{tc} et I_{ct}) apparaissent entre la forme majoritaire du W312 (I_{tt}) et la forme minoritaire W312_6 (I_{cc}) (Figure 134 A, B, C, et D), ceci correspond à l'activité PPIase de la CypA sur la proline P310. Le taux d'échange chimique, k_{exch} , entre ces deux formes a été déterminé en mesurant le rapport d'intensité du pic d'échange *trans-cis* (I_{tc}) et du pic *trans* (I_{tt}) en fonction du temps de mélange M_T . k_{exch} est une fonction du temps de mélange M_T qui est déterminé par cette équation :

$$\frac{I_{tc}}{I_{tt}} = \frac{-p_c + p_c \times e^{(k_{exch} \times M_T)}}{p_c + p_t \times e^{(k_{exch} \times M_T)}}$$

Les populations *cis* et *trans*, représentées par p_c et p_t sont déterminées à partir des intensités relatives d'un acide aminé qui ressent une proline en conformation *cis* et *trans*. M_T représente le temps de mélange, c'est-à-dire le temps pendant lequel on laisse l'échange se faire entre les formes *cis* et *trans* (il correspond au temps d'évolution du système dans la séquence d'impulsion RMN).

Les valeurs de k_{exch} obtenues pour l'échange entre W312_1 et W312_6 sont indiquées Figure 134 E, F. Le k_{exch} est plus élevé pour NS5A-D2 A311G par rapport à NS5A-D2 WT. Nous avons vérifié que la forme minoritaire W312_6 de NS5A-D2 A311G correspond bien au W312 lorsque la proline P310 est en conformation *cis* grâce aux expériences tridimensionnelles d'attribution. Ainsi le taux d'échange chimique de la P310 est plus important lorsque le motif structural est absent, ceci est en accord avec les résultats obtenus sur le peptide pepD2(Con1) (première partie). La valeur du k_{exch} de NS5A-D2 D316E et DEYN est intermédiaire entre celle trouvée pour NS5A-D2 WT et NS5A-D2 A311G. Ainsi plus le motif structural est déstabilisé plus l'activité PPIase de la CypA sur la proline 310 augmente.

Nous avons également étudié l'activité PPIase de la CypA de manière comparative sur les peptides pepD2-WT, pepD2-D316E et pepD2-A311G marqués ^{15}N . Nous avons observé un taux d'échange chimique de la proline P310 plus important en présence de la mutation A311G et une valeur intermédiaire en présence de la mutation D316E, ce qui confirme les résultats obtenus avec le domaine NS5A-D2 entier.

Afin de comprendre les conséquences fonctionnelles de la mutation de résistance D316E, nous avons souhaité comparer le k_{exch} de la proline P315 en mesurant le k_{exch} entre les formes D316 majoritaire et D316_2 ou E316 majoritaire et E316_2 sur les spectres 1H - ^{15}N HSQC des peptides pepD2-WT ^{15}N et pepD2-D316E ^{15}N . Cependant les formes D316 majoritaire et D316_2

minoritaire ont le même déplacement chimique en proton sur les spectres ^1H - ^{15}N HSQC de pepD2-WT (Figure 124) ce qui ne permet pas d'observer de pics d'échanges entre ces deux formes. Afin de contourner ce problème nous allons enregistrer des expériences d'échange Ca_zN_z sur les peptides pepD2-WT (JFH1) ^{15}N ^{13}C et pepD2-D316E (JFH1) ^{15}N ^{13}C , de manière similaire à celles enregistrées sur les pepD2-WT (Con1) ^{15}N ^{13}C et pepD2-A311G (Con1) ^{15}N ^{13}C dans la première partie. Ces expériences d'échanges Ca_zN_z sont une adaptation de l'expérience $\text{H}_\alpha(\text{C}_\alpha)\text{N}$ pour laquelle un temps de mélange a été inséré dans la séquence d'impulsion, permettant de détecter (en présence d'une PPIase) des pics d'échanges directement entre les différentes résonances des prolines correspondant aux différents conformères (*cis* et *trans*). Ces expériences sont en cours et permettront de savoir si l'isomérisation *cis/trans* de la P315 par la CypA est plus importante en présence de la mutation D316E.

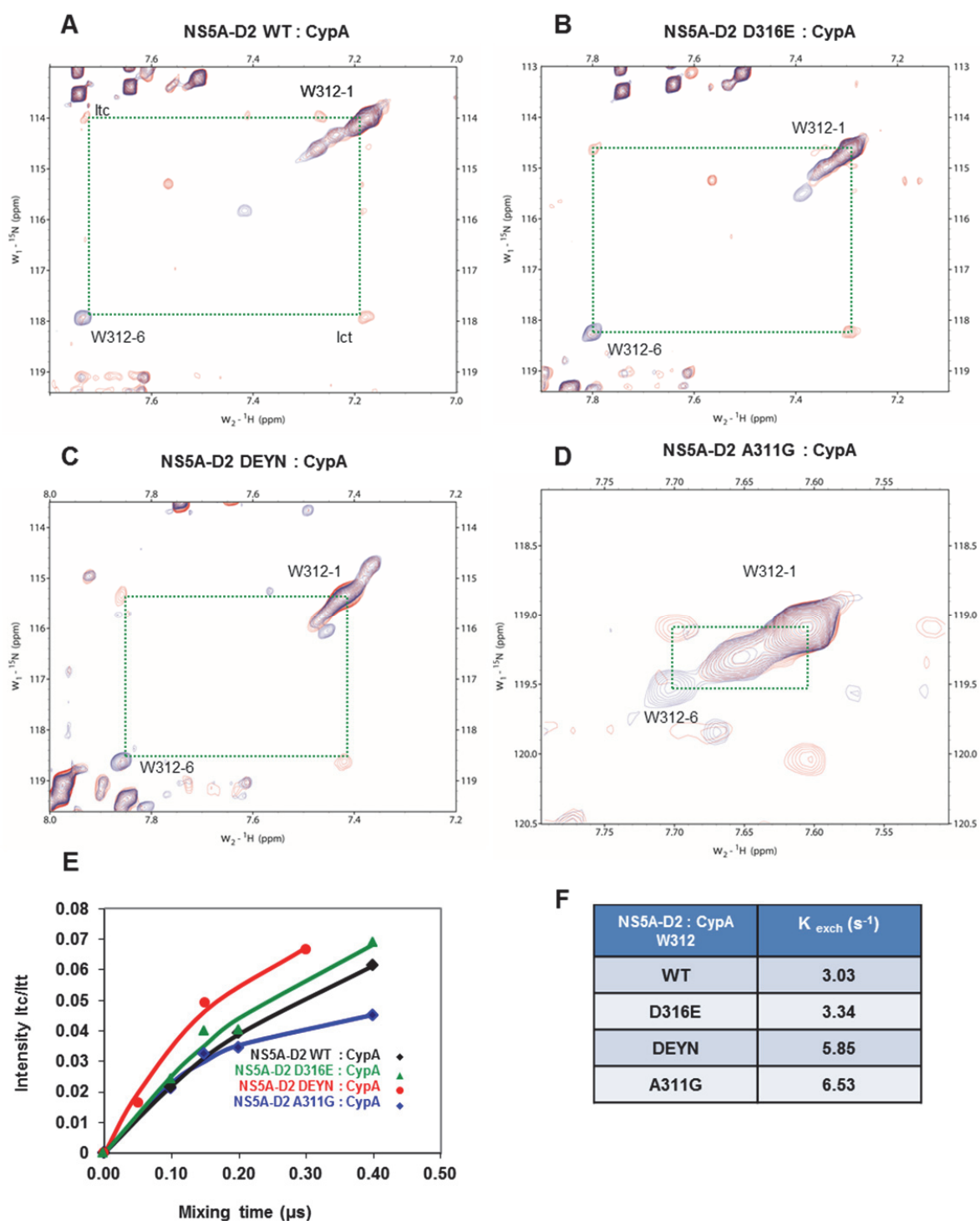


Figure 134. Comparaison de l'activité PPLase de la CypA au niveau de la proline P310 sur NS5A-D2 WT (A) et les mutants D316E (B), DEYN (C), A311G (D). A, B, C, D, Spectres ^1H - ^{15}N z-échange à 600 MHz avec un temps de mélange de 400 ms en présence de quantité catalytique (1:80) de CypA (rouge) et en absence de CypA (bleu). Le pic majoritaire W312_1, le pic minoritaire W312_6 et les pics d'échanges ltc et ltt sont mis en évidence par un carré en pointillé vert. E, Détermination de l'activité PPLase de la CypA concernant la liaison $\text{L}^{309}\text{-P}^{310}$. Les données expérimentales ltc/ltt du W312 sont tracées en fonction du temps de mélange (en noir NS5A-D2 WT, en vert NS5A-D2 D316E, en rouge NS5A-D2 DEYN, en bleu NS5A-D2 A311G). F, K_{exch} de l'isomérisation *cis/trans* de la liaison $\text{L}^{309}\text{-P}^{310}$ par la CypA identifié à partir des courbes en E.

2.9 Conclusion

NS5A est une protéine essentielle à la réplication de l'ARN du VHC et la production de particules virales (Tellinghuisen et al., 2007; Appel et al., 2008) dont le rôle n'est pas encore bien connu et pour laquelle aucune fonction enzymatique n'a été mise en évidence. NS5A est composée de trois domaines, le domaine 1 possède une structure tridimensionnelle caractérisée par cristallographie et interagit avec l'ARN viral, les domaines 2 et 3 sont intrinsèquement désordonnés et ont été caractérisés précédemment par RMN. Les IDPs/IDRs se caractérisent par un manque d'état structuré bien défini, et par une flexibilité bien plus élevée par rapport aux protéines structurées. Le rôle fonctionnel de ces protéines n'est pas encore bien caractérisé. La caractérisation moléculaire détaillée de NS5A-D2 est importante pour comprendre le rôle de ce domaine dans la réplication de l'ARN du VHC.

Au cours de ces travaux nous avons étudié par RMN, NS5A-D2 de la souche JFH1. La faible dispersion de déplacement chimique en proton amide sur le spectre RMN ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 (JFH1) indique que ce domaine est globalement désordonné (Figure 67) ce qui avait déjà été montré précédemment dans la souche JFH1 (Hanouille et al., 2009b), (Hanouille et al., 2010), comme dans d'autres souches du VHC : Con1 (génotype 1b) (partie 1 des résultats), H77 (génotype 1a) (Liang et al., 2007), HC-J4 (génotype 1b) (Feuerstein et al., 2012). L'analyse des propensions intrinsèques à former des structures secondaires avec l'analyse SSP indique que NS5A-D2(JFH1) possède des tendances hélicales dans deux régions composées des résidus 250-262 et 295-301 et de manière légèrement moins importante dans la région 322-327, ce qui est en accord avec les résultats obtenus sur le génotype 1b de la souche Con1 (partie 3) et de la souche HC-J4 (Feuerstein et al., 2012). Cependant, l'analyse des déplacements chimiques expérimentaux par rapport aux prédictions ncIDP met en évidence la présence d'une conformation locale autour des résidus W312 et A313 qui n'avait pas été mise en évidence avec l'analyse SSP. Ces résidus W312 et A313 sont strictement conservés parmi tous les génotypes du VHC et sont localisés dans le site d'interaction avec la CypA (Hanouille et al., 2009b). Nous avons alors réalisé une étude par RMN apportant des informations sur les caractéristiques structurales et dynamiques de NS5A-D2 (JFH1). La mesure des paramètres de relaxation ^{15}N (R1, R2 et nOe hétéronucléaire) indique la présence d'une dynamique conformationnelle particulière dans la région (306-323) de NS5A-D2 qui interagit avec la CypA. Les valeurs de paramètres ^{15}N R2 et de nOe hétéronucléaire ^1H - ^{15}N plus élevées indiquent une rigidité plus importante de cette zone. Le paramètre ^{15}N R1 étant constant le long de la séquence de NS5A-D2 (JFH1) (hormis pour les extrémités N- et C-terminales), les valeurs de ^{15}N R2 plus élevées dans la zone 306-323 pourraient mettre en

évidence un phénomène d'échange chimique dans cette région. Les RDC des vecteurs NH de la chaîne polypeptidique de NS5A-D2 (JFH1) indiquent également la présence de structures résiduelles au niveau du W312. Nous avons également pu mettre en évidence la présence de contacts transitoires à longue distance entre les extrémités N- et C-terminales de NS5A-D2 et la région 306-323, comme ceux découverts pour le génotype 1b de la souche HC-J4 du VHC (Feuerstein et al., 2012). Bien que les IDPs n'ont en général pas de pics de corrélation NOE à plus longue distance qu'entre résidus voisins dans la séquence primaire de la protéine, nous avons toutefois pu mettre en évidence la présence de contacts NOE caractéristiques de la présence d'un petit motif structural au sein de NS5A-D2. La caractérisation du petit motif structural au sein de NS5A-D2 (JFH1), réalisée avec un modèle peptidique, montre un petit motif structural hydrophobe, qui forme un *turn* où la chaîne latérale du tryptophane W312 interagit avec le cycle de la proline P310, nous avons dénommé ce motif *PW-turn*. Des contacts NOE entre les résidus W312, Y317, P319 et P320 indiquent que le motif structural n'est pas limité aux résidus ³¹⁰PAWA³¹³ mais s'étend plus loin dans la séquence jusqu'au résidu P320, caractérisé par un stacking entre le C_β du W312, la chaîne latérale de Y317 et la proline P319. Les données RMN obtenues sur NS5A-D2 (JFH1) entier (relaxation ¹⁵N R2, nOe hétéronucléaire ¹H-¹⁵N, relaxation paramagnétique, mutations proline-alanine), ainsi que les données de CD sur NS5A-D2 WT et les mutants P310A, P315A et D316E montrent également que le motif structural s'étend plus loin dans la séquence, et adopte probablement une conformation de type polyproline. Récemment, Chung et al., (2014) ont publié la structure cristallographique d'un complexe entre MOBKL1B et 2 copies d'un peptide (308-327) de NS5A-D2 Jc1 (génotype 2a). Bien qu'aucun rôle fonctionnel n'ait été mis en évidence pour l'interaction entre MOBKL1B et NS5A-D2, les résidus ³¹⁰PAWA³¹³ adoptent le même *PW-turn* que nous avons caractérisé par RMN en solution, et les résidus 310-320 de ce peptide adoptent une conformation caractérisée par un stacking entre le C_β du W312, la chaîne latérale de Y317 et la proline P319, pratiquement identique à celle que nous avons caractérisé par RMN. Ces données obtenues en cristallographie permettent de confirmer l'étendue du motif structural jusqu'au résidu 320. Ce petit motif structural existe seul en solution sans interaction avec un partenaire, contrairement aux motifs MoRFs et PreMos au sein des IDPs/IDRs qui se replient au contact avec un partenaire.

Les résidus P310, W312, A313 impliqués dans le petit motif structural *PW-turn* sont strictement conservés parmi tous les génotypes du VHC. A l'inverse en position 311 la conservation de séquence est moins importante, les résidus Ile, Val Pro et Ala sont retrouvés. Au sein de notre modèle structural la chaîne latérale de ce résidu (que ce soit l'isoleucine dans la souche Con1, ou l'alanine dans la souche JFH1) est orientée vers l'extérieur du motif et n'est pas impliquée dans

la stabilisation du motif, ce qui explique la variabilité à cette position. Le motif structural caractérisé par RMN dans deux souches du VHC, NS5A-D2 Con1 (génotype 1b) et NS5A-D2 JFH1 (génotype 2a), et également par cristallographie par Chung et al., (2014), dans la souche JC1 (génotype 2a), est strictement conservé indiquant un rôle fonctionnel important. Les recherches effectuées dans la PDB ont permis de constater que la présence d'une glycine en position équivalente à la position 311 n'était pas favorable à la présence du petit motif structural. La mutation A311G dans la souche JFH1, ou I315G dans la souche Con1, qui abolit le motif structural tout en conservant les résidus strictement conservés nous a permis par la suite d'évaluer l'importance fonctionnelle de celui-ci.

Les protéines désordonnées sont en échange rapide sur l'échelle de temps de la RMN, on observe le plus souvent un pic par résidu contenant l'information moyennée sur l'ensemble des conformations. Il existe des cas particulier ou on observe non pas un pic mais plusieurs par résidu. Ceci est du à un phénomène d'échange chimique de ce résidu sur une échelle de temps plus lente que le temps de mesure du signal RMN. C'est le cas pour de nombreux pics du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de NS5A-D2 (JFH1). NS5A-D2 (JFH1) possède 15 prolines dans sa séquence primaire sur 96 résidus au total. Les résidus situés à proximité de prolines ressentent l'équilibre *cis/trans* lent de la liaison peptidique précédant un résidu de proline et donnent de nombreuses formes minoritaires correspondant à ces équilibres *cis/trans* lents. Nous avons identifié un phénomène inhabituel où toutes les formes minoritaires du W312, au nombre de 5, sont alignées sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC. Ces formes minoritaires sont dues à des équilibres *cis/trans* lents de proline comme le montrent les pics d'échanges entre la forme majoritaire du W312 et chacune des formes minoritaires en présence de CypA sur des spectres d'échange chimique ^1H - ^{15}N z-exchange. Le W312 possède 5 prolines dans son entourage et par conséquent ressent les équilibres *cis/trans* de toutes ces prolines. La forme minoritaire W312_6 correspond au W312 lorsque la proline P310 du motif structural $^{310}\text{PAWA}^{313}$ est en conformation *cis*, ceci a été déterminé grâce aux expériences d'attribution tridimensionnelles. Les autres formes minoritaires du W312 ont été attribuées grâce à des mutations ponctuelles proline-alanine localisées dans le site d'interaction avec la CypA. En mutant une proline en alanine, on supprime un équilibre *cis/trans* et une forme minoritaire du W312 disparaît sur la ligne dans le spectre. Plus la proline est proche du W312 dans la séquence primaire du domaine, plus la forme minoritaire du W312 correspondant à l'équilibre *cis/trans* de cette proline est éloignée de la forme majoritaire du W312. L'attribution est donc cohérente, plus la modification de l'environnement chimique est proche du résidu observé plus la perturbation de déplacement chimique de ce résidu est importante.

Les formes minoritaires du W312 ont été caractérisées d'un point de vue structural. Nous avons mis en évidence une corrélation entre la position de la forme minoritaire du W312 sur la ligne du spectre HSQC et le degré de structuration du motif. Les paramètres RMN tels que les déplacements chimiques ^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, les RDC_{NH} , la différence de déplacement chimique entre les 2 H_β du W312, les paramètres de relaxation ^{15}N R2 indiquent une conformation du W312 de plus en plus *random coil* plus la résonance du W312 possède des déplacements chimiques $^1\text{H}^{15}\text{N}$ élevés sur le spectre HSQC (en bas à gauche sur la ligne du spectre HSQC). Les mutants ponctuels proline-alanine induisent également une perturbation de déplacement chimique des résonances majoritaires et minoritaire du W312 sur la même ligne que celle identifiée pour les formes minoritaires du W312 au sein de NS5A-D2 WT. Le W312 de ces mutants est de moins en moins structuré en fonction de la position de la résonance du W312 sur la ligne du spectre HSQC. Les expériences en fonction de la concentration en NaCl et en fonction de la température induisent également une perturbation de déplacement chimique de la résonance du W312 colinéaire sur la même ligne du spectre HSQC. Cet alignement de la résonance W312 sur le spectre HSQC étant retrouvé en présence des mutations P-A, pour toutes les formes minoritaires du W312 que ce soit pour NS5A-D2 WT ou pour chaque mutants P-A, et en présence des expériences sur l'effet de la concentration en NaCl et de la température, il suggère un échange rapide sur l'échelle de temps de la RMN entre deux états dont les pics sont aux extrémités de la ligne et dont la position n'est pas connue. D'après l'analyse des différents paramètres RMN (déplacements chimiques ^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, RDC NH , $\Delta\omega \text{H}_\beta$ du W312, ^{15}N R2, RDC_{NH}) ces deux états correspondent à un état structuré du W312 en haut à droite de la ligne et un état non structuré du W312 en bas à droite de la ligne. Le motif structural serait donc en échange rapide entre un état structuré et un état non structuré. Comme les formes minoritaires du W312 correspondent à des équilibres *cis/trans* lents de proline, le changement de conformation d'une proline en *cis* déstabilise le motif structural, ainsi on peut émettre l'hypothèse que l'équilibre *cis/trans* lent des prolines est responsable de l'équilibre rapide du W312 entre un état structuré et un état non structuré. Cet échange entre un état structuré et un état non structuré étant probablement trop rapide, il n'a pas pu être mis en évidence par des expériences de type CPMG. Le motif structural n'est donc pas totalement stable au sein de NS5A-D2 (JFH1), même si la conformation structurée du motif correspond à la population majoritaire, il est en équilibre dynamique entre un état structuré et un état non structuré. Les recherches effectuées dans la PDB, ont permis de montrer que le même motif structural P[X]WA est notamment conservé dans la famille des triosephosphate isomérase (TIMs) (Figure 135). Il correspond à une charnière en position N-terminal de la boucle catalytique L6 pouvant exister en conformation ouverte ou fermée (Casteleijn et al., 2006). Des études réalisées par RMN du fluor (Rozovsky et al., 2001),

(les auteurs ont marqué spécifiquement le W de la charnière P[X]WA avec du 5-fluoro-tryptophane) ont montré que la dynamique d'ouverture fermeture de la boucle catalytique L6 est régulée par cette charnière P[X]WA. Les changements de conformation de celle-ci permettent d'ouvrir et de fermer la boucle et donc de réguler l'activité enzymatique (Rozovsky et al., 2001; Kursula et al., 2004). Dans ce contexte, nous pouvons renommer le petit motif structural PW-turn identifié au sein de NS5A-D2 par PW-hinge afin de mettre en évidence la dynamique de cette microstructure. Comme pour le cas des TIMs, il semble que la dynamique du PW-hinge au sein de NS5A-D2 joue un rôle fonctionnel.

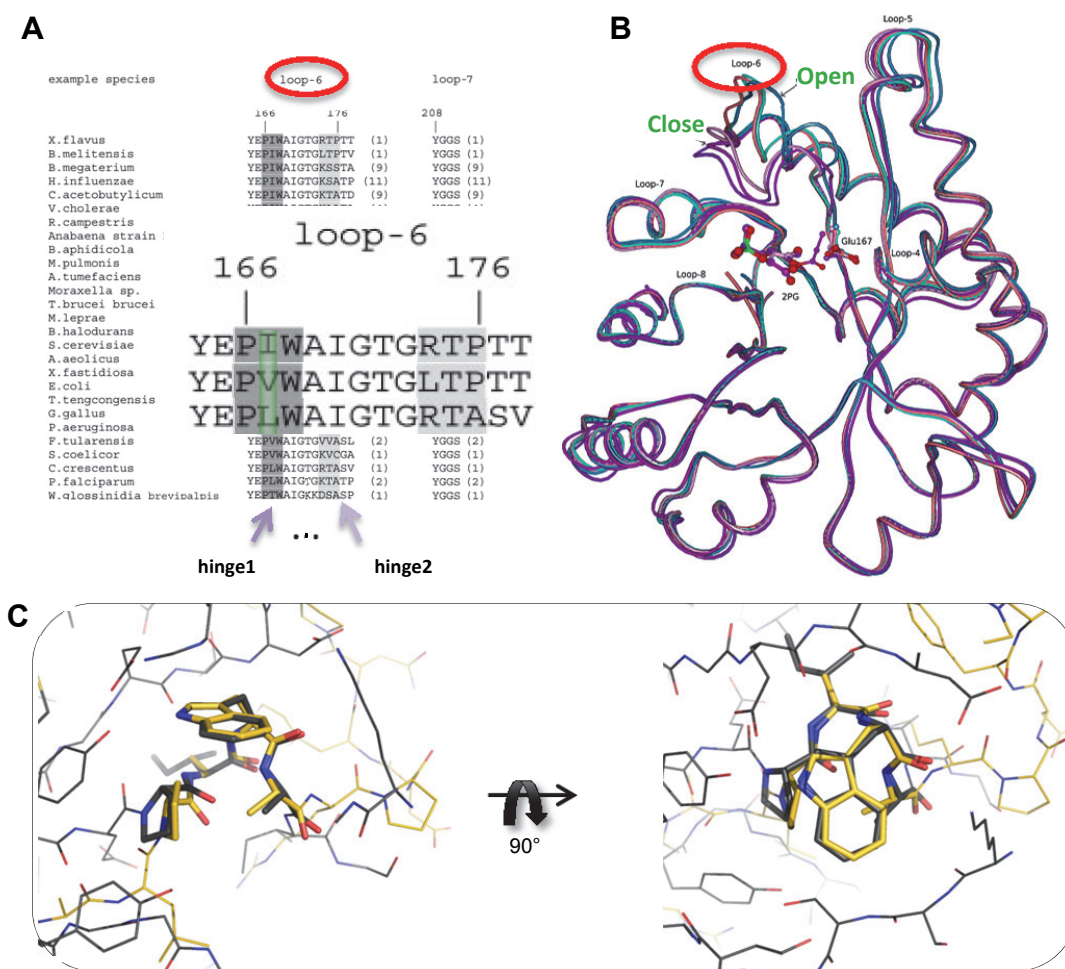


Figure 135. Le motif structural P[X]WA est conservé dans la famille des *triosephosphate isomerases* (TIMs) et correspond à une charnière en position N-terminale de la boucle catalytique L6 pouvant exister en conformation ouverte ou fermée. A, Figure extraite de Kursula et al., (2004). Variation de séquence des boucles 6 et 7. 133 séquences de TIMs de la banque de données SWISSPROT ont été alignées, les charnières N-terminale et C-terminale de la boucle L6 sont indiquées en gris foncé et gris clair respectivement. La séquence P[X]WA est très conservée au niveau de la charnière N-terminale de la boucle catalytique L6, cette séquence adopte la même conformation que la structure du motif que nous avons identifiée au sein de NS5A-D2 (JFH1) (panneau C). B, Figure extraite de Casteleijn et al., (2006), la boucle catalytique L6 peut exister en conformation ouverte ou fermée. Superposition de TIM WT avec et sans ligand, et du mutant P168A (mutation de la proline de la charnière P[X]WA) avec et sans ligand, soulignant la variabilité structurale de la boucle catalytique L6. C, Superposition du motif structural $^{310}\text{PAWA}^{313}$ caractérisé à l'aide du modèle peptidique au sein de NS5A-

D2 (JFH1) (en jaune) et le même motif structural au sein de la triosephosphate isomerase de *Staphylococcus aureus* (en gris).

L'inhibition de la CypA empêche la réplication de l'ARN du virus. Toutefois, le rôle que joue la CypA humaine dans ce processus reste à élucider. Sous pression de sélection aux inhibiteurs de cyclophilines des mutations de résistances ont été identifiées au sein du virus qui le rendent moins dépendant vis-à-vis de la CypA et par conséquent moins sensible au traitement de ces inhibiteurs. Ces mutations de résistances sont localisées dans NS5A et dans NS5B. Celles situées au sein du domaine 2 de NS5A confèrent le plus haut niveau de résistance (Yang et al., 2010). Les mutations de résistance identifiées au sein de NS5A-D2, D316E et DEYN, sont localisées dans le site d'interaction avec la CypA (Hanouille et al., 2009b), juste à côté de la charnière $^{310}\text{PW}^{312}$ -*hinge*, dans la région 310-320 qui adopte probablement une conformation de type polyproline. Nous avons montré qu'en présence de ces mutations de résistance la résonance du W312 est décalée sur la ligne du spectre HSQC identifiée précédemment, vers des déplacements chimiques ^1H , ^{15}N plus élevés, indiquant un niveau de structuration du motif *PW-turn* moins important par rapport à NS5A-D2 WT. La résonance du W312 est retrouvé à une position intermédiaire entre d'une part, le mutant NS5A-D2 P320A, NS5A-D2 WT, le mutant NS5A-D2 P306A, où le motif structural est présent, les mutants P319A, P315A où le motif structural est légèrement déstabilisé et d'autre part les mutants P310A et A311G où le motif structural est absent. Le motif structural est donc toujours présent avec ces mutations de résistance, mais la population de conformation non structurée augmente légèrement aux dépens de la population de conformation structurée. Lors d'un échange rapide entre deux états ($k_{\text{exch}} \gg \Delta\omega$), par RMN on observe un pic dont la position dépend du ratio de population entre ces deux états. Donc en présence de ces mutations de résistances D316E et DEYN, l'équilibre entre la conformation structurée du motif et la conformation non structurée est perturbée. On peut émettre l'hypothèse que ces mutations changent la conformation polyproline et déstabilise la charnière ^{310}P - ^{312}W . Cette déstabilisation pourrait s'expliquer par un ratio *cis/trans* des prolines légèrement plus élevé en présence de ces mutations (Figure 123, Figure 127, Figure 131). Yang et al., (2010) avaient observé précédemment par RMN que la mutation DEYN au sein de NS5A-D2 (JFH1) induisait un changement de conformation « plus étendue » sans avoir identifié de motif structural au sein de NS5A-D2. Ces résultats sont cohérents avec les nôtres, et indiquent qu'en présence des mutations de résistance le motif structural est moins stable.

Au cours de ce travail nous avons également évalué l'importance fonctionnelle du motif structural. Nous avons pu mettre en évidence que plus le motif structural est déstabilisé, plus la de réplication de l'ARN viral diminue. Il existe en effet une corrélation entre la position de la

résonance du W312 sur la ligne du spectre HSQC pour NS5A-D2 WT, NS5A-D2 DEYN, NS5A-D2 P310A et NS5A-D2 A311G, donc entre le niveau de structuration du motif, et la réplication de l'ARN viral. Yang et al., (2010), ont réalisé des mutagenèses dirigées par alanine-scanning de toutes les prolines localisées dans la région 270-333 de NS5A-D2 (JFH1), ils ont quantifié le niveau de réplication de ces mutants en réplicon sous-génomique avec des échelles + ou -. Voici le résumé de cette étude pour la région 306-320 : P320A (++++); WT, P306A, P319A (+++), P315A (+), P310A (-). Ces résultats confortent la cohérence de nos analyses, plus le motif structural est déstabilisé plus la réplication de l'ARN viral diminue. L'effet de la même mutation A311G au sein de NS5A-D2 (JFH1) sur la réplication de l'ARN viral avait déjà été étudiée par Ross-Thriepfand et al., (2013). Dans cette étude les auteurs ont réalisé une mutagenèse dirigée par alanine-scanning des 30 résidus de la région C-terminale de NS5A-D2 (JFH1) (région 309-339), lorsqu'une alanine est présente dans la séquence, celle-ci est mutée en glycine. Ils mettent ainsi en évidence que les mutations P310A, A311G, W312A et A313A abolissent la réplication de l'ARN viral et concluent que ces résidus sont essentiels. Tellinghuisen et al., (2007) ont également montré pour NS5A-D2 (Con1) que les mutations P314A et W316A abolissent la réplication de l'ARN viral, alors que la mutation I315A n'a pas d'effets. Ces résultats sont cohérents avec la déstabilisation de la microstructure pour les mutations P310A, A311G, W312A au sein de NS5A-D2 JFH1, pour les mutations P314A et W316A au sein de NS5A-D2 (Con1) et avec l'observation que la présence d'une alanine en position 315 dans NS5A-D2 (Con1) ou la présence d'une isoleucine en position 311 dans NS5A-D2 (JFH1) (Figure 132) est compatible avec la présence du motif structural. Nos recherches montrent donc que ce n'est pas la séquence primaire en acides aminés qui est importante pour la réplication de l'ARN viral mais la présence du motif structural.

Le motif structural est localisé dans le site d'interaction avec la CypA et la mutation de résistance D316E localisée dans ce motif le déstabilise. Afin de mieux comprendre le rôle de la CypA et de NS5A-D2 nous avons réalisé une étude comparative de la liaison et de l'activité PPIase de la CypA vis-à-vis de NS5A-D2 WT, NS5A-D2 D316E et NS5A-D2 A311G. Bien que les mutations de résistances au sein de NS5A-D2 rendent la réplication du VHC moins dépendante de la présence de CypA, nous avons montré que ces mutations n'empêchent pas la liaison entre NS5A-D2 et la CypA, ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec des expériences de GST pull-down (Coelmont et al., 2010). Néanmoins avec des expériences de titrations entre les peptides pepD2(JFH1) et la CypA, nous montrons que l'affinité de pepD2-D316E pour la CypA est intermédiaire entre l'affinité de pepD2-WT et celle de pepD2-A311G. Donc plus le motif

structural est déstabilisé plus l'affinité entre NS5A-D2 et la CypA diminue. Le motif structural est donc important pour l'interaction avec la CypA.

En plus de sa fonction de liaison, la CypA possède également une activité PPIase, le rôle respectif de ces deux fonctions pour la réplication de l'ARN du VHC n'est pas connu et est difficile à caractériser. En effet même si des mutants catalytiques de l'activité PPIase de la CypA existent, ces mutants perturbent également le mode de liaison de la CypA (Chatterji et al., 2009; Braaten et al., 1997). Il est alors difficile de savoir si c'est la liaison ou l'activité PPIase de la CypA qui est importante pour la réplication de l'ARN du VHC. Nous avons montré avec des spectres d'échange ^1H - ^{15}N z-exchange que l'activité PPIase de la CypA sur la proline P310 est plus importante en présence de la mutation A311G qui casse le motif structural. Avec les mutations de résistances D316E et DEYN, elle est intermédiaire entre celle de NS5A-D2 WT et NS5A-D2 A311G. L'étude de l'activité PPIase de la CypA sur les peptides de NS5A-D2 WT et D316E marqués avec des expériences d'échange Ca_zN_z , permettront de quantifier l'activité PPIase de la CypA directement sur tous les résidus de prolines.

	Motif structural	Affinité avec la CypA	Activité PPIase de la CypA sur P310
NS5A-D2 WT	↑ +	↑ +	↓ -
NS5A-D2 D316E	+/-	+/-	+/-
NS5A-D2 A311G	↓ -	↓ -	↑ +

Figure 136. Etude comparative de l'activité PPIase et de l'interaction de la CypA sur NS5A-D2 WT, NS5A-D2 D316E et NS5A-D2 A311G.

Que ce soit pour la liaison ou l'activité PPIase de la CypA, la mutation de résistance à des inhibiteurs de CypA a un effet intermédiaire entre la mutation A311G cassant le motif structural et NS5A-D2 WT où le motif structural est présent (Figure 136). La mutation de résistance D316E permet au VHC d'être moins dépendant de la CypA pour se répliquer, cette mutation devrait donc reproduire le rôle de la CypA. Le motif étant déstabilisé en présence de la mutation de résistance D316E ou DEYN, on peut émettre l'hypothèse que la CypA aurait pour rôle de déplacer l'équilibre du motif vers une microstructure un peu moins stable. Ceci pourrait donner une explication rationnelle au niveau de résistance à la CsA plus élevé pour la mutation DEYN (Yang et al., 2010) qui déstabilise davantage le motif que la mutation D316E. Nous avons vu que lorsque les prolines sont en conformations *cis* au sein du motif structural, cela déstabilise le motif, on peut donc supposer que la déstabilisation du motif par la CypA se fait grâce à son

activité PPIase sur les prolines du motif. En présence des mutations de résistances et de la mutation A311G, l'affinité de NS5A-D2 pour la CypA est moins importante. Cette déstabilisation du motif par la CypA aurait pour effet de diminuer l'interaction de NS5A-D2 avec cette dernière, ceci pourrait permettre à NS5A-D2 d'interagir avec d'autres partenaires, notamment NS5B. En effet, il a été montré récemment que la CypA et NS5B partagent le même site d'interaction sur NS5A-D2 au niveau du petit motif structural (Rosnoblet et al., 2012). La dynamique entre les conformations structurée/désordonnée du motif *PW-hinge* serait régulée de manière dynamique par la CypA. Ainsi comme pour la charnière PW des TIMs, la régulation dynamique de cette charnière au sein de NS5A-D2 entre une conformation structurée et une conformation désordonnée joue un rôle fonctionnel. On peut penser que si le motif était en conformation structurée pendant 100% du temps, cela abolirait la réplication de l'ARN viral.

Les IDPs jouent un rôle essentiel dans les voies de signalisation (Wright and Dyson, 1999). Ferreon et al., (2013), en utilisant une technique smFRET (*single-molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer*), ont étudié la probabilité que la formation d'un complexe d'une IDP virale, EA1, avec soit une ou deux protéines de l'hôte (CBP et pRB), permette d'activer ou d'inhiber une voie de signalisation cellulaire. EA1 acquiert une structure lors de la liaison avec ces partenaires. Ils montrent que les interactions entre EA1, CBP et pRB permettent une coopération positive ou négative pour la transmission du signal en fonction des différentes populations disponibles de EA1. Ferreon et al., montrent ainsi que l'existence des IDPs comme un ensemble de conformations en échange, permet à celles-ci d'être impliquées dans différentes voies de signalisations cellulaires. Les IDPs peuvent être régulées pour que la distribution de leurs populations soit optimisée et des facteurs cellulaires peuvent être impliqués dans cette régulation en modifiant les sites d'interactions disponibles. Il pourrait y avoir une compétition entre différents partenaires d'interaction pour un même site d'interaction au sein de EA1. Notre étude suppose également un phénomène de régulation du motif structural au sein de NS5A-D2 par la CypA. On peut donc supposer un phénomène de compétition de l'interaction de NS5A-D2 entre la CypA et NS5B finement régulé de manière spatio-temporelle par la CypA et nécessaire à la réplication de l'ARN du VHC. L'interaction entre NS5A-D2 et NS5B fait l'objet de la partie suivante. Nous comparons deux méthodes pour étudier l'interaction entre ces deux protéines par RMN du fluor. Cette partie est rédigée en anglais en vu d'une publication.

Avec cette étude nous avons mis en évidence la présence d'une microstructure au sein du domaine 2 désordonné de NS5A et précisé comment celle-ci régule la fonction de NS5A dans le cadre de la réplication de l'ARN du VHC. L'impact structural et conformationnel des mutations

de résistances à des inhibiteurs de CypA sur cette microstructure permet de mieux comprendre le rôle respectif de NS5A-D2 et de la CypA pour la réplication de l'ARN du VHC.

3 Study of NS5A-D2 interaction with NS5B by ^{19}F NMR

3.1 Introduction

NMR spectroscopy is ideally suited to measure the interaction between (bio)molecules in solution. Besides evidencing the interaction, it can give detailed information on the interaction sites on both partners, but equally on the thermodynamic parameters of the interaction. The dissociation constant K_D characterizing the interaction can thereby be deduced from a titration experiment, whereby the resonance shifts or broadening are observed as a function of the added concentration of the partner. A prerequisite for such studies, though, is the capacity to observe the NMR spectrum. Whereas size limits of the molecules that can be studied have been alleviated by recent progress in deuteration schemes combined with enhanced NMR methods, the exchange rate also has a significant impact on the spectral quality. For many biological systems with K_D values in the 1-100 μM range, intermediate exchange between the free and bound states leads to excessive line broadening, and one loses the resonances of interest sometimes as early as the first titration points.

Such was the case when we studied the molecular interaction between the RNA dependent RNA polymerase NS5B of the Hepatitis C virus (HCV) with the second domain (D2) of the NS5A protein. Essential for the efficient replication, this latter NS5A protein exerts an ill-characterized function towards NS5B, probably related to the dynamic features of the initiation and elongation of the transcription process. Whereas by NMR, we could localize three distinct interaction zones on NS5A by their disappearance when an equimolar amount of NS5B was added (Rosnoblet et al., 2012), a titration experiment proved difficult. A study by surface Plasmon resonance, with NS5B immobilized at the surface, yielded a value of Biacore $21 \pm 14 \mu\text{M}$ for the K_D parameter, based on the ratio of the observed association and dissociation rates. Here, we detail our efforts to incorporate a ^{19}F nucleus in NS5A by two different strategies, and explore the use of ^{19}F NMR to monitor the same interaction. We first use the presence of two natural cysteine residues in NS5A-D2 as well as an additional engineered cysteine in the N-terminus of this fragment to conjugate them with a 2-iodo-*N*-(trifluoromethyl)acetamide. Secondly, following the strategy proposed by Crowley et al., (2012), we exploited the presence of two Trp residues in NS5A-D2 to incorporate a ^{19}F nucleus in the indole ring.

3.2 Results

3.2.1 Labelling of the proteins with a ^{19}F fluorine nucleus

The native NS5A-D2 JFH1 (249-341) sequence contains two cysteine residues (C298 and C338) (Figure 137 A). Site-specific mutagenesis was employed to obtain single cysteine mutants NS5A-D2 C298S and NS5A-D2 C338S. We also added an additional cysteine at the N-terminus of the protein. Thus we obtain three single cysteine mutants (NS5A-D2 C298S, NS5A-D2 C338S and NS5A-D2 2CS M254C) each with one cysteine located along the NS5A-D2 sequence (Figure 137 A). We introduced ^{19}F fluorine nuclei post-translationally by chemical conjugation of 2-iodo-*N*-(trifluoromethyl)acetamide with the cysteine side chain of NS5A-D2 (Figure 137B). As seen in the comparison between the ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of ^{15}N -NS5A-D2 WT and ^{15}N -CF₃-NS5A-D2 WT (Figure S143) the yield of ^{19}F nucleus incorporation on C298 and C338 side chain is 100%. The same yield is obtained for NS5A-D2 single cysteine mutants.

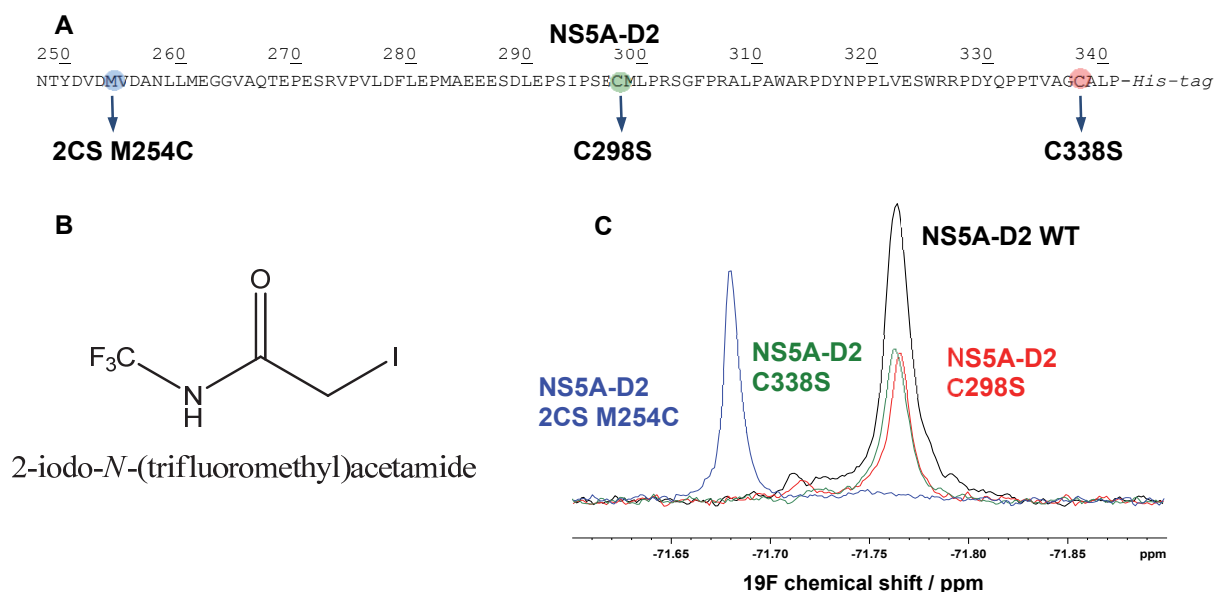


Figure 137. A, NS5A-D2 amino acid sequence (249-341) from HCV JFH1 strain, two natural cysteines of NS5A-D2, C298 and C338, are highlighted in green and red respectively and are used for fluorine labelling. Site-directed mutagenesis that we performed in order to obtain three single cysteine mutants located throughout NS5A-D2 sequence are indicated by arrows with the corresponding mutation, 2CS M254C, C298S and C338S. B, Chemical structure of 2-iodo-*N*-(2,2,2-trifluoromethyl)acetamide. C, Overlay of 1D ^{19}F NMR spectra of ^{19}F -cysteine labelled NS5A-D2 WT and single cysteine mutants, in black NS5A-D2 WT, in red NS5A-D2 C298S, in green NS5A-D2 C338S and in blue NS5A-D2 2CS M254C.

NS5A-D2 JFH1 contains two tryptophan residues in position 312 and 325. Biosynthetic incorporation of ^{19}F -tryptophan in NS5A-D2 WT was done by introducing 5-fluoroindole in the minimal medium culture, allowing *Escherichia coli* to produce NS5A-D2 containing ^{19}F -

tryptophan (5F-W NS5A-D2). The ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of ^{15}N NS5A-D2 and 5F-W ^{15}N NS5A-D2 are shown Figure 138 A, B. The spectra overlay very well showing that ^{15}N -NS5A-D2 and 5F-W ^{15}N NS5A-D2 have the same conformational behaviour. This was confirmed with ^1H - ^{15}N chemical shift analysis between WT NS5A-D2 and 5F-W NS5A-D2 (Figure 138 F). The degree of fluorination was estimated by comparing the relative ratio of the indole NH peaks in the ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N NS5A-D2 and 5F-W ^{15}N NS5A-D2, and was found to be 80% (Figure 138 C, D, E).

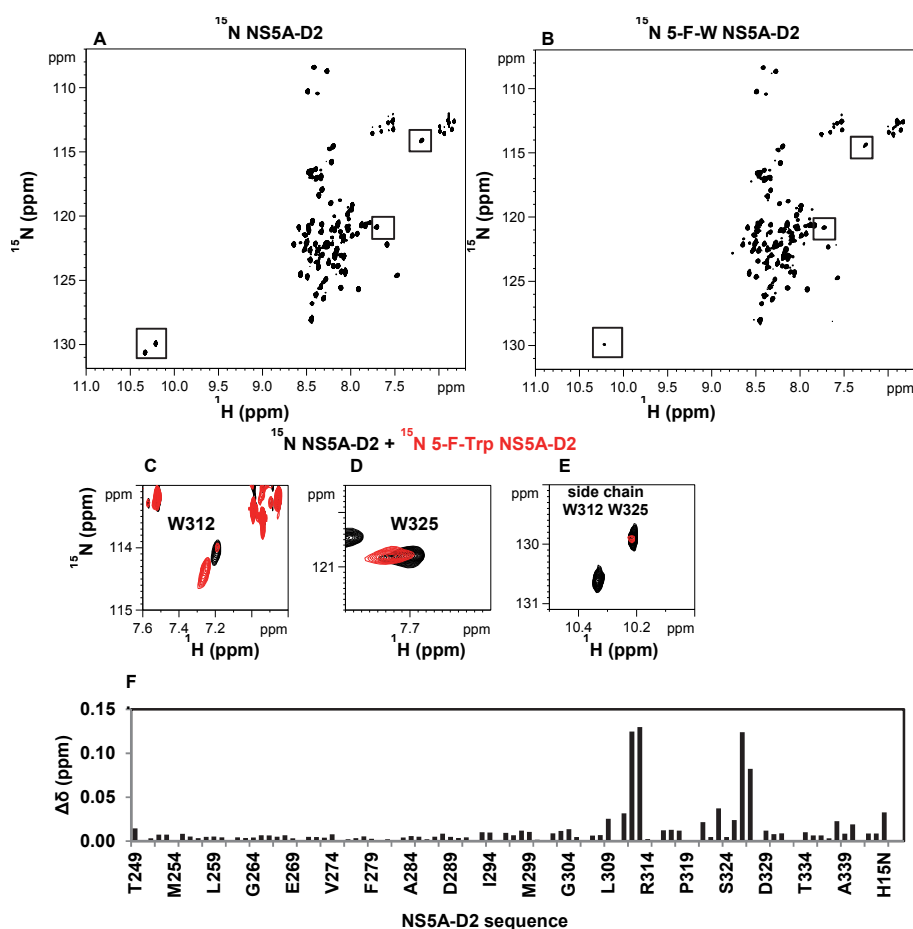


Figure 138. ^{19}F indole labelling. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of ^{15}N NS5A-D2 (A) and 5F-W ^{15}N NS5A-D2 (B). Data were acquired for each spectrum with 2048 x 256 points over 41 minutes at 600 MHz. Highlighted peaks correspond to W312, W325 and their side chains that are shown on panel C, D and E. (C, D, E) Each panel corresponds to the superposition of ^{15}N -NS5A-D2 spectrum (black) with 5F-W ^{15}N -NS5A-D2 spectrum (red) centered on W312 ^{15}N -NH backbone (C) W325 ^{15}N -NH backbone (D) and W312 and W325 NH side chain (E). (F) Chemical shift perturbation induced by 5F-W. ^1H and ^{15}N combined chemical shift difference between NS5A-D2 ^1H - ^{15}N HSQC and 5F-W NS5A-D2 ^1H - ^{15}N HSQC (shown in A) plotted along NS5A-D2 primary sequence. The combined chemical shift perturbation are calculated with the relationship $\Delta\delta = |\Delta\delta(^1\text{HN})| + 0.2 \cdot |\Delta\delta(^{15}\text{N})|$ where $\Delta\delta(^1\text{HN})$ and $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ are the chemical shift perturbations in the ^1H and ^{15}N dimensions respectively. We observed minimal perturbations for the two tryptophans and their neighboring residues

3.2.2 Spectra of ^{19}F -cysteine labelled NS5A-D2 with increasing amounts of NS5B

The 1D ^{19}F NMR spectrum of ^{19}F -cysteine labelled NS5A-D2 WT consists of one rather broad peak containing the two superposed ^{19}F signals of CF₃-298 and CF₃-338, which are difficult to deconvolute (Figure 137C). ^{19}F NMR spectra of CF₃-NS5A-D2 WT were obtained with increasing NS5B $_{\Delta 21}$ concentrations and are shown Figure 139A. We detect a gradual chemical shift perturbation with increasing NS5B $_{\Delta 21}$ concentrations. This suggests that the system is in a rapid to intermediate exchange between the bound and the free state. Estimation of the K_D value on basis of both linewidth and peak shift gives 5 μM (Figure 139B, C).

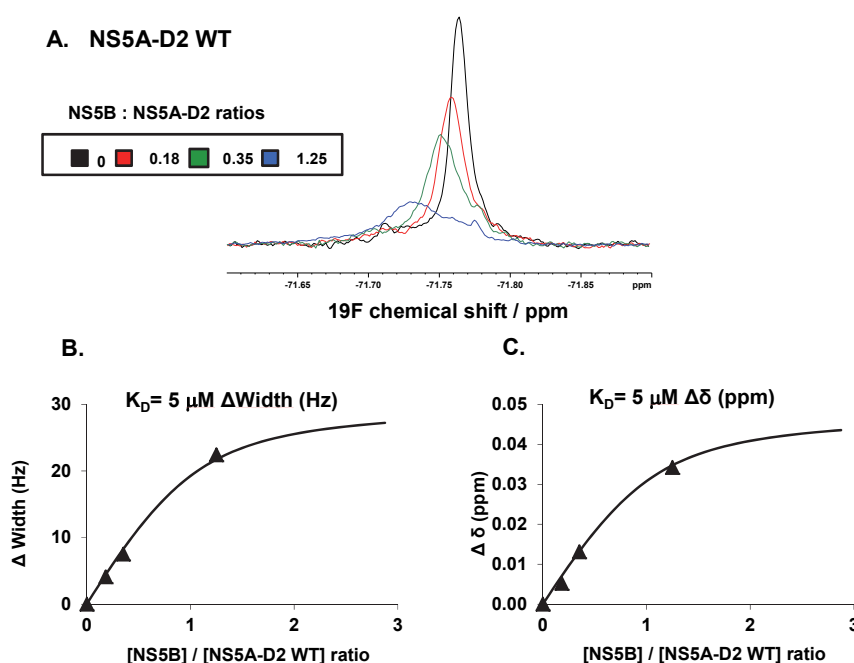


Figure 139. A, Superimposition of 1D ^{19}F NMR spectra of CF₃-NS5A-D2 WT with increasing amounts of NS5B $_{\Delta 21}$. The changes in ^{19}F linewidth (B) or in chemical shift (C) with [NS5B $_{\Delta 21}$]/ [NS5A-D2] from A are plotted and allow the estimation of a 5 μM K_D value.

1D ^{19}F NMR spectra of NS5A-D2 C298S and NS5A-D2 C338S mutants confirm that ^{19}F -C298 and ^{19}F -C338 resonances have nearly the same chemical shift in NS5A-D2 WT (Figure 137C red and green spectra). Titration experiments performed on these mutants with increasing amounts of NS5B $_{\Delta 21}$ give a higher K_D value of 15 μM (Figure S144 and Figure S145). The higher affinity with NS5A-D2 WT suggests that the presence of two trifluoromethyl group increases the affinity between NS5A-D2 WT and NS5B $_{\Delta 21}$. This is probably due to the presence of the additional hydrophobicity of the trifluoro-methyl group on cysteine side chain residues. The ^{19}F NMR spectrum of the mutant with an additional cysteine in the N-terminus, NS5A-D2 2CS M254C mutant, is shown in blue on Figure 137C. ^{19}F -C245 peak is significantly different both in peak

position and intensity, when compared to both other cysteines. This is probably due to the position of C254 in the N-terminal region of NS5A-D2 protein which is negatively charged with three Asp and one Glu, the higher intensity observed can be due to the enhanced flexibility of the N-terminal region. The titration experiment performed on NS5A-D2 2CS M254C with increasing amount of NS5B $_{\Delta 21}$ gives nevertheless again 13 μ M for the K_D value (Figure S146).

3.2.3 Spectra of ^{19}F -tryptophan labelled NS5A-D2 with increasing amounts of NS5B

On 1D ^{19}F NMR spectrum of 5F-W NS5A-D2 WT (Figure 140, black line), the two tryptophans have different environment and thus have different chemical shift. Two peaks can be deconvoluted at 600 MHz, contrary to NS5A-D2 WT labelled on its cysteine side chain by trifluoromethyl-acetamide. However this peak separation is strongly buffer dependant. In this buffer: 30 mM NaPi pH 6.4; 30 mM NaCl; 0.1 mM EDTA, we detect only one peak whereas in a buffer where salt NaPi is replaced by aspartate and glutamate (20 mM Tris-Cl pH 7, 100 mM Arginine, 100 mM Glutamate, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , and 2 mM EDTA) two peaks are distinguishable. The peak separation is also increased with lower temperature with the drawback of line broadening.

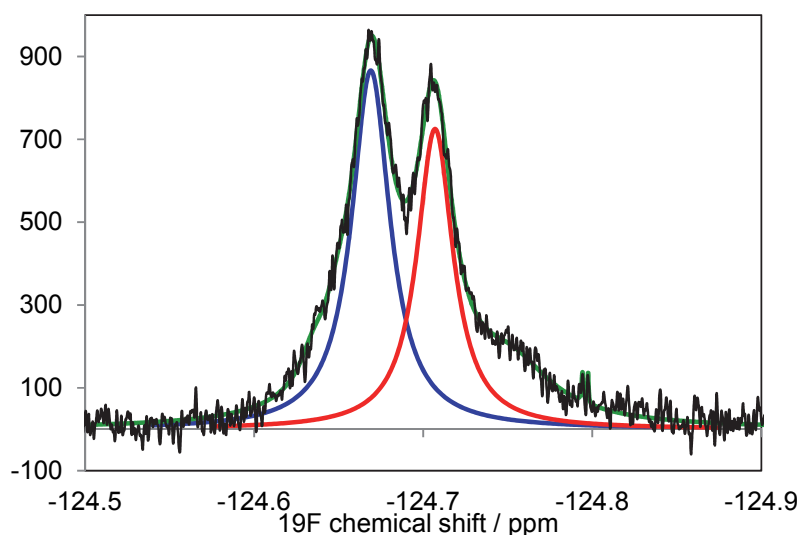


Figure 140. Deconvolution of 1D ^{19}F NMR spectra of 5F-W NS5A-D2. The experimental spectrum (black) has been deconvoluted into 2 majors and 5 minors signals with Lorentzian line shape. Only the two major signals are shown here. Peak picking was done automatically with Topspin 2.1. The thick green line represents the sum of the seven deconvoluted signals. The two major signals in blue and red corresponds to W325 and W312 respectively.

1D ^{19}F NMR spectrum of 5F-W NS5A-D2 WT shows that 5F-W312 and 5F-W325 resonances are also different in peak intensity. On ^1H , ^{15}N -HSQC spectrum of ^{15}N NS5A-D2, NH side chain of W312 is less intense than NH side chain of W325 (Figure 138 E). Thus on 1D ^{19}F NMR spectrum of 5-F-W NS5A-D2 we can deduce that the less intense peak at -124.70 ppm corresponds to W312 and the other peak at -124.67 ppm to W325.

It should be noted that the 1D ^{19}F NMR spectrum of 5-F-W NS5A-D2 was deconvoluted into seven signals (Figure S147), the two major signals corresponds to W325 and W312 respectively. The 5 remaining signals probably correspond to minor forms of W312 and W325. Indeed NS5A-D2 contains many proline residues (15 prolines in the 94-aa fragment of NS5A-D2). Less intense peaks can be observed in the ^1H , ^{15}N -HSQC spectrum of NS5A-D2 corresponding to residues in the vicinity of a proline in the *cis* conformation. W312 and W325 possess 5 and 3 prolines respectively in their neighborhood. Thus the 5 less intense signals on the deconvoluted spectrum of 5-F-W NS5A-D2 probably correspond to W312 and W325 in the vicinity of prolines in *cis* conformation.

1D ^{19}F NMR spectra recorded on 61 μM 5-F-W NS5A-D2 were obtained with increasing NS5B $_{\Delta 21}$ concentrations and are shown in supplementary material Figure S148. The spectra from the titration experiments were deconvoluted by fixing the position of the two major peaks (Figure S148). We detect a broadening of the 5-F-W312 peak as NS5B $_{\Delta 21}$ is added. However, we do not observe chemical shift perturbations (Figure S148) contrary to the experiment performed with NS5A-D2 labelled on its cysteine side chain by trifluoromethyl-acetamide group. NS5B $_{\Delta 21}$ interacts more strongly with W312 and its broadening permits us to conclude that the system is in the regime of slow exchange, in agreement with the idea that tryptophan undergoes a pronounced chemical shift perturbation when interacting with NS5B $_{\Delta 21}$. The increase of linewidth signals of the deconvoluted 5-F-W312 signal with NS5B $_{\Delta 21}$ concentrations can be used to plot a titration curve, and from which we find a K_D value of 50 μM (Figure 141).

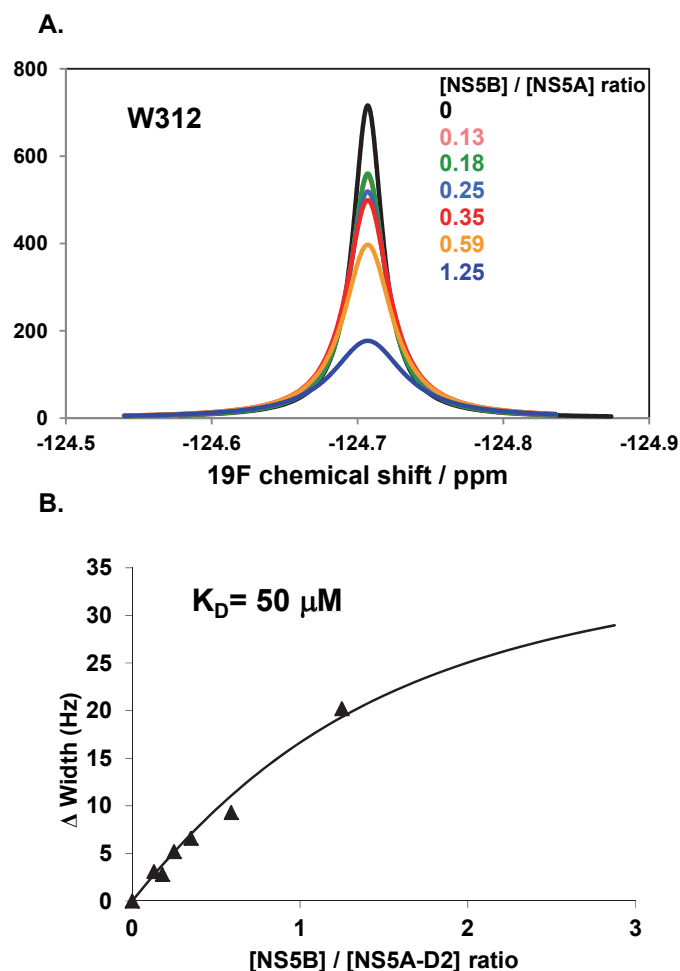


Figure 141. NMR titration of 5F-W NS5A-D2 by NS5B_{Δ21}. A, Superposition of the deconvoluted ¹⁹F signals corresponding to W312 peak acquired in the presence of increasing amounts of NS5B_{Δ21}. B, Titration curve corresponding to experiment A. The linewidth of the deconvoluted ¹⁹F W312 signal is plotted as a function of [NS5B]/[NS5A-D2] molar ratios.

3.3 Discussion

The domain 2 of NS5A is known to be essential for HCV RNA replication, however its exact molecular function remains unclear. Recently, in this mainly intrinsically disordered domain, we identified a short structural motif, a PW-turn, that is conserved across all HCV genotypes and that is essential for RNA replication. The host protein CypA plays an essential role in HCV RNA replication but its molecular function is unknown. NS5A-D2 and NS5B are linked to CypA as resistance mutations appeared in these domain under low doses of Cyclosporine A (CsA), the well-known CypA inhibitor with anti-HCV properties (Fernandes et al., 2007; Robida et al., 2007). NS5B and CypA share a common binding site on NS5A-D2 located in the region 306-323 (Rosnoblet et al., 2012) that include this ³¹⁰P³¹²W turn. Traditional ¹H, ¹⁵N, ¹³C solution state NMR proved difficult to determine the affinity of the interaction between NS5B and NS5A-D2

because of ^{15}N NS5A-D2 HSQC spectrum broadening in presence of an equimolar concentration of NS5B. Here, 1D ^{19}F NMR spectroscopy was used to investigate the interaction between NS5A-D2 and NS5B from JFH1 HCV strain with two different fluorination strategies for NS5A-D2. We show that these methods are well suited to study the interaction between two proteins qualitatively and quantitatively.

First, we used the presence of two natural cysteines in NS5A-D2 and single serine to cysteine mutation to introduce a ^{19}F label by means of trifluoromethyl-acetamide group on cysteine side chain. Then, ^{19}F -tryptophan was incorporated in W312 (which is the residue involved in the $^{310}\text{P}^{312}\text{W}$ turn) and in W325 of NS5A-D2. ^{19}F NMR can be used for the direct observation of the newly modified cysteine or tryptophan side chains. The ^{19}F chemical shift perturbation and signal broadening enable us to study protein-protein interaction. The labelling by a ^{19}F nucleus on NS5A-D2 cysteine side chain shows that NS5A-D2 is mainly disordered as these labelled cysteines have the same NMR chemical shift, except for the cysteine in the N-terminal region which is more acidic. ^{19}F -W312 and ^{19}F -W325 in contrast have different chemical shifts, that can be explained by the fact that W312 is involved in a short structural motif PW-turn. 1D ^{19}F NMR spectrum of 5-F-W NS5A-D2 was deconvoluted into seven signals (Figure S147), the two major signals corresponds to W325 and W312 respectively. Interestingly, only W312 broadening is observed as NS5B is added, this result is consistent with the binding site of NS5B on NS5A-D2 that we reported previously (Rosnoblet et al., 2012). The increased linewidth of the W312 signal with increased NS5B concentrations allows the determination of a K_D value of 50 μM (Figure 141). This is in good agreement with the value found in 2012 (Rosnoblet et al., 2012). Indeed we found that CypA and NS5B both interact with similar affinities with NS5A-D2, and NMR titration experiment with the NS5A-D2 and CypA allowed us to quantify this interaction with a K_D value of 64 μM (Hanouille et al., 2009). The lower K_D value between NS5B and NS5A-D2 found previously with SPR is probably due to the method, with one of the partner immobilized on a surface. Here using NMR titration with ^{19}F -tryptophan labelled NS5A-D2 we can confirm that the interaction between NS5B and NS5A-D2 is indeed in the same range than the one we found between CypA and NS5A-D2. In a future study, it would be interesting to see if the PW-turn in NS5A-D2 is important for the interaction with NS5B by doing the same titration experiments with the mutant NS5A-D2 A311G we identified, in which the structural motif is disrupted.

The production of 5-fluoro-tryptophan labelled protein with 5-fluoroindole is a strategy developed by Crowley et al., (2012), it has the advantage to be very inexpensive compared to 5-fluoro-L-tryptophan. This strategy has already been used by Curtis-Marof et al., (2014) to study

the interaction between the human protein disulphide isomerase (hPDI) and a small ligand. In their study they do not use broadening but chemical shift of ^{19}F NMR resonance to monitor the interaction between these two partners. Thus, depending of the exchange regime of the interaction, the ^{19}F -tryptophan signal can be broadened and/or shifted by the addition of a partner and this can be used to extract a dissociation constant in solution.

Titration experiments with fluorine-cysteine labelling induced broadening and shifting of ^{19}F NMR signal. Compared to ^{19}F -Tryptophan labelling, ^{19}F -Cysteine labelling provides a fast exchange between the bound state and the free state on the chemical shift frequency scale. Thus depending on the ^{19}F labelling strategy, for the same interaction study the system can be in a fast or slow exchange.

The incorporation of fluorine probes whether it be by biosynthetic incorporation of 5-fluoroindole on tryptophan side chain or with chemical modification using 2-iodo-*N*-(trifluoromethyl)acetamide on cysteine side chain, only weakly affects the conformation of the protein as can be seen on Figure S143 and on Figure 138F. In this study we used the 2-iodo-*N*-(trifluoromethyl)acetamide for cysteine side chain labelling. As with 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetone (BFTA) used by Zhu et al., (2015), this tag requires a simple one-step reaction, it is an equal population trifluoromethyl tag as a consequence it gives three-fold increase in the *signal to noise* ratio compared to ^{19}F -tryptophan labelling, and the fast tumbling of this methyl group averages the chemical shift to give a single signal (Figure 142). 2,2,2-trifluoroethyl-1-thiol (TFET) is another commonly used ^{19}F NMR probe, used by Didenko et al., (2013) and Horst et al., (2013). It can be conjugated to free thiols in a two steps reaction and is attached through a disulfide bond and thereby is not really stable in mild reductive conditions. However it has the advantage of increasing flexibility compared to BFTA substituent whose carbonyl group imposes a planar geometry on the fluorine label (Figure 142).

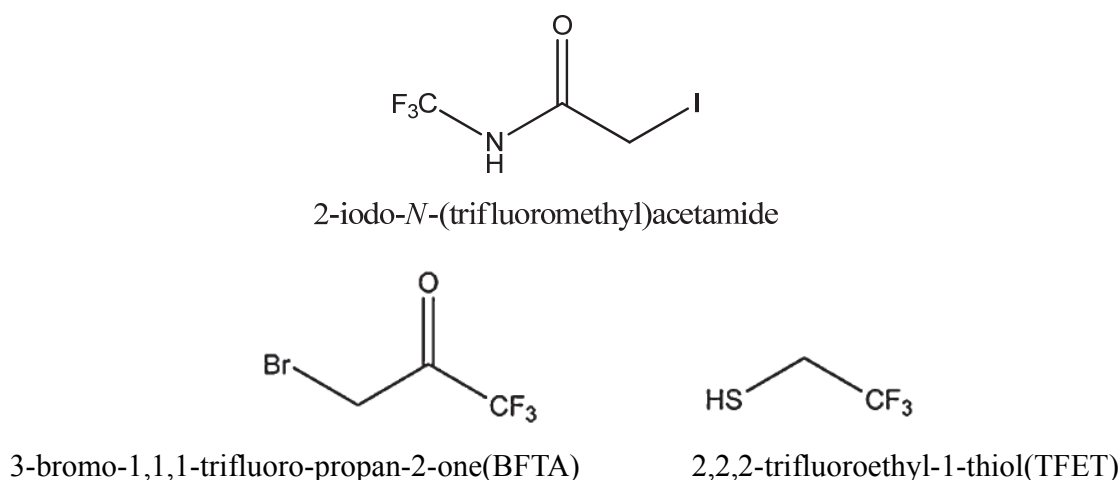


Figure 142. Structures of three cysteine-specific trifluoromethyl probes.

Table 1. Differences between the two methods used herein for studying protein-protein interaction with fluorine-labelled protein.

¹⁹ F Tryptophan labelling 5-F-Trp	Protein must contain W	Biosynthetic incorporation	5-F-Trp incorporation ~ 80%	Lower sensitivity long NMR experiments	Linewidth broadening	Slow exchange K _{ex} << Δω	Do not modify the strength of binding K _d titration curve Δ width (Hz)
¹⁹ F Cysteine labelling CF3	Possibility of site-directed mutagenesis CS	Post-translational introduction	100% labelling	Higher sensitivity short NMR experiments	Chemical shift perturbation	Fast exchange K _{ex} >> Δω	May increased the strength of binding (supplemental hydrophobicity contribution) K _d titration curve Δδ(ppm)

3.4 Experimental Section

3.4.1 Site-Directed Mutagenesis

For titration experiments with ¹⁹F-cysteine labelled NS5A-D2, three single-cysteine mutants (NS5A-D2 C298S, NS5A-D2 C338S and NS5A-D2 2CSM254C) were produced with the Wild Type NS5A-D2 pT7.7 plasmid using Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and verified by DNA sequencing.

3.4.2 Expression and Purification of Non-labeled NS5B_{Δ21} (JFH1)

Expression and purification of recombinant non-labeled NS5B_{Δ21} from HCV JFH1 strain were done as described previously in Rosnoblet et al. (2012). The NS5B_{Δ21} storage buffer was removed and exchange with a 2 ml spin desalting column (Thermo Scientific), to 20 mM Tris-Cl pH 7, 100 mM Arginine, 100 mM Glutamate, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and 2 mM EDTA and 5% D₂O for NMR titration experiments.

3.4.3 Expression and Purification of ^{15}N -labeled and ^{15}N , ^{19}F -Tryptophan-labeled NS5A-D2 (JFH1)

Expression and purification of recombinant ^{15}N -labeled NS5A-D2 from HCV JFH1 strain were done as described previously (Hanouille et al., 2009). To obtain fluorination in accordance with the recently published protocol by Crowley and co-workers (Crowley et al., 2012) an additional step was included in the protocol for NS5A-D2 production. The method utilizes a minimal growth M9 medium supplemented with 60 mg.L⁻¹ of 5-fluoroindole (SIGMA), 1 g.L⁻¹ of [^{15}N]-NH₄Cl and 4 g.L⁻¹ of ^{12}C -glucose. 60 mg of 5-fluoroindole dissolved in 0.5 ml of dimethylsulfoxide (DMSO) was added 15 minutes prior to induction of the protein with 400 μM IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) in 1L of culture. For NMR titration experiments 5F-W ^{15}N NS5A-D2 samples are in 20 mM Tris-Cl pH 7, 100 mM Arginine, 100 mM Glutamate, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA and 5% D₂O.

3.4.4 Cysteines Fluorine Labelling

Cysteine thiols of wild type NS5A-D2, C338S, C298S or 2CS M254C mutant of NS5A-D2 (JFH1) were labeled with 2-iodo-*N*-(trifluoromethyl)acetamide. A 100 μM protein solution in 50 mM ammonium bicarbonate was first thoroughly reduced by incubation with 1 mM Tris-(Hydroxypropyl) phosphine, for 1 h at room temperature. 2.5 mM of 2-iodo-*N*-(trifluoromethyl)acetamide was then added and incubation was then pursued for 3 h. The unreacted 2-iodo-*N*-(trifluoromethyl)acetamide was removed by buffer exchange with a 2 ml spin desalting column of (Thermo Scientific) equilibrated in 20 mM Tris-Cl pH 7, 100 mM Arginine, 100 mM Glutamate, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and 2 mM EDTA and 5% D₂O for NMR titration experiments.

3.4.5 NMR Titration Experiment

All NMR experiments were performed at 298 K using a Bruker 600 MHz spectrometer equipped with a cryogenic probe. 1D ^{19}F NMR spectra were collected using 90° pulse width of around 14.5 μs and proton decoupling was employed. The chemical shifts were referenced using the methyl signal of TMSP (sodium 3-trimethyl-silyl-[2,2',3,3'-d₄] propionate) at 0 ppm on 1D ^1H NMR experiment.

○ *NMR titration experiments with ^{19}F -Tryptophan labelling*

NMR titrations were carried out by acquiring 1D ^{19}F NMR spectra on sample of 61 μM 5F-W NS5A-D2 with the addition of increasing amounts of unlabeled NS5B $_{\Delta 21}$. The molar ratio [NS5B $_{\Delta 21}$] / [5F-W NS5A-D2] used are 0, 0.13, 0.18, 0.25, 0.35, 0.59 and 1.25 with the concentration of 5F-W NS5A-D2 kept constant at 61 μM for each molar ratio. Each 1D ^{19}F NMR experiment was acquired over 2h 50min using 2816 scans, a relaxation delay of 1s and an acquisition time of 2.59 s. The experimental spectra have been deconvoluted using Topspin 2.1. For determination of dissociation constant, broadening linewidth of the deconvoluted spectra (Δ width (Hz)) was plotted as a function of the molar ratio [NS5B $_{\Delta 21}$] / [5F-W NS5A-D2] permitting the determination of a K_D value.

○ *NMR titration experiments with ^{19}F -Cysteine labelling*

NMR titrations were carried out by acquiring 1D ^{19}F NMR spectra on sample of 30 μM CF $_3$ -NS5A-D2 WT or CF $_3$ -NS5A-D2 cysteine mutants with the addition of increasing amounts of unlabeled NS5B $_{\Delta 21}$. The molar ratio [NS5B $_{\Delta 21}$] / [CF $_3$ -NS5A-D2] used are 0, 0.18, 0.36, and 1.25. The starting concentration of 30 μM NS5A-D2 was diluted by addition of increasing amounts of unlabeled NS5B $_{\Delta 21}$. Each 1D ^{19}F NMR experiment was acquired over 2min and 10s using 128 scans, with a relaxation delay of 1s and an acquisition time of 0.734 s. The chemical shift perturbation of ^{19}F resonances were used to derive the dissociation constant.

3.5 Supplementary Material

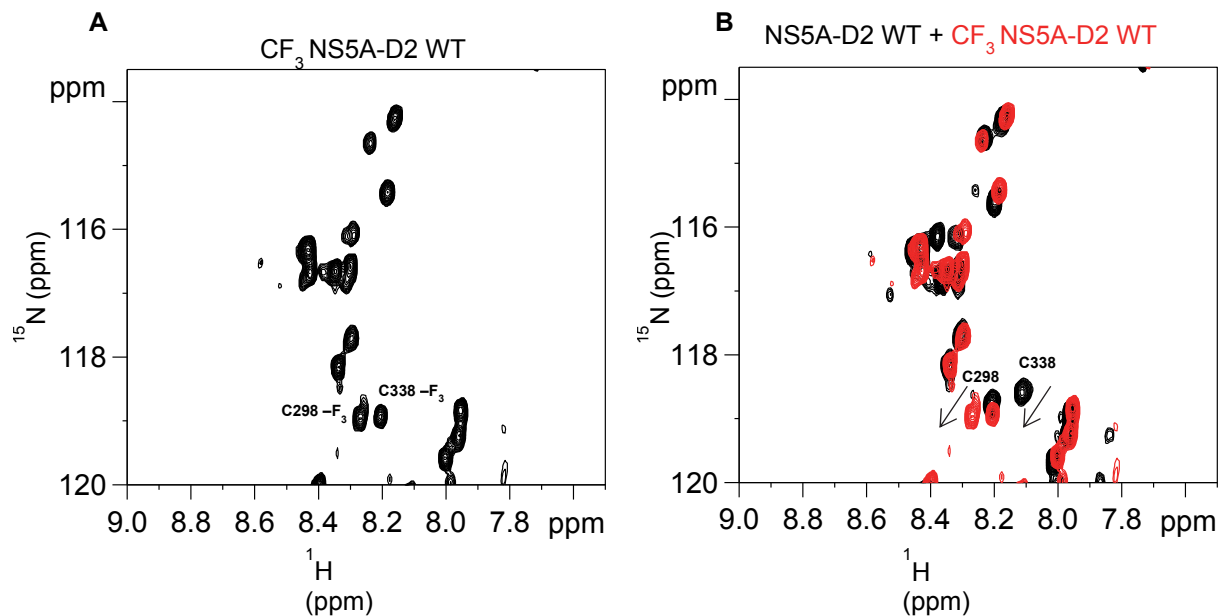


Figure S143. ^{19}F -cysteine labelling yield. A, 1H - ^{15}N HSQC spectrum of ^{19}F -cysteine labelled ^{15}N -NS5A-D2 WT. B, Superimposition of ^{15}N -NS5A-D2 WT spectrum (black) with ^{19}F -cysteine labelled ^{15}N -NS5A-D2 WT spectrum (red). ^{19}F -cysteine labelling induces a small chemical shift perturbation, we do not detect unlabelled cysteine in CF_3 - ^{15}N -NS5A-D2 WT spectrum. Yield of labelling is 100%.

A. NS5A-D2 C298S

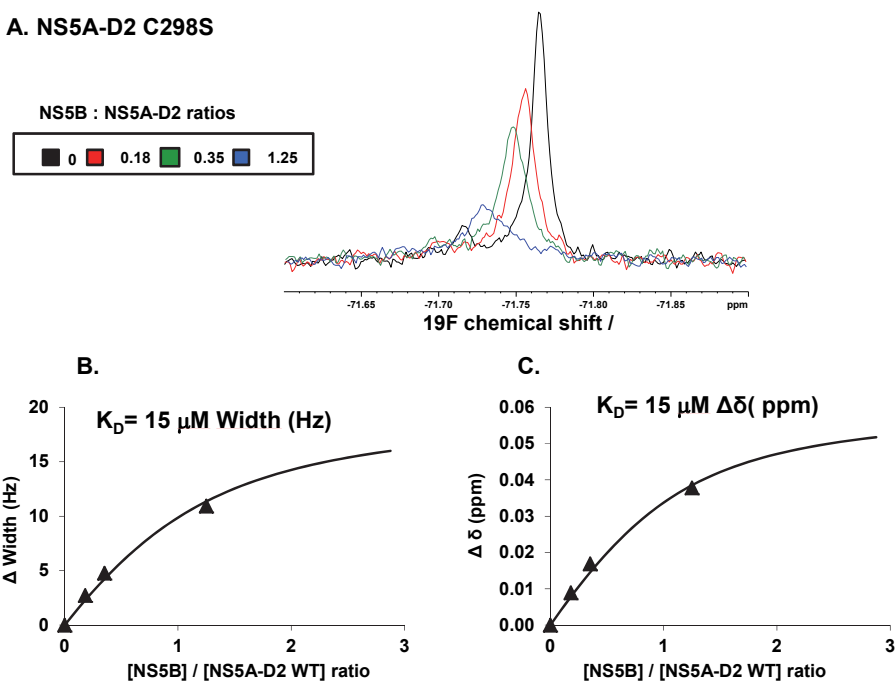


Figure S144. Titration experiment between ^{19}F labelling cysteine NS5A-D2 C298S and NS5B $_{\Delta 21}$.

A. NS5A-D2 C338S

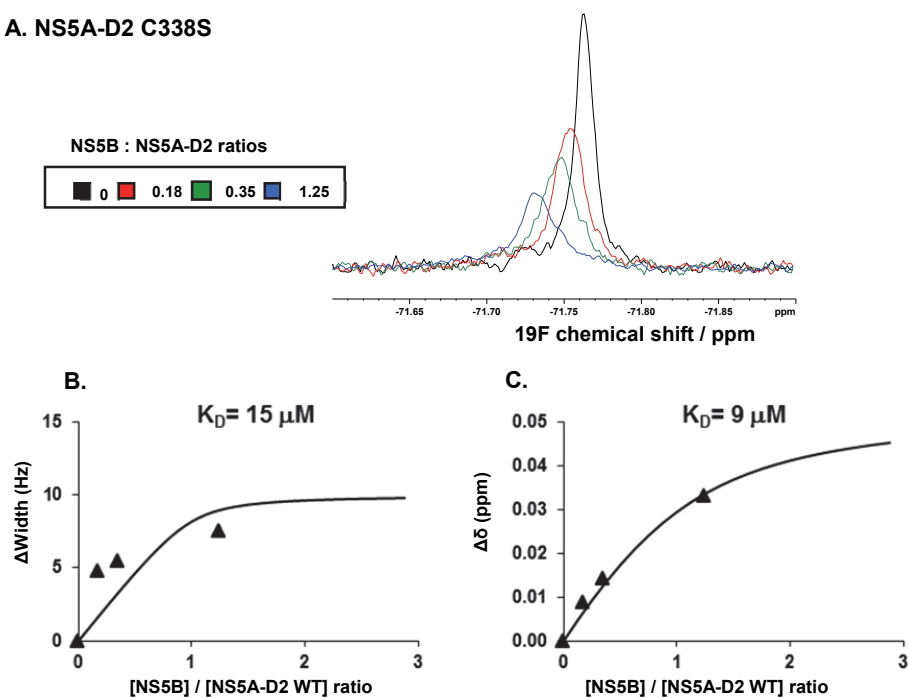


Figure S145. Titration experiment between ^{19}F labelling cysteine NS5A-D2 C338S and NS5B $_{\Delta 21}$

A. NS5A-D2 2CS M254C

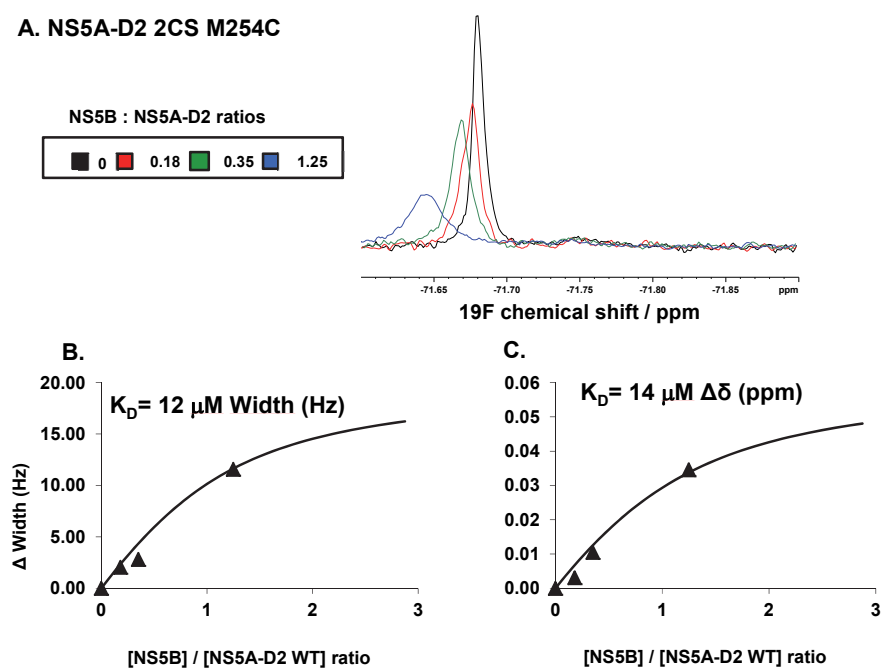


Figure S146. Titration experiment between ^{19}F labelling cysteine NS5A-D2 2CS M254C and NS5B $_{\Delta 21}$

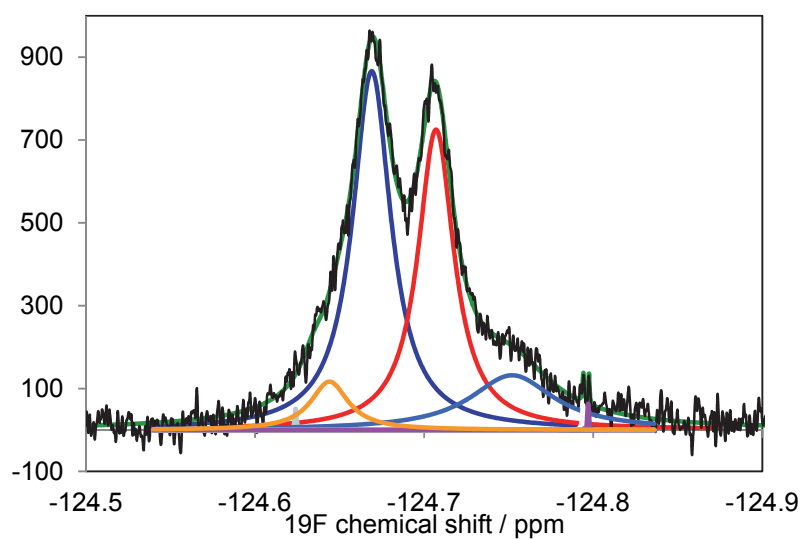


Figure S147. Deconvolution of 1D ^{19}F NMR spectrum of 5F-W NS5A-D2. The experimental spectrum (black) has been deconvoluted into seven signals with Lorentzian line shape. Peak picking was made automatically with Topspin 2.1. The thick green line represents the sum of the seven signals. The two major signals in blue and red correspond to W325 and W312 respectively. The 5 remaining signals (grey, orange, purple, beige, cyan) may correspond to minor conformations of W312 and W325 in the vicinity of prolines in the *cis* conformation.

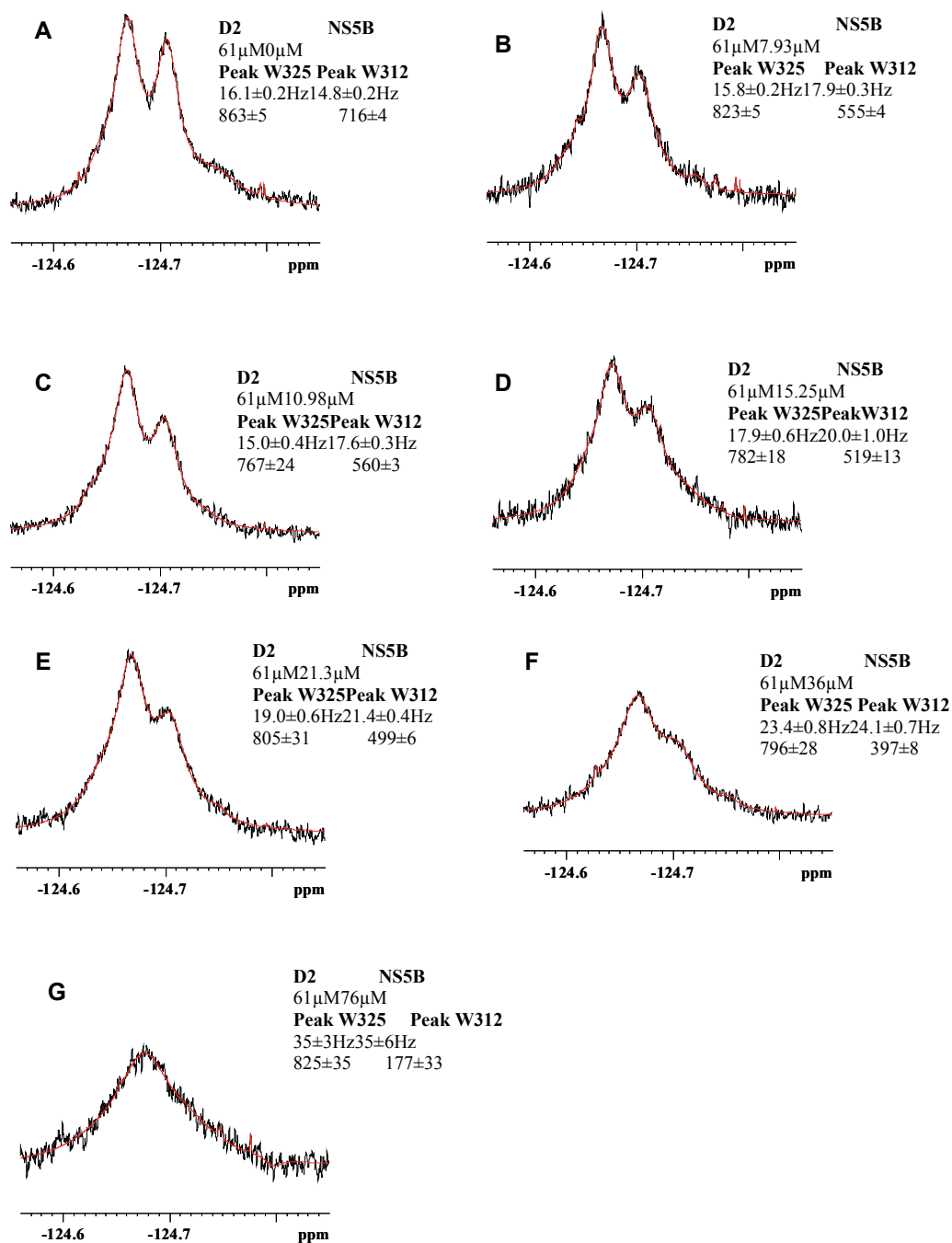


Figure S148. Each panel correspond to 1D ^{19}F NMR spectra of 61 μM 5F-W NS5A-D2 with increasing concentration of NS5B $_{\Delta 21}$: A, 0 μM ; B, 7.93 μM ; C, 7.93 μM ; D, 15.25 μM ; E, 21.3 μM ; F, 36 μM and G, 76 μM . Black lines correspond to experimental spectra and red lines correspond to deconvoluted spectra. Linewidth (Hz) and peak intensity (ppm) of W325 and W312 are indicated.

4 Etude du complexe CypA-Alisporivir par cristallographie

Afin de poursuivre la caractérisation du motif structural au sein de NS5A-D2, une étude par cristallographie aux rayons X a été initiée. L'objectif est de déterminer la conformation du motif structural en interaction avec la CypA. Nous avons réalisé des essais de co-cristallisation de la CypA avec différents peptides pepD2(Con1) : plusieurs tailles du peptide pepD2 WT ainsi que le peptide contenant la mutation de résistance D320E (Figure 149) afin de préciser exactement les changements structuraux induits par celle-ci.

PepD2-WT (Con1) (308-327)	KFPRAMPIWARPDYNPPLLE
PepD2-WT (Con1) (311-322)	RAMPIWARPDYN
PepD2-WT (Con1) (313-320)	MPIWARPD
PepD2-D320E(Con1) (308-327)	KFPRAMPIWARPEYNPPLLE

Figure 149. Peptides utilisés pour les essais de co-cristallisation avec la CypA.

En parallèle à ces essais de co-cristallisation, nous avons également réalisé des essais de cristallisation de la CypA en complexe avec l'Alisporivir.

L'Alisporivir est un analogue de la CsA qui inhibe la réplication du virus de l'hépatite C (Flisiak et al., 2008; Paeshuyse et al., 2006). C'est un peptide cyclique de 11 acides aminés, comprenant 9 acides aminés non naturels (Figure 150). Comparé à la CsA, l'Alisporivir possède un groupement méthyle supplémentaire en position 3 (une N-méthyl-D-alanine est présente à la place d'une N-méthylglycine) et un résidu de N-éthylvaline (N-EthVal) à la place d'un résidu de N-méthylleucine (N-MeLeu) en position 4 (Figure 21). Contrairement à la CsA, l'Alisporivir ne possède pas d'activité immunosuppressive (Paeshuyse et al., 2006 ; Coelmont et al., 2009; Flisiak et al., 2008; Flisiak et al., 2009). Au laboratoire, il a été montré par RMN et modélisation moléculaire que la conformation de l'Alisporivir en complexe avec la CypA est très similaire à celle de la CsA en complexe avec la CypA (Landrieu et al., 2010), ce qui souligne les propriétés anti-VHC de l'Alisporivir. En revanche, l'interaction entre la Calcineurine (CaN) et le complexe CypA-Alisporivir est entravée par des contraintes stériques entre la chaîne latérale de la N-éthylvaline en position 4 de l'Alisporivir et la Calcineurine (CaN) (Landrieu et al., 2010). Contrairement à l'Alisporivir, la chaîne latérale du résidu N-méthylleucine 4 de la CsA peut entrer dans une cavité hydrophobe à la surface de la CaN et ainsi former un complexe ternaire CypA-CsA-CaN (Huai et al., 2002).

La résolution de la structure cristallographique du complexe CypA-Alisporivir pourrait être utile dans la compréhension du caractère non immunosuppresseur de l'Alisporivir. Bien qu'un modèle structural du complexe CypA-Alisporivir a déjà été proposé à partir des données RMN, l'utilisation de la cristallographie se justifie pour confirmer ou invalider les résultats obtenus précédemment. Nous verrons que la résolution de la structure cristallographique CypA-Alisporivir apporte des résultats complémentaires à celle obtenue par RMN.

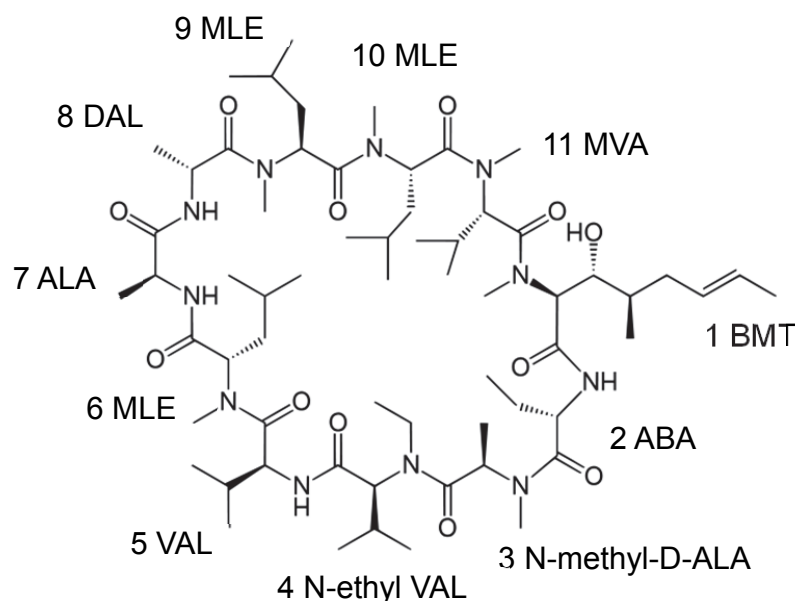


Figure 150. Composition chimique de l'Alisporivir. L'Alisporivir est un peptide cyclique de 11 acides aminés, comprenant 9 acides aminés non naturels : (1) BMT, 4-méthyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,N-méthyl-threonine ; (2) ABA, alpha-aminobutyric_acid ; (3) N-méthyl-D-ALA, N-méthyl-D-alanine ; (4) N-ethyl-VAL, N-ethylvaline ; (6) MLE, N-méthylleucine ; (8) DAL, D-alanine ; (11) MVA, N-méthylvaline.

4.1 Expression et purification de la CypA pour la cristallographie

Le protocole de production de CypA recombinante a été adapté pour une étude de la protéine par diffraction des Rayons X. La CypA recombinante possède une étiquette 6Histidines en N-terminal ainsi qu'un site de clivage à la thrombine (LVPR/GS) au niveau de la liaison étiquette – séquence protéique. Pour cette étude, il a été nécessaire de cliver cette étiquette à la thrombine en incubant 1 unité de thrombine par mg de protéine pendant 1 h à température ambiante (Figure 151). La CypA débarrassée de son étiquette 6Histidines est à nouveau purifiée par chromatographie d'exclusion stérique puis concentrée à 18 mg/ml. La CypA sans étiquette 6Histidines a été produite en quantité suffisante, à une concentration et un degré de pureté élevé nécessaire à une étude par cristallographie.

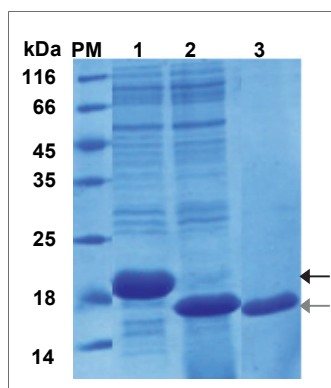


Figure 151. Purification et clivage de l'étiquette 6Histidines de la CypA pour une étude par cristallographie. Analyse par SDS-PAGE 15% de la CypA. Piste 1 : 6His-CypA obtenue après purification par chromatographie d'affinité au nickel. Piste 2 : CypA après clivage à la thrombine. Piste 3 : CypA purifié par chromatographie d'exclusion stérique (colonne Superdex 75 µg, gamme 3 000- 70 000 Da, 1 cv = 120 ml). Les flèches noir et grise indiquent respectivement 6His-CypA et CypA.

4.2 Cristallisation du complexe CypA-Alisporivir

4.2.1 Principe de la cristallisation

Un cristal est l'arrangement périodique et ordonné d'un motif composé d'un ensemble de molécules se répétant à l'identique d'une maille à l'autre. Le principe de la cristallisation est d'induire un changement d'état de la protéine de sa phase soluble à une phase solide et ordonnée. Ce phénomène de transition se divise en deux étapes : la nucléation suivie de la croissance cristalline. Pour induire la phase de nucléation, il faut amener la protéine dans un état soluble instable de sursaturation en diminuant lentement sa solubilité, ce qui revient à diminuer les interactions protéines-solvant au profit des interactions protéines-protéines. L'augmentation de la concentration en protéine, induit des interactions spécifiques entre celles-ci menant à la formation de germes cristallins. Il existe ensuite une croissance de la phase solide pouvant mener à l'obtention de cristaux où l'énergie libre du système est minimale (Figure 152). La difficulté consiste à trouver une cinétique favorable à la cristallisation. Si la zone de sursaturation est atteinte trop rapidement, cela peut mener à l'apparition d'un précipité. A l'inverse, si la cinétique est trop lente, la goutte ne se concentre pas suffisamment pour permettre l'apparition de germes cristallins.

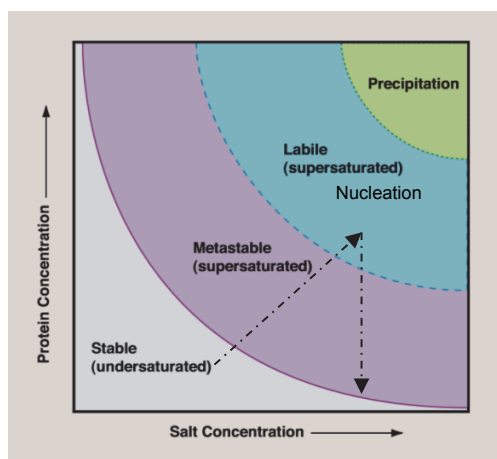


Figure 152. Diagramme de phase. Corrélation entre la concentration en protéine et la concentration en agent précipitant dans une goutte de cristallisation. L'espace est délimité par la courbe de solubilité qui délimite deux zones correspondant à un état de sous-saturation et de sursaturation de la protéine. La ligne en pointillé indique un chemin expérimental conduisant à la cristallisation de protéines. La goutte se concentre pour atteindre la zone de nucléation, les premiers germes cristallins se forment. Les germes vont alors croître et la concentration de la protéine va diminuer.

4.2.2 Cristallisation du complexe CypA-Alisporivir par la méthode en phase vapeur

La méthode de la diffusion en phase vapeur a été utilisée pour la cristallisation du complexe CypA-Alisporivir. Cette méthode est basée sur le principe que deux solutions enfermées dans un milieu clos, possédant des concentrations différentes en agents précipitants, vont tendre vers un équilibre par diffusion de vapeur de solvant. Au début de l'expérience, une goutte de protéine est diluée avec une solution contenant un agent précipitant et placée dans une enceinte hermétiquement close au-dessus d'un réservoir contenant un large volume de la solution de l'agent précipitant. Le retour à l'équilibre des concentrations est atteint lentement par diffusion de vapeur d'eau de la goutte vers le réservoir. La diminution du volume de la goutte entraîne l'augmentation des concentrations en agents précipitants et en protéines, ce qui conduit au passage progressif de la protéine d'un état soluble vers un état insoluble, permettant la formation de cristaux.

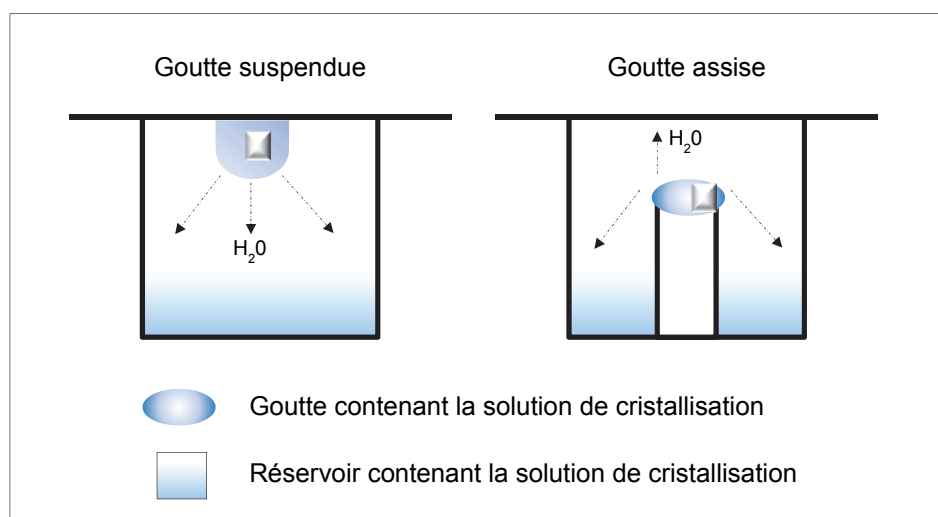


Figure 153. Techniques de la goutte suspendue et de la goutte assise par la méthode de la diffusion en phase vapeur.

4.2.3 Recherche des conditions de cristallisation

Une grande variété de conditions de cristallisation doivent être criblées afin de déterminer les paramètres (pH, tampon, agents précipitants, détergents, volumes respectifs de la goutte et du réservoir...) propices à la formation de cristaux de protéines. Les conditions optimales de cristallisation d'une protéine sont recherchées de manière empirique. Les criblages que nous avons utilisés sont basés sur des kits, contenant chacun 96 conditions, ils sont commercialisés par Hampton Research et Molecular Dimension (MD).

L'Alisporivir est très faiblement soluble en milieu aqueux (de l'ordre de quelques μM) (Landrieu et al., 2011), donc pour cristalliser la CypA en complexe avec l'Alisporivir, nous avons incubé la CypA concentrée à 18 mg/ml en présence d'Alisporivir sous forme de poudre pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, l'échantillon est filtré à 0,2 μm afin d'éliminer l'Alisporivir resté en poudre. La CypA complexée à l'Alisporivir est ensuite directement utilisée pour les essais de cristallogénèse.

Pour la cristallisation de la CypA avec les peptides deux stratégies sont envisageables :

- Soit la co-cristallisation, les peptides sont rajoutés en ratio (2 :1) à la CypA concentrée juste avant les essais de cristallogénèse.
- Soit par trempage (*soaking*) d'un cristal de CypA seule dans une solution contenant le peptide pepD2(Con1).

Dans un premier temps, nous avons réalisé des essais de co-cristallisation de la CypA avec les peptides pepD2(Con1), les peptides sont rajoutés en ratio (2 : 1) à la CypA concentrée à 18 mg/ml juste avant les essais de cristallogénèse.

Nous avons réalisé un premier criblage avec le robot Mosquito® (LabTech TTP), permettant de réaliser des nanogouttes (200 nl de solution de CypA concentré à 18 mg/ml sont mélangés à 200 nl de solution de cristallisation) de manière automatique et de tester rapidement plus de 3 000 conditions de cristallisations. La technique de la goutte assise a été employée (Figure 153). L'équilibration a été réalisée contre un réservoir de 200 µl à 20°C. Trois conditions différentes peuvent être équilibrées contre une même solution d'agent précipitant, nous avons testé six conditions de cristallisation différentes : la CypA seule, la CypA en présence des différents peptides D2 Con1 en ratio (2 :1), et la CypA en complexe avec l'Alisporivir (Figure 154).

SW1 : CypA-pepD2 308-327	SW2 : CypA-pepD2 D320E	SW1 : CypA-pepD2 311-322	SW2 : CypA-pepD2 311-320
SW3 : CypA-Alisporivir	SW4 : Réservoir agent précipitant	SW3 : CypA-seule	SW4 : Réservoir agent précipitant

Figure 154. Conditions utilisées avec le robot Mosquito® permettant de cribler la cristallisation du CypA-Alisporivir et CypA en complexe avec les peptides pepD2(Con1).

Ce criblage initial nous a permis d'obtenir plusieurs conditions favorables à la cristallisation du complexe CypA-Alisporivir. Des cristaux du complexe CypA-Alisporivir sont apparus dès le 3^{ème} jour avec la condition G9 du kit JCSG de Molecular Dimension et la condition A8 du kit 3D Structure de Molecular Dimension (Figure 155). Au bout de 6 jours, un cristal de la condition n°33 du kit Proplex de Molecular Dimension est apparu. Nous avons essayé de reproduire ces conditions à la main sans l'utilisation du robot Mosquito® afin d'avoir suffisamment de cristaux pour collecter des données de diffraction sur ces cristaux au synchrotron. Les conditions A8 du kit 3D Structure de MD et G9 du kit JCSG de MD se sont avérées peu reproductibles pour des essais de cristallisation à la main. La condition n°33 du kit Proplex de Molecular Dimension a été reproduite à la main en faisant varier la concentration en PEG 4000. Une condition reproductible a ainsi été trouvée : 0,1 M sodium cacodylate pH5,5 et 40% PEG 4000. Ces cristaux nous ont permis de collecter des jeux de données sur la ligne de lumière PROXIMA 2a

du synchrotron SOLEIL, à Gif sur Yvette, France. La qualité de diffraction des cristaux basés sur la condition : sodium cacodylate et PEG 4000 n'était pas satisfaisante. Les cristaux apparus en 3 jours avec le robot Mosquito® (conditions 1 et 2 Figure 155) ont donné des clichés de diffraction de bonne qualité. Lors de la résolution de la structure du complexe CypA-Alisporivir à partir de ces jeux de données, nous nous sommes aperçus qu'une boucle refermant de nombreux résidus de lysines et arginines (résidus 145-153 de la CypA) manquait dans la densité électronique. Il est probable que la thrombine ait clivé la CypA de manière non spécifique au niveau de ces deux acides aminés. Cependant, une analyse par spectrométrie de masse a permis de vérifier que la CypA n'était pas clivée de manière non spécifique par la thrombine dans le lot de CypA utilisé pour les essais de cristallogénèse. Il est possible que la coupure ait eu lieu au moment des essais de cristallogénèse.

Environ 1 an et demi plus tard, nous avons observé l'apparition d'un nouveau cristal CypA-Alisporivir issu du premier criblage de cristallogénèse (condition 5 Figure 155). Deux jeux de données de diffractions ont été collectés sur ce cristal à 1.5 Å, sur la ligne de lumière ID29 de l'ERSF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble, France. La boucle 145-153 était présente dans la densité électronique, ce qui confirme que la thrombine n'a pas clivée de manière non spécifique la CypA dans le lot initial utilisé pour les essais de cristallogénèse.

Concernant les essais de co-cristallisation de la CypA avec les peptides pepD2(Con1), nous n'avons pas obtenu de conditions favorables à la cristallisation. Dans le doute d'une coupure non spécifique de la CypA par la thrombine, nous avons changé de stratégie. Le gène de la CypA a été cloné dans le vecteur Lic1.10 par ligation indépendante (Luna-Vargas et al., 2011). Ceci a permis de produire la CypA avec une étiquette SUMO-His6 et celle-ci a été coupée de manière spécifique par la SENP2 protéase. Nous avons ensuite réalisé des expériences de cristallogénèse de la CypA seule issue de ce clonage, suivies d'expériences de *soaking* avec les peptides pepD2(Con1). Cependant, ces expériences ne nous ont toujours pas permis d'obtenir de co-cristaux CypA-peptide. Tous ces essais de cristallisation de la CypA n'ont pas aboutis, malgré nos efforts pour reproduire les conditions de co-cristallisation de la CypA avec de petits peptides, publiées précédemment (Ke et al., 1993 ; Vajdos et al., 2008). Il est possible que l'affinité entre les peptides pepD2(Con1) et la CypA soit trop faible pour obtenir des co-cristaux de ce complexe.


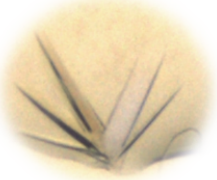

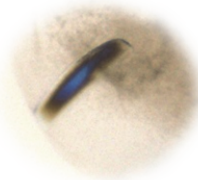
Solution de cristallisation	Cristaux	Temps d'apparition des cristaux
<p>Condition 1</p> <p>Condition G9 du kit JCSG de Molecular Dimension (MD)</p> <p>0,1 M potassium thiocyanate 30% PEG 2000 MME</p> <p>Goutte faite avec le robot Mosquito</p>	 <p>— 10 μM</p>	3 jours
<p>Condition 2</p> <p>Condition A8 du kit 3D structure de MD</p> <p>0,2 M ammonium acétate 0,1 M sodium acétate 30% PEG 4 000</p> <p>Goutte faite avec le robot Mosquito</p>	 <p>— 10 μM</p>	3 jours
<p>Condition 3</p> <p>Condition n°33 du kit Proplex de MD</p> <p>0,1 M sodium cacodylate pH 5.5 25% PEG 4000</p> <p>Goutte faite avec le robot Mosquito</p>	 <p>— 10 μM</p>	6 jours
<p>Condition 4</p> <p>0,1 M sodium cacodylate pH 5.5 40% PEG 4000</p> <p>Goutte faite à la main</p>	 <p>— 100 μM</p>	10 jours
<p>Condition 5</p> <p>Condition D6 du Kit JCSG de kit MD</p> <p>0.1 M tris pH 8.5 0.2 M MgCl2 20% PEG 8000</p> <p>Goutte faite avec le robot Mosquito</p>	 <p>— 10 μM</p>	1 an et demi

Figure 155. Conditions de cristallisation du complexe CypA-Alisporivir.

4.3 Résolution de la structure cristallographique du complexe CypA-Alisporivir

4.3.1 Résolution d'une structure tridimensionnelle par la méthode de remplacement moléculaire

Les différentes étapes de la résolution d'une structure tridimensionnelle par cristallographie aux rayons X sont indiquées dans la Figure 156. Les rayons X ont une longueur d'onde de l'ordre de l'angström, identique aux distances interatomiques. Il est possible de détecter les rayons diffractés des molécules soumises aux rayons X. Ces rayons diffractés sont mesurés à l'aide d'un détecteur. On obtient alors des images, clichés de diffraction, où chaque réflexion est caractérisée par des coordonnées h, k, l , et par une intensité (I). Plusieurs images sont enregistrées en faisant tourner le cristal sur lui-même (0,1 à 1 degrés de rotation par cliché de diffraction). Les clichés de diffraction permettent de calculer la carte de densité électronique. L'onde diffractée est caractérisée par un facteur de structure (F_{hkl}) qui résulte de l'addition des ondes diffractées par chaque atome. La carte de densité électronique est obtenue à partir de la transformée de fourrier inverse des facteurs de structure atomique, ce qui nécessite de connaître l'amplitude et la phase de chaque facteur de structure. L'amplitude est proportionnelle au carré des facteurs de structure. Par contre la phase des facteurs de structure doit être mesurée de manière indirecte, grâce à différentes méthode de phasage. Afin de résoudre la structure du complexe CypA-Alisporivir, le problème des phases a été résolu par la méthode de remplacement moléculaire (RM). Pour cela il faut disposer de la structure d'un analogue de la protéine à étudier. Le logiciel Phaser de la suite CCP4 version 6.5 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) permet de positionner correctement le modèle de structure tridimensionnelle connu dans la maille à étudier par des opérations de rotation et de translation. On obtient alors une carte de densité électronique initiale. Il faut ensuite reconstruire notre propre modèle moléculaire dans la carte de densité électronique et réaliser des étapes d'affinements. Le processus d'affinement est contrôlé par différents paramètres tels que l'évolution des valeurs R_{work} et R_{free} . Ces valeurs permettent de mesurer la déviation entre les facteurs de structures calculés et observés. La valeur du R_{free} est calculée à partir d'un faible pourcentage de facteurs de structures choisis de manière aléatoire et qui ne sont pas utilisés dans le processus d'affinement. Ce paramètre permet de vérifier que le processus d'affinement a bien fonctionné et que le R_{work} n'est pas réduit de manière artificielle. Dans notre cas, 5% des réflexions ont été utilisées pour le calcul du R_{free} . Après chaque cycle d'affinement, le R_{free} et le R_{work} sont calculés et doivent diminuer conjointement. A la fin de la procédure

d'affinement la qualité stéréochimique du modèle peut-être évaluée avec le logiciel MolProbity (Chen et al., 2010).

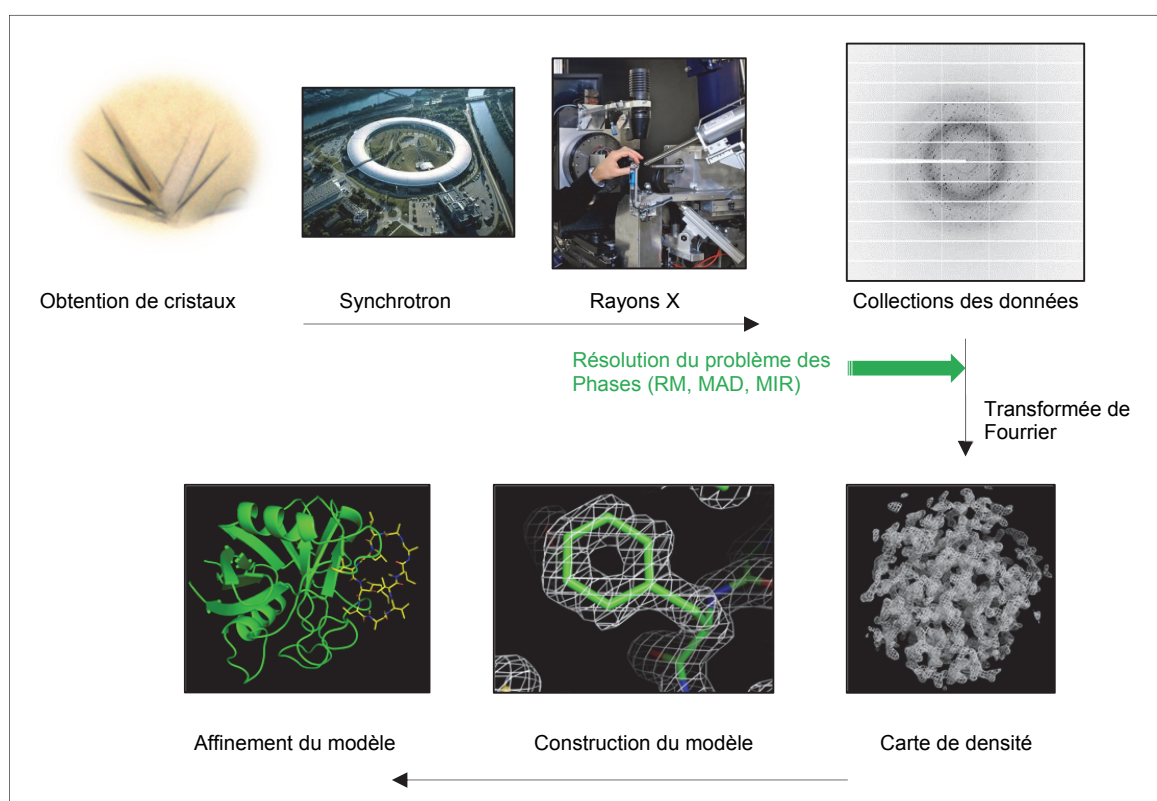


Figure 156. Différentes étapes de la résolution d'une structure cristallographique par cristallographie aux RX.

4.3.2 Collection des données de diffraction

Le cristal CypA-Alisporivir issu de la condition 5 a été utilisé pour collecter deux jeux de données sur la ligne de lumière ID29 de l'ERSF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble, France. Les données ont été collectées avec un détecteur PIXEL (pilatus_6M_F). 3600 clichés de diffractions ont été enregistrés avec un angle d'oscillation de $0,1^\circ$. Dans le but d'obtenir une résolution plus élevée, un deuxième jeu de données a été enregistré en inclinant le cristal d'un angle kappa de 50° . Nous avons alors obtenu une résolution maximale de $1,5 \text{ \AA}$.

Les réflexions des 2 jeux de données de diffraction des rayons X ont été indexées et intégrées à l'aide de la suite de programme du pack XDS (Kabsch, 1993). La mise à l'échelle et la fusion des deux jeux de données ont été réalisées avec le programme Aimless de la suite CCP4 version 6.5 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Le cristal appartient au groupe d'espace triclinique P1. Le coefficient de Matthews (V_m) le plus probable est de $2,9 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, correspondant à la présence de 4 molécules de CypA-Alisporivir par unité asymétrique (u.a.),

avec un contenu en solvant de 44 %. Les statistiques de diffraction après fusion des deux jeux de données sont résumées dans la Figure 157.

Groupe d'espace	P1
Paramètres de maille (Å, °)	a = 37,92 b = 68,54 c = 71,99 α = 115,08 β = 103,12 γ = 94,13
Ligne de lumière	ID29
Longueur d'onde (Å)	1,0332
Energie (keV)	12
Détecteur	PILATUS 6M F
Degré de rotation par image (°)	0,1
Temps d'exposition par image (s)	0,037
No de réflexions observées	673 826 (31621)
No de réflexions uniques	98 533 (4810)
Mosaïcité du cristal	0,18
Résolution (Å)	1,50 (1,53)
Complétude (%)	98,2 (96,3)
R _{pim}	0,051 (1,637)
I/σI moyen	12,3 (1,7)

Figure 157. Données de diffraction collectées au synchrotron (EFRF, Grenoble). Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution (1,53-1,50 Å).

La structure du complexe CypA-Alisporivir a été déterminée à 1,5 Å de résolution. Le problème de phase a été résolu par la méthode de remplacement moléculaire en utilisant pour modèle la structure tridimensionnelle du complexe CypA-CsA (code PDB : 1CWA), en enlevant les chaînes correspondant à la CsA et aux molécules d'eau. Le remplacement moléculaire a été réalisé à l'aide du programme Phaser de la suite CCP4 version 6.5 (McCoy et al., 2007). L'affinement a été réalisé avec le logiciel REFMAC5 (Murshudov et al., 2011). Certaines corrections manuelles, tels que l'orientation de chaînes latérales de certains acides aminés de la CypA, le placement correct de certains acides aminés dans la densité électronique, ou encore l'ajout d'ions chlorures issus de la condition de cristallisation, ont été réalisées manuellement avec le logiciel COOT (Emsley et al., 2010). L'Alisporivir a été ajouté au modèle CypA une fois que les statistiques issues de la procédure d'affinement étaient optimales. Ce ligand a été

reconstruit manuellement dans la densité électronique avec le logiciel COOT. Certains acides aminés non naturels tels que la N-méthyl-D-alanine (résidu n°3 de l'Alisporivir) et la N-ethylvaline (résidu n°4 de l'Alisporivir) ne sont pas définis dans la librairie de CCP4 v 6.5. Nous avons donc créé un fichier de contraintes de l'Alisporivir avec le logiciel Jligand de la suite CCP4 (Lebedev et al., 2012). Suite à cette étape de reconstruction du ligand dans la densité électronique, une dernière étape d'affinement du modèle est réalisée. Les paramètres de l'affinement ont été optimisés à l'aide au serveur PDB REDO (http://www.cmbi.ru.nl/pdb_redo) (Joosten et al., 2014). Les statistiques à l'issue de la procédure d'affinement sont résumées Figure 158.

Le modèle final comprend les 4 molécules de CypA en complexe avec l'Alisporivir par unité asymétrique, l'unité de répétition du cristal. La qualité stéréochimique de celui-ci a été évaluée avec le programme MolProbity (Chen et al., 2010). L'Alisporivir, peptide cyclique de 11 acides aminés, possède des contraintes qui ne sont pas observées dans une chaîne polypeptidique de protéines. La qualité stéréochimique du modèle final a donc été évaluée uniquement pour les 4 molécules de CypA (Figure 159).

Limite de résolution (Å)	1,5
Nombre de molécules dans l'u .a.	4
R _{work} (%)	16,60
R _{free} (%)	18,98
B-facteur moyen	29,69
R.m.s.d	
Longueur des liaisons (Å)	0,019
Angles de liaisons (°)	1,844
No d'atomes non-H	5814

Figure 158. Statistiques à l'issue de la procédure d'affinement du modèle moléculaire CypA-Alisporivir.

CypA			
Clashscore, all atoms	1	99 th percentile *	
Poor rotamers	9	1.69%	Goal : < 1%
Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal : < 0.05%
Ramachandran favored	634	97.24%	Goal : > 98%
Molprobrity score [^]	1,11		
C β déviation > 0.25 Å	2	0,35%	Goal : 0
Bad backbone bonds	3/5176	0.06%	Goal : 0%
Bad backbone angles	4/6952	0.06%	Goal : <0.1%

In the two column results, the left column gives the raw count, right gives the percentage.
*100th percentile is the best among structure of comparable resolution; 0th percentile is the worst.
[^]MolProbrity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution.

Figure 159. Validation de la qualité stéréochimique du complexe CypA-Alisporivir à l'aide du programme MolProbity. La validation est réalisée pour les 4 molécules de CypA.

4.4 Analyse de la structure du complexe CypA-Alisporivir et discussion

4.4.1 Analyse des quatre complexes CypA-Alisporivir au sein de l'unité asymétrique

Quatre complexes CypA-Alisporivir sont présents par unité asymétrique dans le cristal que nous avons utilisé lors des expériences de diffractions des rayons X (Figure 161 A). Les structures des quatre complexes sont identiques et se superposent avec un RMSD de 0,24 Å (Figure 161B). Les quatre complexes CypA-Alisporivir ont été nommés chaînes A, B, C et D. Les chaînes A et B sont strictement identiques 2 à 2 avec un RMSD de 0,8 Å, ainsi que les chaînes C et D avec un RMSD de 0,9 Å. Alors que le RMSD entre les chaînes A et C est de 0,32 Å et entre les chaînes B et D il est de 0,31 Å. La principale différence entre les chaînes A, B et C, D se situe au niveau de l'extrémité N-terminal et au niveau de la boucle composée des résidus 78-81. De même, les quatre molécules d'Alisporivir des chaînes A, B, C, et D se superposent avec un RMSD de 0,11 Å sur les atomes N, CA, CO. La conformation ainsi que l'orientation des chaînes latérales de l'Alisporivir sont identiques dans les quatre chaînes.

La totalité du modèle structural des 4 complexes CypA-Alisporivir est bien définie dans la densité électronique, aussi bien pour la CypA que pour l'Alisporivir, comme en atteste la Figure 161.

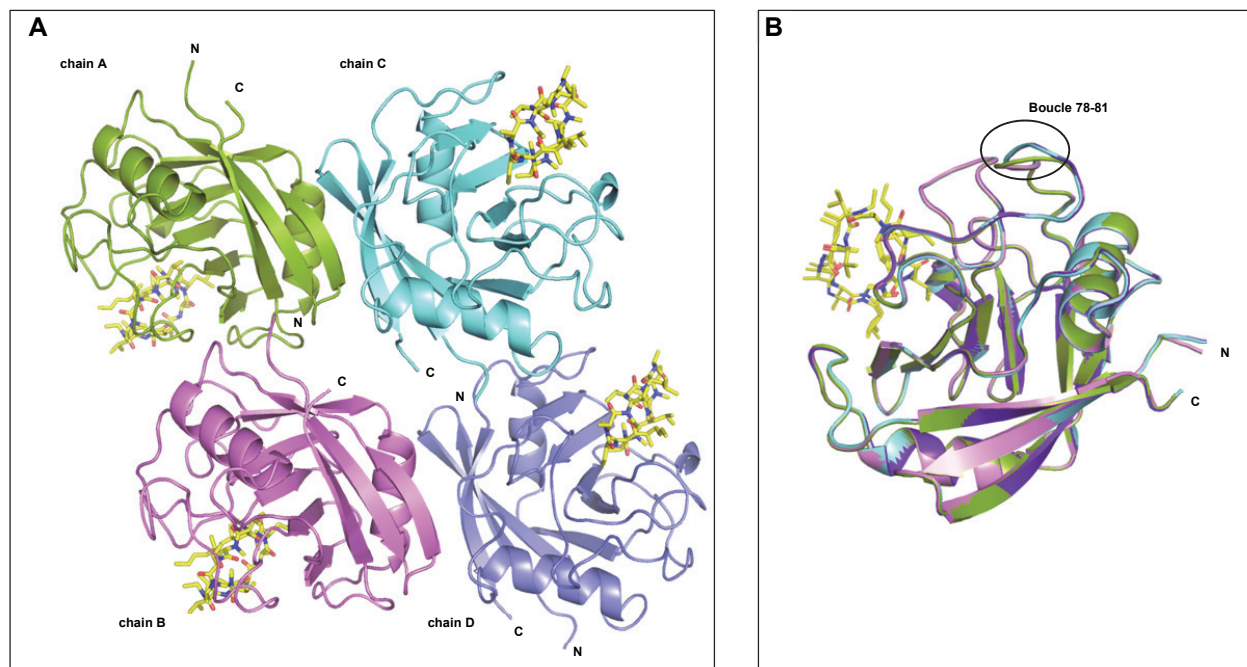


Figure 160. Les quatre complexes CypA-Alisporivir au sein de l'unité asymétrique du cristal. A, La CypA de la chaîne A est en vert, la CypA de la chaîne B est en violet, la CypA de la chaîne C est en cyan, et la CypA de la chaîne D est en bleu (représentation *cartoon*). Les quatre molécules d'Alisporivir sont en jaune (représentation *stick*). B, Superposition sur les atomes N, CA, CO des quatre chaînes A, B, C, et D. Le RMSD entre les quatre structures sur les atomes N, CA, CO, est de 0,24 Å.

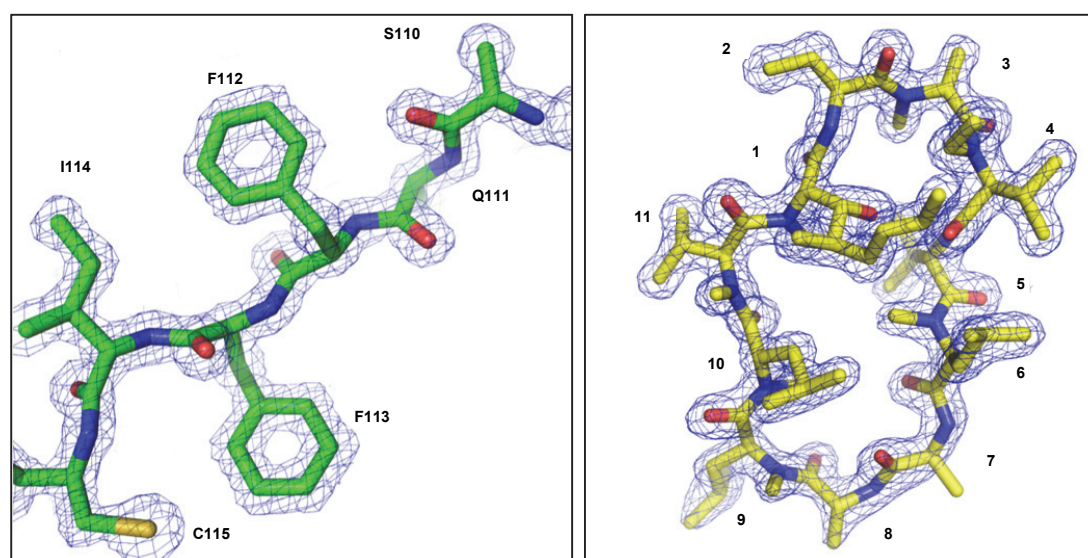


Figure 161. Modèle moléculaire du complexe CypA-Alisporivir placé dans une carte de densité électronique 2Fo-Fc. A gauche, résidus 110-115 de la CypA. A droite, Alisporivir. Ceci est représentatif de la qualité de la densité électronique pour tous les résidus de la CypA et de l'Alisporivir des quatre chaînes de l'unité asymétrique.

4.4.2 Conformation de la CypA en complexe avec l'Alisporivir

La conformation de la CypA en complexe avec l'Alisporivir est très similaire à celle de la CypA en complexe avec la CsA. Le RMSD entre ces deux structures sur les atomes N, CA, CO est de 0,3 Å.



Figure 162. Superposition de la CypA du complexe CypA-Alisporivir, chaîne A, (en vert) avec la CypA du complexe CypA-CsA (en violet) (code PDB : 1CWA).

4.4.3 Conformation de l'Alisporivir en complexe avec la CypA

4.4.3.1 Comparaison avec la CsA en complexe avec la CypA

L'Alisporivir diffère de la CsA par la présence d'un groupement méthyle supplémentaire en position 3 et par la présence d'une N-ethylvaline à la place d'une N-methylleucine en position 4. La conformation de l'Alisporivir en complexe avec la CypA est très similaire à celle de la CsA en complexe avec la CypA, comme l'atteste la Figure 163A. Le RMSD sur les atomes N, CA, CO entre ces deux molécules est de 0,13 Å. Ces deux molécules ont le même mode de liaison, au niveau du site actif PPIase de la CypA, ce qui souligne les propriétés anti-VHC de l'Alisporivir.

4.4.3.2 Comparaison avec la structure du complexe CypA-Alisporivir obtenue par RMN

La conformation de l'Alisporivir en complexe avec la CypA obtenu par cristallisation des rayons X est très similaire à celle obtenue par RMN (Landrieu et al., 2010) (Figure 163B). Le RMSD sur les atomes N, CA, CO entre ces deux molécules est de 0,26 Å. Toutefois, la chaîne latérale ainsi que le groupement N-ethyl du résidu n° 4 N-ethylvaline, résidu modifié par rapport à la CsA, n'a pas la même orientation dans ces deux structures. Sur la base des données obtenues par Landrieu

et al., le résidu n°4 de l'Alisporivir possède 9 rotamères possibles. La conformation de ce résidu a été déterminée par RMN sur la base de modélisation moléculaire ainsi que sur la base de contraintes de distances expérimentales. Des pics de corrélations NOE ont été identifiés entre le proton HN_{CH_2} de la N-ethylvaline et son H_β et entre le proton HN_{CH_2} de la N-ethylvaline et des protons de l'extrémité de la chaîne latérale du résidu BMT (résidu n°1). Ces observations corrélées à de la modélisation moléculaire ont permis d'identifier pour le résidu n°4, la conformation observée sur la Figure 163B. La conformation du résidu n°4 identifiée par cristallographie n'est pas ambiguë puisque la densité électronique autour de cette chaîne latérale est bien définie (Figure 161). De plus, lors de la résolution des structures sur les données que nous avons obtenues avec les conditions de cristallogénèse 1 et 2 (Figure 155), le résidu n°4 de l'Alisporivir avait à chaque fois la même conformation.

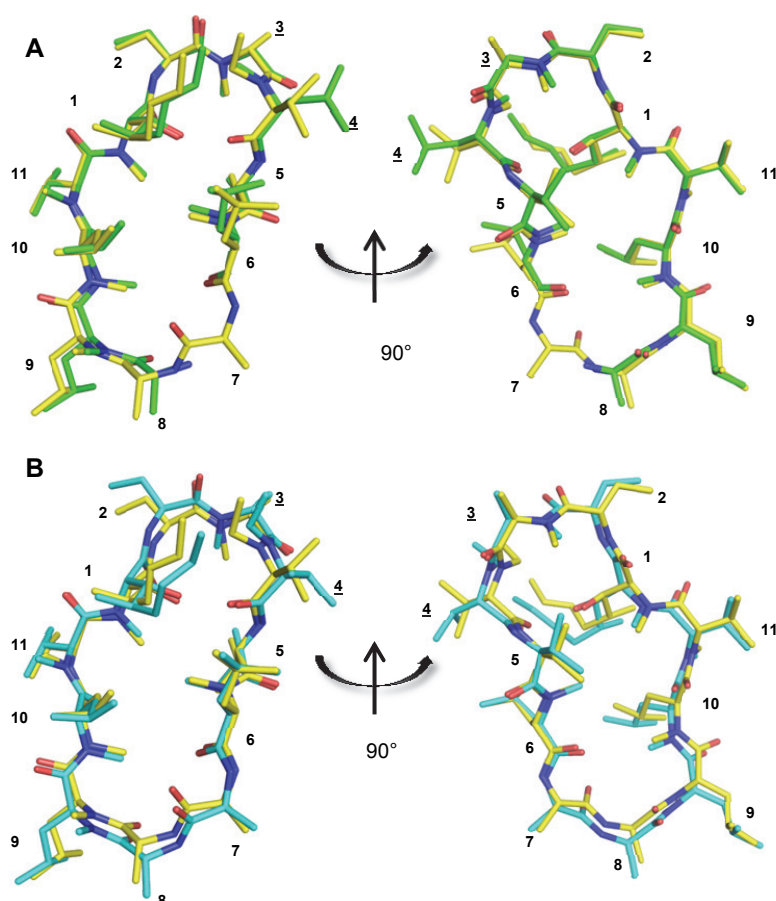


Figure 163. Comparaison de la conformation de l'Alisporivir en complexe avec la CypA avec (A), la CsA issu de la structure cristallographique CypA-CsA (code PDB : 1CWA), et avec (B) l'Alisporivir issu de la structure RMN CypA-Alisporivir (Landrieu et al., 2010). L'Alisporivir du complexe CypA-Alisporivir obtenue par cristallographie est en jaune, La CsA du complexe CypA-CsA est en vert et l'Alisporivir du complexe CypA-Alisporivir obtenu par RMN est en cyan.

4.4.4 Analyse du complexe CypA-Alisporivir-Calcineurine

Afin d'apporter une explication rationnelle au caractère non-immunosuppresseur de l'Alisporivir, nous avons construit le modèle du complexe CypA-Alisporivir-Calcineurine en remplaçant le complexe CypA-CsA au sein de la structure 3D du complexe ternaire CypA-CsA-CaN (code PDB 1M63 ; Huai et al., 2002) avec la structure du complexe CypA-Alisporivir que nous avons obtenue par cristallographie (Figure 164 A). Si on observe l'interface entre l'Alisporivir et la CaN, on remarque aisément à partir de notre modèle CypA-Alisporivir que la chaîne latérale de la N-EthVal4 de l'Alisporivir ne peut entrer dans la cavité hydrophobe de la CaN, contrairement à la chaîne latérale de la N-MeLeu4 de la CsA dans le complexe CypA-CsA-CaN (Figure 164A). La distance entre le carbone C δ 1 de la chaîne latérale du résidu N-EthVal4 de l'Alisporivir et l'azote NE1 du cycle aromatique du W352 de la CaN est de 2,02 Å. Tandis que la distance entre le C δ 1 de la chaîne latérale du résidu MLE4 de la CsA et l'azote NE1 du cycle aromatique du W352 de la CaN est de 4,07 Å (Figure 164). On peut donc observer un clash stérique entre un groupement méthyle de la chaîne latérale du résidu N-EthVal4 de l'Alisporivir et le noyau aromatique du W352 faisant partie de la cavité hydrophobe de la CaN. Le modèle du complexe CypA-Alisporivir-CaN a également été reconstruit avec la structure CypA-Alisporivir obtenue par RMN (Figure 164 B). Même si la conformation du résidu n°4 de l'Alisporivir est différente dans la structure RMN et dans la structure cristallographique, on observe dans les deux structures un clash stérique entre la chaîne latérale du résidu N-EthVal4 et le noyau aromatique du W325. Les résultats obtenus par cristallographie ainsi que ceux obtenus par RMN précédemment par Landrieu et al., (2010) permettent d'expliquer l'absence de complexe ternaire CypA-Alisporivir-CaN. Le groupement méthyle supplémentaire en position 3 de l'Alisporivir est également orienté vers l'interface avec la CaN (dans les structures obtenues par RMN et par cristallographie) mais n'interfère pas directement avec cette interaction. En effet, la distance entre le carbone C β 1 du groupement méthyle du résidu 3 DAL de l'Alisporivir et le carbone C δ 1 de la Phe356 de la CaN est de 2,6 Å (Figure 164).

On peut remarquer que la chaîne latérale du résidu n°4 de la CsA (N-méthyl-Leucine) n'a pas la même orientation au sein du complexe ternaire CypA-CsA-CaN (code PDB : 1M63) (Figure 164A) et au sein du complexe CypA-CsA (code PDB : 1CWA) (Figure 163A), indiquant un certain degré de flexibilité. La comparaison des structures cristallographiques des 11 dérivés de la CsA en complexe avec la CypA a également montré que les principales différences concernent les conformations des résidus N-méthyl-leucine n°4 et valine n°5 (Kallen et al., 1998). Cette flexibilité semble absente au sein de l'Alisporivir. En effet, pour les 4 chaînes de l'unité

asymétrique ainsi que pour les autres structures cristallographiques que nous avons obtenues, l'orientation de la chaîne latérale du résidu n°4 est identique.

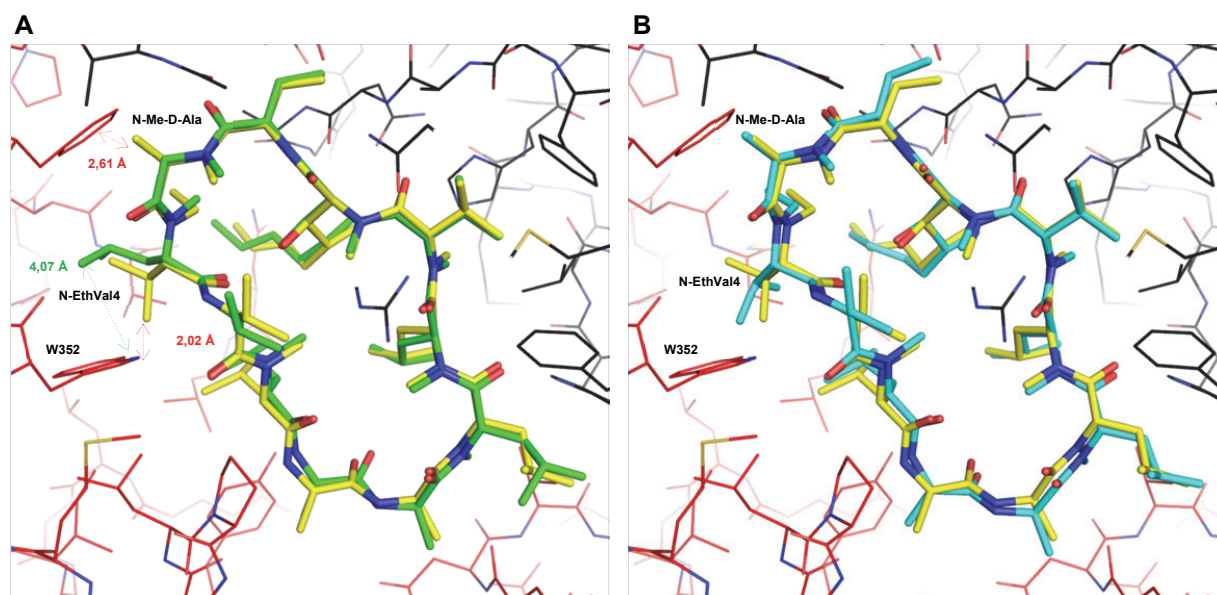


Figure 164. Modèle du complexe ternaire CypA-Alisporivir-CaN. A, Les ligands CsA (vert) et Alisporivir obtenu par cristallographie (jaune) sont superposés dans le site de liaison de la CypA (noir). La CaN est en rouge. Le contact entre la chaîne latérale de la N-EthVal4 de l'Alisporivir et la chaîne latérale du W352 de la CaN est visible. B, Les ligands Alisporivir obtenu par RMN (Cyan) et Alisporivir obtenu par cristallographie (jaune) sont superposés dans le site de liaison de la CypA (noir). La CaN est en rouge. Le résidu n°4 n'a pas la même orientation dans ces deux structures, mais dans les deux cas cette orientation provoque un clash stérique avec la chaîne latérale W352 de la CaN.

4.5 Conclusion

Nous avons montré que la conformation de l'Alisporivir en complexe avec la CypA obtenue par cristallographie aux rayons X est très similaire à celle de la CsA en complexe avec la CypA, ce qui souligne les propriétés anti-VHC de l'Alisporivir. Le modèle CypA-Alisporivir, obtenu à partir de la structure cristallographique, en complexe avec la CaN, CypA-CsA-CaN, indique que l'orientation de la chaîne latérale du résidu 4 empêche la formation d'un complexe ternaire CypA-Alisporivir-CaN. Ceci permet donc d'expliquer le caractère non immunosuppresseur de cette molécule. Bien que l'orientation de la chaîne latérale du résidu N-EthVal4 soit différente dans la structure RMN et la structure cristallographique, dans les deux cas l'orientation de cette chaîne latérale provoque un clash stérique avec le W352 de la cavité hydrophobe de la CaN, permettant d'apporter une explication rationnelle au caractère non immunosuppresseur de cette molécule.

5 Régulation de l'hexokinase 2 humaine par la protéine NS5A du VHC

L'infection par le virus de l'hépatite C induit des perturbations du métabolisme de la cellule hôte qui permettent au virus de se répliquer et de s'assembler (Ye, 2007). Cependant les mécanismes moléculaires de celles-ci ne sont pas encore bien connus. Le VHC modifierait notamment la glycolyse et l'assimilation du glucose permettant ainsi d'augmenter la synthèse des acides gras nécessaires à la répllication et l'assemblage du virus (Diamond et al., 2010). Récemment l'équipe du Pr. Patrice André et du Dr. Olivier Diaz (centre international de recherche en infectiologie, Université de Lyon), avec qui nous avons commencé à collaborer, a étudié la modulation de la glycolyse par le VHC. Ils ont pu montrer une augmentation de la consommation de glucose et de la sécrétion de lactate dans les cellules infectées par le VHC, indiquant une augmentation de la glycolyse par la voie aérobie (Ramière et al., 2014). Ils ont alors étudié les interactions entre les protéines virales et les enzymes de la glycolyse, et ont pu mettre en évidence une interaction entre NS5A et l'hexokinase 2 humaine (HK2) par des expériences de *protein complementation assay* (PCA) et de co-immunoprécipitations. L'hexokinase 2 intervient lors de la première étape limitante de la glycolyse, elle catalyse la phosphorylation du D-glucose (Glc) en D-glucose-6-phosphate (Glc-6-P) (Figure 165).

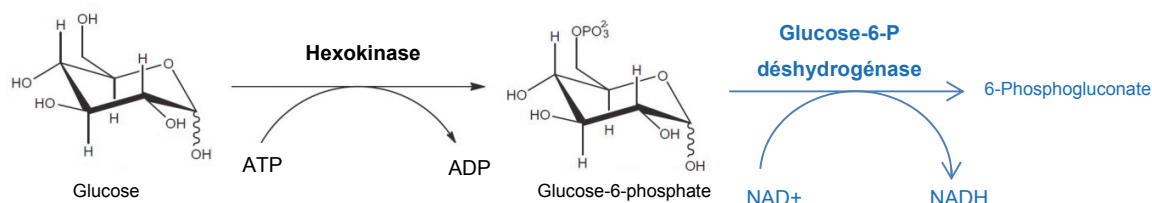


Figure 165. Réaction enzymatique catalysée par HK2 suivie de la réaction de la glucose-6-phosphate déshydrogénase permettant la détection de NADH par spectrophotométrie UV.

Afin d'expliquer comment l'interaction NS5A-HK2 active la glycolyse, Ramière et al., ont mesuré la production de Glc-6-P dans un homogénat cellulaire Huh7.5 en présence ou en absence de NS5A. Le Glc-6-P est quantifié avec un test enzymatique *in vitro* : le Glc-6-P produit par HK2, à partir du Glc, est à son tour transformé en 6-phosphogluconate par la Glucose-6-P déshydrogénase, avec la réduction concomitante du NAD⁺ en NADH, ce dernier peut-être mesuré par spectrophotométrie UV (Figure 165). Ils ont ainsi pu montrer que NS5A augmente l'activité de HK2 dans des fractions cellulaires Huh7.5. Les domaines purifiés D2 et D3 de NS5A ont les mêmes effets, alors que le domaine 1 de NS5A n'active pas HK2. Ils ont également pu montrer que NS5A entière modifie les paramètres cinétiques de l'enzyme (augmentation du

Vmax et diminution du K_M de HK2) dans un test d'activité acellulaire réalisé avec l'enzyme HK2 produite de manière recombinante chez *E. Coli* par Sigma-Aldrich (Figure 166).

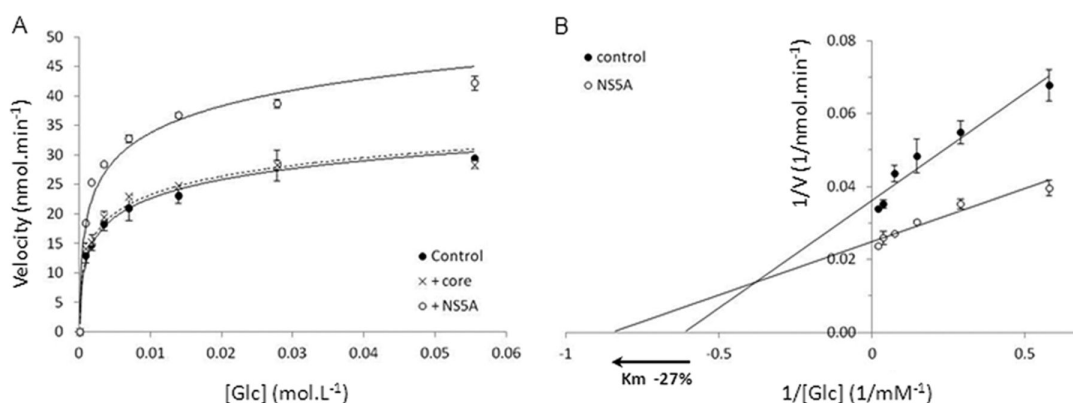


Figure 166. NS5A modifie les paramètres cinétiques de HK2, figure extraite de Ramière et al., (2014). A, Vitesses initiales de l'activité de HK2 mesurées in vitro à différentes concentrations en substrat (glucose), en présence (+ NS5A) ou en absence (contrôle) de NS5A. La même expérience est réalisée avec la protéine core (témoin). B, Représentation en double inverse du graphique présenté en A (représentation de Lineweaver-Burk) permettant de visualiser la diminution du K_M et l'augmentation du V_{max} de l'enzyme en présence de NS5A.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Patrice André et le Dr. Olivier Diaz, nous étudions par RMN le mécanisme d'activation de HK2 par la protéine NS5A. La RMN nous permet d'étudier les interactions de HK2 avec soit NS5A-D2, soit NS5A-D3. Ceci permet d'identifier les sites d'interaction de HK2 sur ces domaines. La RMN nous a également permis de réaliser un test de l'activité de l'enzyme qui permet d'étudier la régulation de l'enzyme avec différents partenaires, dont NS5A-D2 ou les peptides de NS5A-D2.

5.1 Clonage, expression et purification de l'hexokinase 2

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons produit HK2 de manière recombinante en quantité suffisante pour une étude par RMN. HK2 (103 kDa) est une enzyme allostérique à deux substrats : le glucose et l'ATP et qui a pour cofacteur Mg^{2+} . Elle est inhibée par ses produits de réaction, le Glc-6-phosphate et l'ADP, ce qui permet de réguler l'activité de l'enzyme. HK2 est composée de deux domaines de 50 kDa. Chaque domaine est constitué de deux sous-domaines et peut exister en conformation ouverte ou fermée (Figure 167). Le mécanisme d'action de l'enzyme commence par la fixation des deux substrats au niveau du site actif, les domaines se referment autour des substrats par un mouvement relatif des sous-domaines, ce qui permet ensuite la phosphorylation du glucose. Les deux domaines de l'hexokinase 2 possèdent une activité catalytique (Tsai and Wilson, 1996).

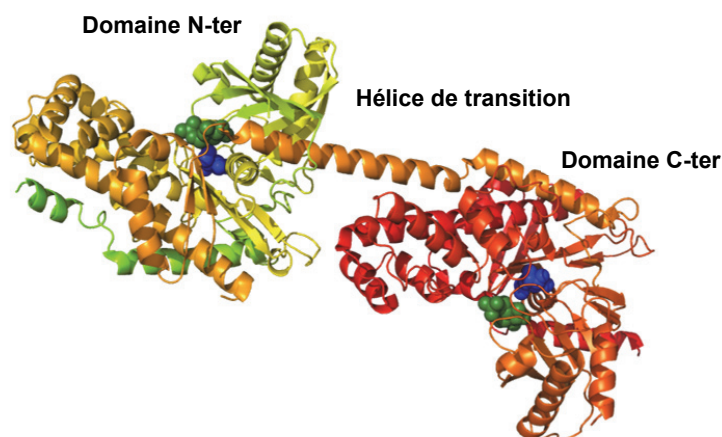


Figure 167. Structure de la HK2 humaine en complexe avec le Glc (en bleu) et le Glc-6-P (en vert). (code PDB : 2NZZ). Les domaines N-terminaux et C-terminaux sont connectés par une hélice de transition. Les deux domaines sont en conformations fermée.

5.1.1 Clonage de la séquence codant pour HK2 dans un vecteur de la série pETNKI-LIC

La séquence codant pour l'HK2 humaine a été clonée par la méthode de ligation indépendante (Luna-Vargas et al., 2011) dans le vecteur pETNKI-His-3C-LIC-kan (Figure 168), permettant l'expression de HK2 en fusion avec une étiquette polyhistidine en N-terminal. Ce vecteur présente un site de coupure protéase 3C permettant d'éliminer le tag hexa-histidine. Nous n'avons pas éliminé ce tag pour cette étude.



Figure 168. Représentation du vecteur pETNKI-His-3C-LIC-kan utilisé pour cloner le gène le gène HK2. Les caractéristiques du vecteur permettant l'induction de la protéine par le promoteur T7, la purification par affinité de la protéine (6xHis, étiquette hexa-histidine), le site de coupure à la protéase 3C, le site de clonage LIC (*Ligation Independent Cloning*), l'origine de réplication (ColE1) et le gène de résistance à la kanamycine (Kan) sont indiqués.

5.1.2 Expression de HK2

Le plasmide pETNKI-hexokinase2 a été introduit par électroporation dans la souche *E. Coli* BL21 (DE3). Un litre de milieu LB a été inoculé par 20 ml d'une culture à saturation de BL21(DE3) pETNKI-hexokinase2. Nous avons réalisé un premier test d'expression où les cellules sont cultivées à 37 °C, pendant 4 h 30 sous agitation, la production de HK2 a été induite par 1 mM d'IPTG et analysée par SDS-PAGE (Figure 169 A). Le niveau de surexpression de HK2 est élevé, cependant la protéine est partiellement clivée au niveau de l'hélice de transition

entre ses deux domaines. Nous avons alors surexprimé la protéine en milieu minimum M9 à 18 °C pendant 24 h (Figure 169 B), la dégradation de HK2 est moins importante dans ces conditions. Nous avons donc conservé ces conditions d'expression afin d'obtenir un bon rendement en protéine et éviter la dégradation de HK2 par les protéases cellulaires. 24 h post-induction, les cellules sont centrifugées puis congelées.

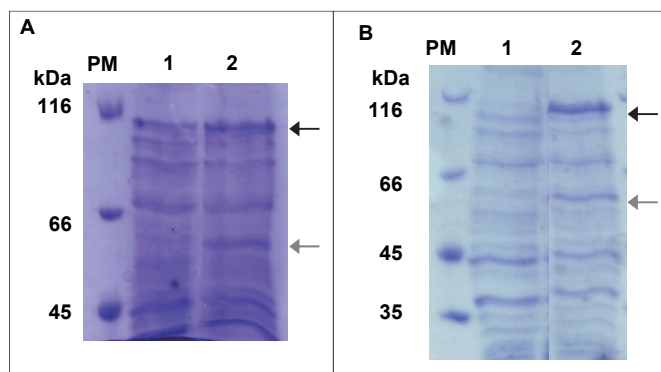


Figure 169. Expression de HK2 chez *E. Coli*. L'influence du milieu de culture, de la température et du temps d'induction a été évaluée. A, Expression de HK2 en milieu LB à 37 °C pendant 4 h 30. B, Expression de HK2 en milieu M9 à 18°C pendant 24 h. Les pistes 1 et 2 correspondent respectivement aux cellules avant et après induction à l'IPTG. Chaque piste correspond à une même quantité de cellules, analysées par SDS-PAGE 8% (A) et 10% (B). La flèche noire indique la protéine HK2 et la flèche grise indique la dégradation de HK2 au niveau de l'hélice de transition.

5.1.3 Purification de HK2

Après décongélation, les bactéries ont été lysées par sonication et lyse chimique en présence de lysosyme, de DNase et de détergent puis centrifugées pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines recombinantes HK2 présentes dans le surnageant ont été purifiées par chromatographie d'affinité au nickel grâce à la présence de l'étiquette hexa-histidine de HK2 en N-terminal. L'élution a été réalisée par gradient d'imidazole de 5 à 250 mM et analysée par SDS-PAGE (Figure 170). Les fractions d'élution indiquent que la protéine HK2 n'a pas une pureté optimale, le domaine N-terminal de HK2 dégradé au niveau de l'hélice de transition est retrouvé en quantité non négligeable malgré l'expression de la protéine en milieu M9 à 18°C.

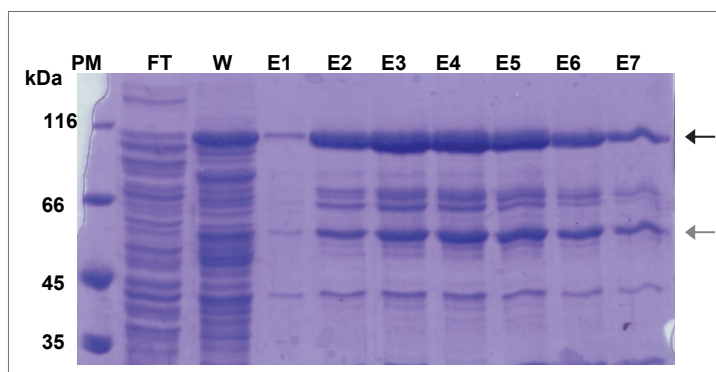


Figure 170. Purification de HK2 par chromatographie d'affinité au nickel. Les échantillons issus de la purification ont été analysés par SDS-PAGE (10%). Les différentes pistes correspondent aux protéines non retenues par la colonne (FT) ; aux protéines lavées (W) ; et aux protéines éluées (E1 à E7) par gradient d'imidazole. On remarque la présence du domaine N-terminale de HK2 dans les fractions d'élué. La flèche noire indique la protéine HK2 et la flèche grise indique la dégradation de HK2 au niveau de l'hélice de transition

Nous avons alors réalisé une deuxième étape de purification de HK2 par chromatographie d'exclusion stérique. Les fractions d'élué issues de la chromatographie d'affinité au nickel ont été rassemblées puis dialysées contre un tampon (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl). L'échantillon dialysé a été purifié par chromatographie d'exclusion sur la colonne Superdex 200 pg (gamme 10 000 – 600 000 Da). Le profil d'élué, analysé par SDS-PAGE, montre un « épaulement » du pic à un volume d'élué plus élevé par rapport au pic majeur d'élué, mettant en évidence la séparation du fragment de dégradation N-terminal de la protéine HK2 (Figure 171B). Cette seconde étape de purification nous a permis d'obtenir la protéine HK2 avec un niveau de pureté élevée et sans dégradation (Figure 171C). La protéine HK2 a ensuite été concentrée à 8,7 mg/ml puis congelée à l'azote liquide. Le rendement pour un litre de culture est de l'ordre de 20 mg, ce qui est adapté à l'étude de HK2 par RMN.

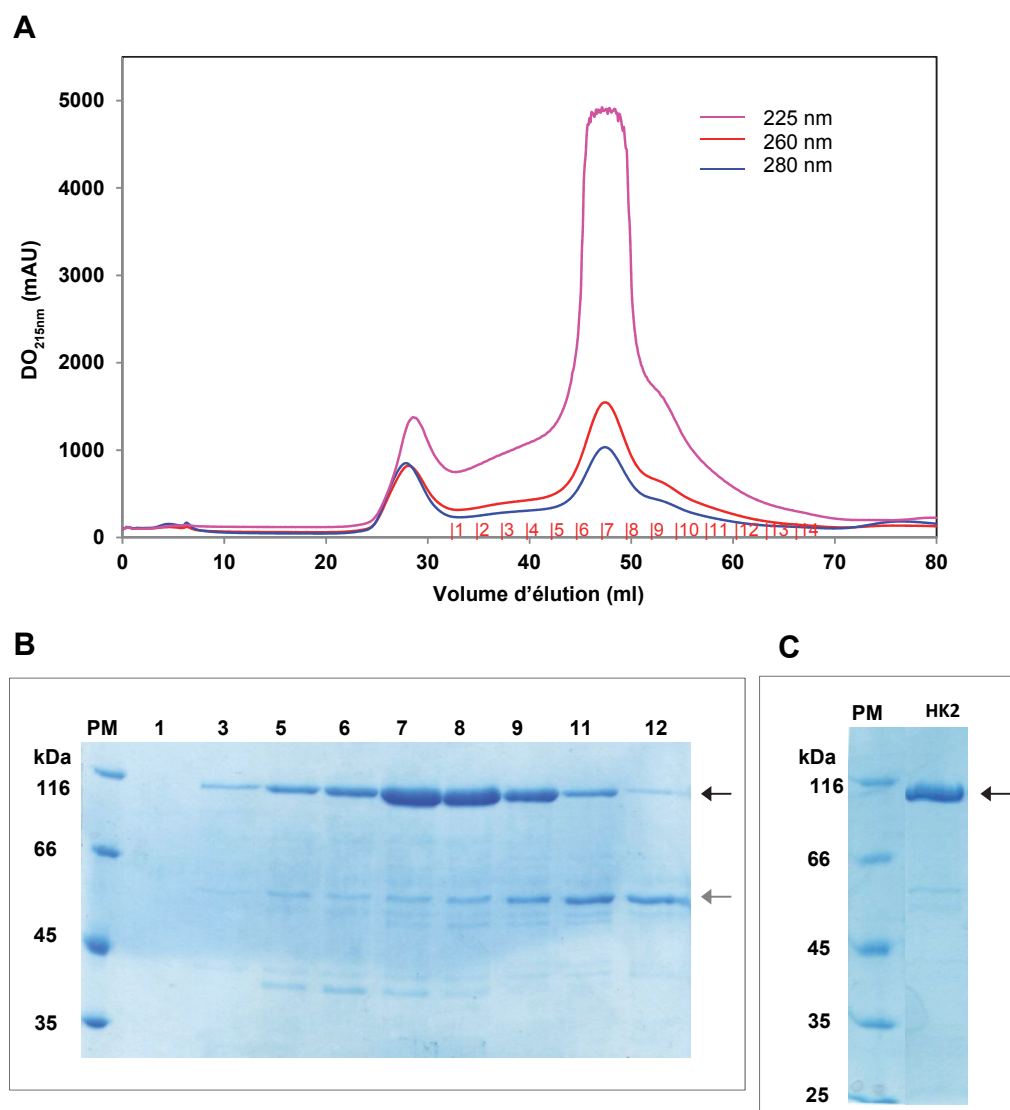


Figure 171. Chromatographie d'exclusion stérique de HK2. La protéine HK2 a été purifiée avec une deuxième étape de chromatographie d'exclusion moléculaire sur une colonne Superdex 200pg (gamme 10 000 – 600 000 Da). Les fractions d'élution ont été analysées par SDS-PAGE (B). L'épaule du pic majeur sur le chromatogramme correspond au domaine N-terminal de HK2 issu de la dégradation de HK2 au niveau de l'hélice de transition. La préparation de HK2 obtenue après concentration a été analysée par SDS-PAGE (C).

5.2 Tests d'activité de HK2 par RMN

Nous avons vérifié que la protéine HK2 produite de manière recombinante est bien active *in vitro*. Pour cela nous avons mis au point un test d'activité enzymatique par RMN. Le test est réalisé dans un tampon D₂O, l'enzyme HK2 est mélangée à un tampon contenant du D-glucose et du MgCl₂. La réaction démarre par ajout d'ATP. A partir de ce moment, des spectres RMN 1D

proton d'une durée d'une minute sont enregistrés les uns après les autres. La phosphorylation du glucose sur sa fonction alcool numéro 6, provoque une perturbation de déplacement chimique de la plupart des résonances des protons portés par les carbones du glucose. Les différents signaux du glucose et de l'ATP ont été identifiés sur les spectres. Dans ces spectres RMN 1D on peut suivre directement la disparition de signaux de glucose et d'ATP, ainsi que l'apparition de signaux de glucose-6-phosphate et d'ADP. Cependant la plupart des signaux des deux anomères α et β du glucose et leurs produits de phosphorylation ne peuvent pas être intégrés séparément à cause de nombreuses superpositions dans le spectre. Nous avons pu identifier un signal RMN du glucose qui reste isolé après phosphorylation : il s'agit du signal du proton H2 de l'anomère β du glucose (Figure 172 B). En effet sur la molécule de Glc-6-P (Figure 165), on peut remarquer que ce proton n°2 et le groupement phosphate sont suffisamment proches dans l'espace pour observer une perturbation de déplacement chimique de ce proton dû à la présence d'un groupement phosphate sur la fonction alcool n°6. Avec ce test nous pouvons mesurer, en fonction du temps, l'apparition du β -Glc-6-P et la disparition du β -Glc (Figure 172 C), en intégrant les signaux respectifs du H₂ β -Glc et du H₂ β -Glc-6-P. L'enzyme HK2 produite de manière recombinante est donc bien active *in vitro*. Nous avons remarqué que l'activité de l'enzyme varie suivant la préparation de HK2. Afin d'être le plus reproductible possible pour les tests d'activité de l'enzyme, nous avons produit un lot unique de HK2 dédié uniquement aux mesures de l'activité de phosphorylation de l'hexokinase. Nous avons réalisé différents tests d'activité en faisant varier la concentration en HK2, la concentration en ATP, en glucose, le tampon, le pH et la température afin de trouver les conditions optimales d'activité de l'enzyme. Par exemple, si la concentration en ATP est équimolaire par rapport à celle du glucose, la réaction de phosphorylation n'est pas totale. Nous avons donc utilisé un excès d'ATP par rapport au glucose. La difficulté a été d'obtenir une vitesse de phosphorylation suffisamment rapide pour pouvoir réaliser plusieurs tests d'activité en une journée, sans toutefois que la vitesse de consommation du glucose soit trop rapide. En effet si la cinétique est trop rapide nous ne pouvons pas mesurer la vitesse initiale, car une grande partie du glucose est déjà consommé au cours du temps de préparation de l'expérience RMN (calibration de la température, du lock et des shims sur le spectromètre RMN). Les conditions qui nous ont permis d'obtenir une cinétique de phosphorylation exploitable sont celles-ci: dans un volume de 200 μ l, 0,3 μ M de HK2 est mélangé à un tampon D₂O Tris deutéré à pH 7,5 contenant 1 mM de D-glucose, et 1,1 mM de MgCl₂. Un spectre RMN 1D 1H est enregistré. La réaction démarre ensuite par ajout de 2 mM d'ATP et une série d'expériences RMN 1D 1H est enregistrée au cours du temps.

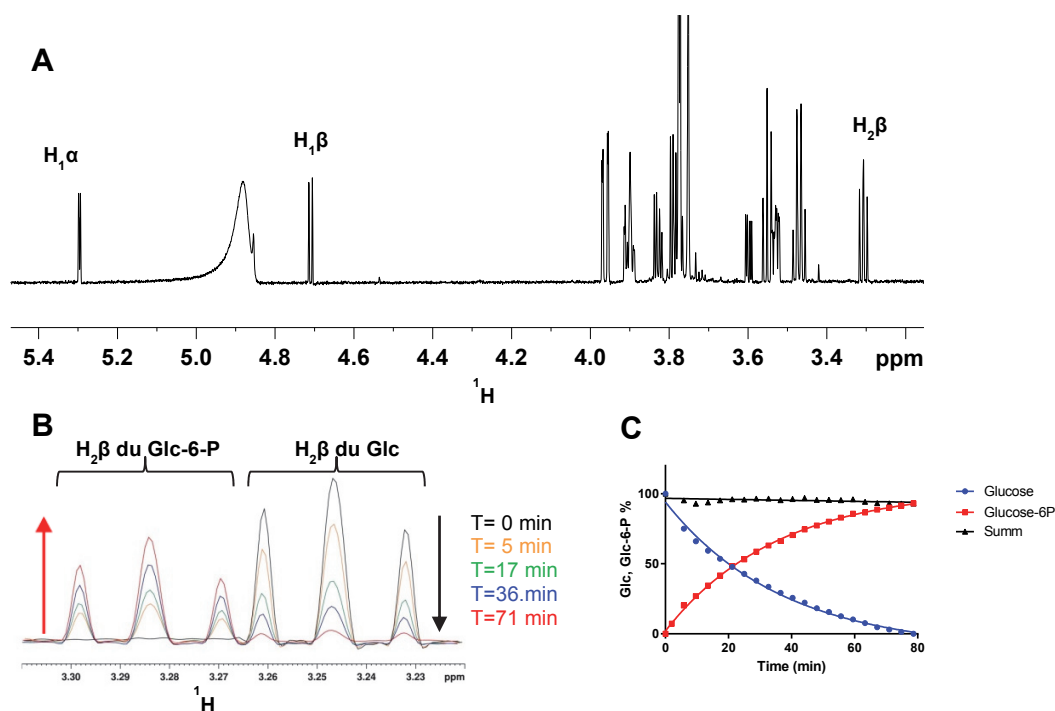


Figure 172. Activité *in vitro* de HK2 produite de manière recombinante suivie par RMN. A, Spectre RMN 1D ^1H du D-glucose, le proton numéro 2 de l'anomère β du glucose que nous avons utilisé pour suivre la cinétique de phosphorylation est indiqué. B, Cinétique de transformation du Glc en Glc-6-P suivie par RMN. Superposition des spectres RMN acquis à $t = 0, 5, 17, 36,$ et 71 min (détails du spectre 1D sur la résonance du proton numéro 2 de l'anomère β du glucose). C, Graphique des intensités des signaux RMN de l' $\text{H}_{2\beta}$ du Glc et du Glc-6-P en fonction du temps lors de la réaction de phosphorylation de l'hexokinase en B.

5.3 Interaction entre l'hexokinase 2 et les domaines 2 et 3 de NS5A

Pour étudier l'interaction entre HK2 et NS5A, nous avons travaillé avec NS5A de la souche Con1, avec laquelle l'équipe du Dr. Olivier Diaz avait commencé l'étude. Tout d'abord nous avons confirmé par RMN l'interaction entre HK2 et NS5A-D2 (Con1) et déterminé les sites d'interactions sur ce domaine. La méthode consiste à introduire NS5A-D2 (Con1) marqué ^{15}N et HK2 non marquée dans un tube RMN, ici en ratio 1:1 à $73 \mu\text{M}$, et à comparer le spectre ^1H - ^{15}N HSQC obtenu à celui de ^{15}N -NS5A-D2 seul à $73 \mu\text{M}$. L'addition de HK2 provoque un élargissement des pics correspondant aux acides aminés en interaction (Figure 173 C). On observe 3 zones d'interaction sur NS5A-D2. Ce sont des zones où une structuration résiduelle est présente: la région d'interaction la plus forte est localisée au niveau du motif structural *PW-turn* identifié dans la première partie, les deux autres régions sont localisées au niveau des tendances hélicales de NS5A-D2 (résidus 250-267 et 299-305). Nous avons également réalisé le test d'interaction avec NS5A-D3 (Con1), cependant avec ce domaine nous n'avons pas observé de

zones d'interactions spécifiques mais plutôt une légère diminution uniforme de l'intensité des résonances de ^{15}N NS5A-D3 (Con1) en présence de HK2. L'interaction entre NS5A-D3 et HK2 est probablement trop faible pour pouvoir être observée par RMN, nous avons donc poursuivi l'étude avec le domaine 2 de NS5A. Nous avons essayé d'estimer une constante de dissociation de l'interaction HK2 - NS5A-D2 avec des expériences de titrations par RMN du fluor entre HK2 et NS5A-D2 WT et les mutants cystéines de NS5A-D2, avec la méthode décrite dans la partie précédente pour l'interaction entre NS5B et NS5A-D2. Pour cette expérience de titration nous avons utilisé le tampon de NS5A-D2 (30 mM NaPi pH 6,4, 30 mM NaCl, 0,1 mM EDTA). Nous n'avons pas observé de déplacement chimique de la résonance du fluor dû à l'ajout de HK2. Il faudra peut-être recommencer l'expérience avec le tampon de NS5B que nous avons utilisé pour la titration par RMN du fluor entre NS5B-NS5A-D2 (20 mM Tris-Cl pH7, 100 mM NaCl, 100 mM Arg, 100 mM Glu, 10 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA).

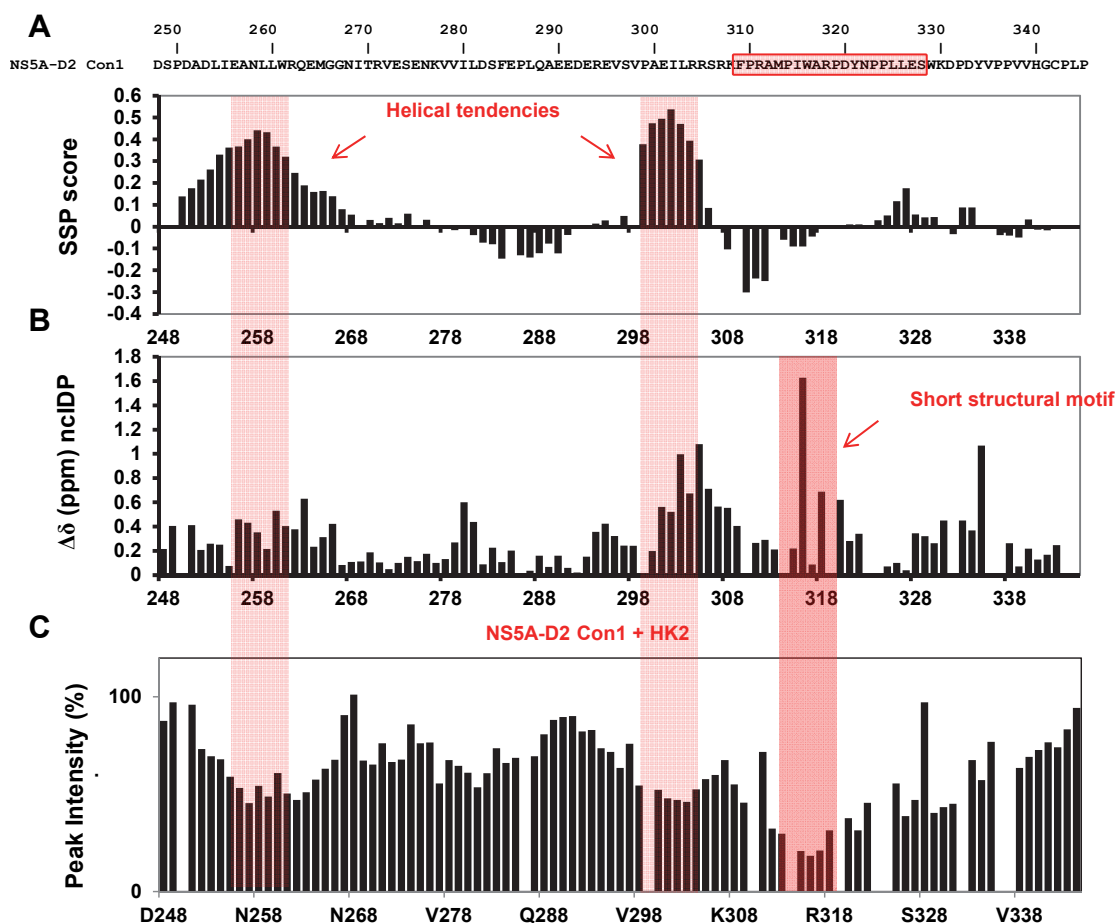


Figure 173. Détermination du site d'interaction de HK2 sur NS5A-D2 (Con1). A, Séquence de NS5A-D2 (Con1), la région surlignée en rouge correspond à la région du motif structural, Analyse SSP (analyse des déplacements chimiques RMN), les valeurs positives et négatives correspondent respectivement à des tendances à adopter une structure hélicale ou étendue. B, Ecart entre les déplacements chimiques NH expérimentaux de NS5A-D2 et les valeurs de prédictions nclDP de NS5A-D2 (Con1). Des écarts élevés par rapport aux prédictions nclDP sont indicatifs de régions structurées. C, Analyse RMN de l'interaction

entre ^{15}N NS5A-D2 (Con1) et HK2 en ratio 1 :1. Rapports d'intensités des résonances des spectres HSQC de ^{15}N NS5A-D2 en présence et en absence de CypA, réparties le long de la séquence de NS5A-D2.

5.4 Activation de l'hexokinase 2 par NS5A-D2

Comme HK2 interagit au niveau de structures résiduelles de NS5A-D2 et en particulier au niveau de son motif structural *PW-turn*, nous avons souhaité savoir si le *PW-turn* avait une importance pour l'activation de HK2. Le test d'activité de l'enzyme présenté précédemment a été amélioré et nous a permis d'étudier la régulation de l'enzyme avec différents partenaires, ainsi que l'importance du motif structural pour la régulation de HK2. Ce test permet de quantifier plus précisément l'activité de HK2, en effet le test présenté précédemment ne permettait pas d'observer la phosphorylation de l'anomère alpha du glucose en raison des superpositions dans le spectre RMN 1D proton. Ceci est gênant car il a été montré que les deux anomères du glucose ont des cinétiques de phosphorylation différentes (Richter and Berger, 2013). Pour éviter ces superpositions nous avons utilisé du glucose marqué au carbone 13 en position 2 ($2\text{-}^{13}\text{C}\text{-Glc}$). A la place de spectres 1D proton, nous avons utilisé des spectres 1D HMQC découplé en ^{13}C qui permettent de détecter uniquement les protons attachés à un carbone marqué ^{13}C . On simplifie ainsi considérablement le spectre, où on détecte uniquement 4 signaux : le proton $\text{H}_{2\beta}$ du Glc et du Glc-6-P (sous forme de triplet), et le proton $\text{H}_{2\alpha}$ du Glc et du Glc-6-P (sous forme de doublet dédoublé) (Figure 174).

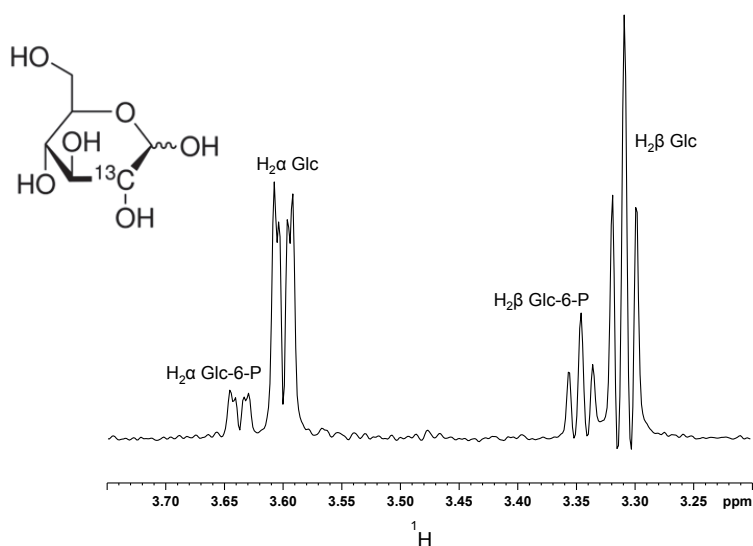


Figure 174. Spectre 1D HMQC découplé ^{13}C de la cinétique de transformation du $2\text{-}^{13}\text{C}\text{-Glc}$ en $2\text{-}^{13}\text{C}\text{-Glc-6-P}$ à un temps $t = 5$ min.

La cinétique de phosphorylation du glucose par l'hexokinase 2 a été mesurée à l'aide d'expériences RMN pseudo 2D HMQC de 32 scans avec 6144 x 256 nombre de points à 900MHz. Ceci permet d'obtenir 256 FID de 32 scans (chaque FID durant 1 min). Le traitement des pseudos 2D HMQC est effectué en calculant l'intégration des signaux (doublets et triplets) du Glc H₂β, Glc6P H₂β, Glc H₂α et Glc6P H₂α au cours du temps (Figure 175). On peut voir avec cette méthode que les cinétiques de phosphorylation des deux anomères du glucose sont différentes, ce qui confirme les résultats obtenus par Richter and Berger, (2013). La méthode qu'ils ont utilisée pour étudier la phosphorylation du glucose est présentée dans l'introduction au paragraphe 7.8.2. Par la suite nous avons additionné les signaux des deux anomères afin d'observer la consommation de la totalité du glucose et l'apparition de la totalité du glucose-6-phosphate.

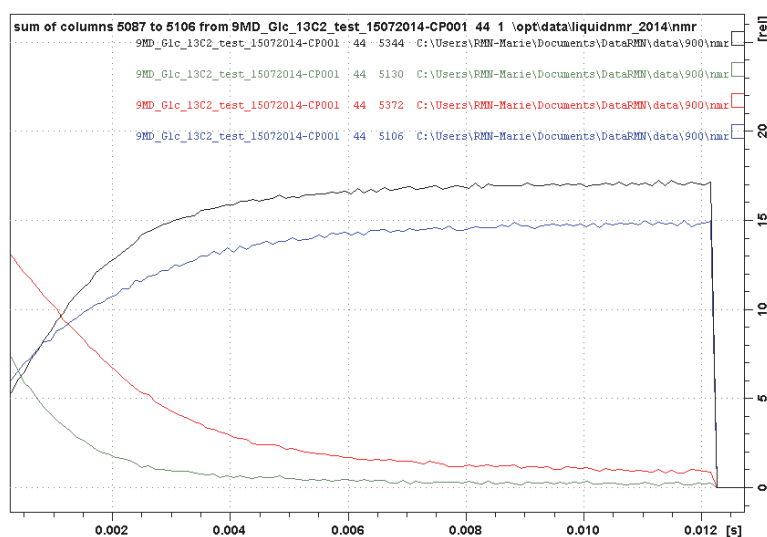


Figure 175. Caractérisation par RMN de la phosphorylation du glucose par l'hexokinase 2 humaine à l'aide de l'expérience pseudo 2D HMQC et du 2-¹³C-Glc. Intégration des 4 signaux Glc-6-P H₂β (noir), Glc-6-P H₂α (bleu) et Glc H₂β (rouge), Glc H₂α (vert) de la pseudo 2D HMQC.

Cette méthode nous a permis d'étudier par RMN la régulation de HK2 par NS5A-D2 ainsi que par le motif structural *PW-turn* localisé au sein de NS5A-D2. Pour cela nous nous intéressons aux variations des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l'enzyme dues à la présence des différents partenaires : NS5A-D2 (Con1), NS5A-D2 (JFH1), NS5A-D2 A311G (JFH1), le peptide pepD2-WT. Les cinétiques enzymatiques sont traditionnellement étudiées par la méthode de Michaelis-Menten qui corrèle la vitesse initiale de la réaction à la concentration en substrat (équation 1). Cette méthode a été utilisée par l'équipe du Dr. Olivier Diaz et nécessite de mesurer la vitesse initiale de la réaction enzymatique à différentes concentrations en substrats.

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Afin de consommer moins d'échantillons et gagner du temps, nous avons utilisé une autre approche qui consiste à analyser une courbe cinétique à une seule concentration en substrat (Exnowitz et al., 2012). La concentration du produit ou du substrat est suivie au cours de temps avec une seule réaction enzymatique à une seule concentration initiale en substrat. Cette méthode nécessite d'intégrer l'équation de Michaelis-Menten (1), So est la concentration initiale en substrat :

$$S(t) - S_{(0)} + K_M \ln \frac{S(t)}{S_{(0)}} = -V_{\max}t \quad (2)$$

En 1997, Schnell and Mendoza proposent une solution de la forme intégrée de l'équation de Michaelis-Menten (2), en utilisant la fonction de Lambert W qui est définie par l'inverse de la fonction (3):

$$h(x) = xe^x \quad (3)$$

C'est-à-dire :

$$h(W(x)) = x \quad (4)$$

$$\text{pour tout } x > 0, \quad W(x)e^{W(x)} = x \quad (5)$$

$$\ln W(x) + W(x) = \ln x \quad (6)$$

L'équation (2) peut s'écrire :

$$\frac{S(t)}{K_M} + \ln \frac{S(t)}{K_M} = \frac{S_{(0)}}{K_M} + \ln \frac{S_{(0)}}{K_M} - \frac{V_{\max}}{K_M}t \quad (7)$$

Soit un nombre positif x tel que,

$$\frac{S(t)}{K_M} = W(x) \quad (8)$$

Donc

$$\frac{S(t)}{K_M} + \ln \frac{S(t)}{K_M} = W(x) + \ln W(x) \quad (9)$$

D'après (7) et (9)

$$\frac{S_{(0)}}{K_M} + \ln \frac{S_{(t)}}{K_M} - \frac{V_{max}}{K_M} t = W(x) + \ln W(x) \quad (10)$$

$$\frac{S_{(0)} - V_{max}t}{K_M} + \ln \frac{S_{(t)}}{K_M} = W(x) + \ln W(x) \quad (11)$$

En appliquant la fonction exponentielle, on obtient

$$\frac{S_{(0)}}{K_M} e^{\frac{S_{(0)} - V_{max}t}{K_M}} = W(x) e^{W(x)} \quad (12)$$

Et d'après (5), on obtient :

$$x = \frac{S_{(0)}}{K_M} e^{\frac{S_{(0)} - V_{max}t}{K_M}} \quad (13)$$

Donc d'après (9),

$$\frac{S_{(t)}}{K_M} = W \left(\frac{S_{(0)}}{K_M} e^{\frac{S_{(0)} - V_{max}t}{K_M}} \right) \quad (14)$$

Cette équation (14) nous a permis d'extraire avec le logiciel Octave les paramètres cinétiques de HK2, K_M et V_{max} , en utilisant une seule courbe cinétique à une seule concentration en substrat. Nous avons étudié de manière comparative la cinétique de phosphorylation du glucose par HK2 en absence et en présence de NS5A-D2 (Con1) (Figure 176). On remarque qu'en présence de NS5A-D2 la phosphorylation du glucose est nettement plus rapide par rapport au contrôle sans NS5A-D2. En l'absence de NS5A-D2, nous avons obtenu un K_M de 2,4 mM et une V_{max} de 128 $\mu\text{M}/\text{min}$ ce qui est du même ordre de grandeur que les valeurs de (Richter and Berger, 2013). En présence de NS5A-D2, le K_M est de 0,35 mM et le V_{max} de 142 $\mu\text{M}/\text{min}$. Ces valeurs mettent bien en évidence que NS5A-D2 est un activateur de HK2 en augmentant l'affinité et la V_{max} de l'enzyme. Nous avons remarqué que les valeurs numériques obtenues ne sont toutefois pas très fiables, en effet elles varient énormément en fonction de la valeur du plateau S_0 . Dans la suite de cette étude, nous utiliserons donc cette approche expérimentale uniquement pour ses aspects qualitatifs et non quantitatifs. La stratégie consistant à comparer des courbes cinétique expérimentales sans donner de valeurs numériques du K_M et du V_{max} a déjà été utilisée dans plusieurs publications (Tokunaga et al., 2014).

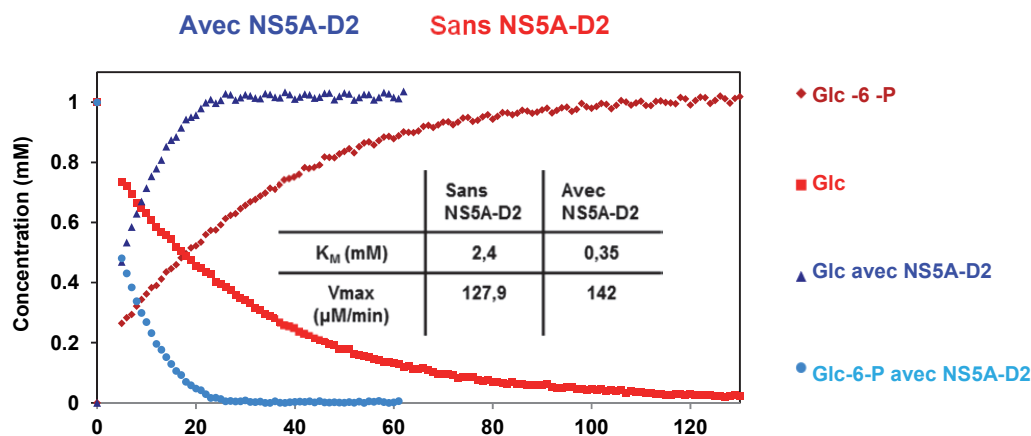


Figure 176. Activation de HK2 par NS5A-D2. Concentration du Glc en absence (rouge clair) et en présence (bleu clair) de NS5A-D2 et du Glc-6-P en absence (rouge foncé) et en présence (bleu foncé) de NS5A-D2 pendant la réaction catalysée par l'hexokinase 2. Chaque point correspond à la quantification du Glc ou du Glc-6P sur un spectre 1D HMQC issu de la pseudo 2D. On additionne les intégrales du triplet du Glc- $\text{H}_2\beta$ et du doublet du Glc- $\text{H}_2\alpha$ pour quantifier le Glc et on additionne les intégrales du triplet du Glc-6P- $\text{H}_2\beta$ et du doublet du Glc-6P- $\text{H}_2\alpha$ pour quantifier le Glc-6P. Les paramètres cinétiques de l'enzyme (K_M et V_{max}) estimés à partir des courbes cinétiques sont indiqués sur la figure.

Comme nous avons vu que HK2 interagit au niveau du petit motif structural *PW-turn* de NS5A-D2, nous avons souhaité connaître l'importance de celui-ci pour l'activation de HK2. Dans une première approche, nous avons travaillé avec les peptides pepD2(Con1) et pepD2(JFH1) car le motif structural y avait été caractérisé (partie 1 et 2 des résultats). Nous n'avons pas constaté d'augmentation de la cinétique en présence de ces peptides. Cependant des résultats préliminaires réalisés par l'équipe du Dr. Olivier Diaz indiquent que le motif structural aurait une importance pour l'activation de HK2. Ils ont réalisé des mesures spectrophotométrique UV de l'activité de HK2 produite de manière recombinante en présence du domaine NS5A-D2 WT ou des mutants A311G et P310A (Figure 177). L'activation de HK2 est plus faible en présence des mutations cassant le *PW-turn* (P310A et A311G) par rapport à NS5A-D2 WT. Il semblerait donc que le motif structural soit effectivement impliqué dans l'activation de HK2.

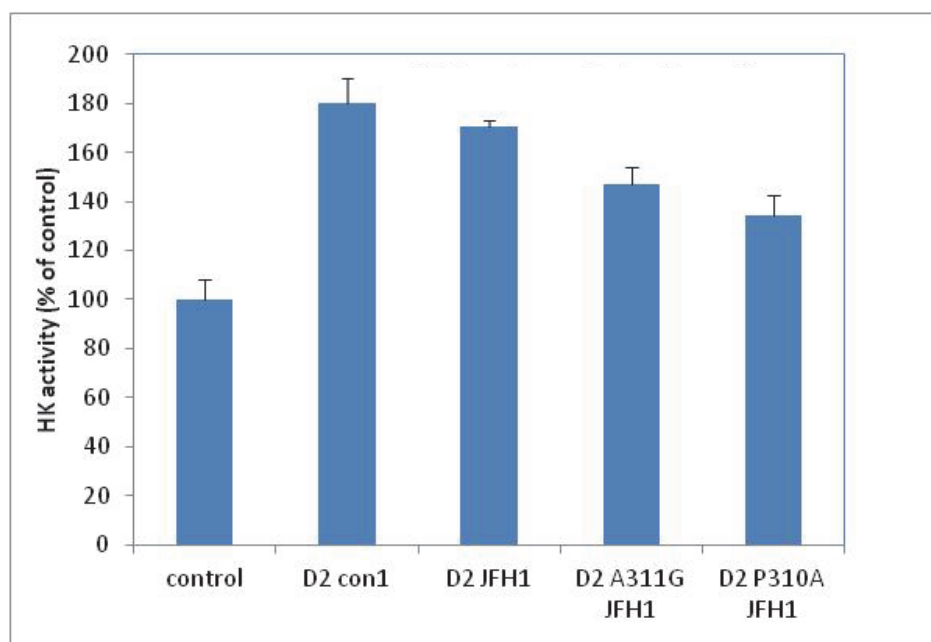


Figure 177. Mesure de l'activité de HK2 par dosage spectrophotométrique UV en présence de NS5A-D2 (Con1), NS5A-D2 (JFH1), NS5A-D2 A311G (JFH1) et NS5A-D2 P310A (JFH1).

5.5 Conclusion et perspectives

L'infection par le VHC induit des perturbations du métabolisme de la cellule hôte avec notamment une augmentation de la glycolyse. Cependant les mécanismes moléculaires de ces perturbations sont peu connus. Ramière et al., (2014) ont pu mettre en évidence que NS5A interagit avec HK2 et que NS5A est un activateur de l'enzyme. Suite à ces travaux, l'équipe du Dr. Olivier Diaz a cherché à mieux comprendre les mécanismes d'activation de l'hexokinase 2 par NS5A, étant donné qu'au laboratoire une caractérisation structurale des domaines 2 et 3 de NS5A a été réalisée, ils ont contacté notre équipe pour collaborer sur ce projet. La première étape de ce travail a été de produire l'enzyme HK2 de manière recombinante en quantité suffisante pour une étude par RMN. Un test d'activité de l'enzyme réalisé par RMN nous a permis de confirmer que l'enzyme produite de manière recombinante est bien active *in vitro*. L'interaction entre NS5A-D2 et HK2 a été confirmée par RMN et nous avons identifié les sites d'interactions sur NS5A-D2. HK2 interagit au niveau des structures résiduelles de NS5A-D2 et en particulier au niveau du *PW-turn* de NS5A-D2. NS5A-D2 joue un rôle d'activateur de l'enzyme, et le petit motif structural de NS5A-D2 semble être important pour l'activation.

HK2 est une enzyme allostérique, il est fortement probable que NS5A puisse jouer un rôle en tant qu'effecteur allostérique de l'enzyme. Afin d'étudier le rôle de NS5A en tant qu'effecteur allostérique de HK2, une des stratégies envisagées est d'étudier par RMN les changements de

conformation de l'enzyme HK2. La RMN permettra également d'identifier sur HK2 les résidus en interaction avec NS5A-D2. Cependant HK2 étant une protéine de haut poids moléculaire (103 kDa), son étude par RMN implique des contraintes techniques. En effet, plus la taille de la protéine est élevée, plus la vitesse de rotation de la protéine sur elle-même diminue, ce qui provoque un élargissement puis une disparition des signaux RMN, de plus les interactions dipolaire entre les protons amide et les autres protons de la protéine sont une source de relaxation, ce qui provoque également un élargissement des signaux. Pour étudier HK2 par RMN il est envisagé d'utiliser des outils qui ont déjà été employé au laboratoire pour étudier de grosses protéines, notamment NS5B (65 kDa). La stratégie consiste à produire HK2 uniformément enrichie en ^2H et sélectivement marquée $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ sur les groupes méthyles $\delta 1$ des résidus d'isoleucine (Ile) et à enregistrer des spectres ^1H - ^{13}C methyl-TROSY-HMQC. Ceci permet d'augmenter la sensibilité et de réduire la complexité des spectres puisqu'on observe uniquement les groupements méthyles $\delta 1$ $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ des chaînes latérales des isoleucines. Ces outils ont déjà été utilisés pour étudier la régulation d'une isoenzyme de l'hexokinase, HK4 (ou glucokinase (GCK)) qui est retrouvée principalement dans le foie (Larion et al., 2012). La GCK possède un seul domaine catalytique pouvant également exister en conformation ouverte ou fermée, contrairement à HK1, 2 et 3 qui ont deux domaines. Des données cristallographiques montrent que la GCK non liée à ses substrats possède une conformation ouverte, tandis que la fixation des substrats ATP et glucose provoque la fermeture de l'enzyme (Kamata et al., 2004 ; Petit et al., 2011). Larion et al., (2012) ont observé par RMN les changements de conformation de la GCK suite à l'ajout des substrats ATP et glucose en utilisant des spectres ^1H - ^{13}C methyl-TROSY-HMQC de la GCK uniformément ^2H et sélectivement marquée Ile- $\delta 1$ $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$. Sur la base de ces observations, ils ont pu étudier par RMN les changements de conformations de l'enzyme dus à la présence d'effecteur allostérique. C'est cette stratégie qui sera envisagée pour étudier la régulation de l'hexokinase par NS5A-D2. Cependant l'étude de HK2 par RMN sera plus complexe que celle de GCK car HK2 possède deux domaines, il y aura donc environ deux fois plus de résonances à attribuer sur le spectre ^1H - ^{13}C methyl-TROSY HMQC. Afin de simplifier l'analyse de l'enzyme par RMN, il est envisagé de continuer l'étude avec la GCK. En effet l'attribution des spectres ^1H - ^{13}C méthyl-TROSY HMQC de la GCK a déjà été réalisée (Larion et al., 2012). De plus la GCK est l'isoenzyme principale du foie, c'est donc certainement l'isoenzyme la plus régulée par NS5A-D2 *in vivo*. Ramière et al., (2014) avaient commencé l'étude avec HK2 car la GCK n'est pas exprimée dans les lignées cellulaires Huh 9.13, Huh 7.5 et HepG2 qu'ils ont utilisées. Des études préliminaires ont commencé au laboratoire avec la GCK, celle-ci a été clonée dans le vecteur pETNKI-His-3C-LIC-kan et produite de manière recombinante. L'équipe du Dr. Olivier Diaz a pu vérifier, grâce à leur test spectrophotométrique

UV, que la GCK produite de manière recombinante au laboratoire est activée par NS5A-D2. Ils vérifieront que la GCK est bien régulée par NS5A *in vivo* dans des lignées cellulaires où la GCK est exprimée. L'étude de la GCK par RMN devrait donc permettre de comprendre la régulation allostérique de l'enzyme par NS5A.

Conclusion générale

L'infection par le Virus de l'hépatite C est un problème majeur de santé publique touchant plus de 170 millions de personnes dans le monde. Avec le développement d'inhibiteurs spécifiques du VHC ciblant la protéase NS3/4A, l'ARN-dépendante ARN-polymérase NS5B et la protéine NS5A, de nombreux progrès thérapeutiques ont été réalisés, mais le traitement est encore extrêmement cher et difficile d'accès dans les pays économiquement faibles où la prévalence de la maladie est élevée. Les futurs traitements contre le VHC pourraient être une combinaison d'inhibiteurs spécifiques du VHC (DAAs) et d'inhibiteurs ciblant des facteurs de la cellule hôte (HTAs). Dans ce contexte, NS5A est une cible thérapeutique très intéressante étant donné qu'elle est la cible d'efficaces DAAs, par exemple le Daclatasvir, et son interaction avec la Cyclophiline A humaine est également la cible de l'inhibiteur le plus avancé parmi les HTAs, l'Alisporivir, dans les tests d'essais cliniques. Cependant le(s) rôle(s) de cette protéine énigmatique ne sont pas encore bien connus. Il est maintenant bien établi que cette protéine joue un rôle essentiel directement dans la réplication du VHC ainsi que de manière indirecte en modulant certaines voies métaboliques de la cellule hôte favorisant la réplication du VHC. Cependant aucune fonction précise n'a été mise en évidence pour cette protéine qui est partiellement désordonnée. Elle est ancrée à la membrane par une hélice amphipathique puis est divisée en trois domaines, le domaine 1 qui possède une structure tridimensionnelle stable et interagit avec l'ARN viral, les domaines 2 et 3 qui sont intrinsèquement désordonnés et ont été caractérisés par RMN dans des études précédentes au laboratoire. Dans ce contexte, nous avons étudié les propriétés structurales et fonctionnelles de la protéine NS5A à la fois dans le cadre de la réplication de l'ARN du VHC et dans le cadre des perturbations du métabolisme de la cellule hôte.

Les trois premières parties de cette thèse s'inscrivent dans l'étude du complexe de réplication de l'ARN du virus de l'hépatite C. Le complexe de réplication implique, entre autres, deux protéines du virus : NS5A et NS5B ainsi qu'une protéine de l'hôte la CypA. Le domaine 2 désordonné de NS5A interagit à la fois avec la CypA et avec NS5B, l'ARN-dépendante ARN-polymérase virale, une protéine de 65 kDa dont la structure cristallographique est connue. La CypA est une protéine de l'hôte, de 18 kDa, qui porte une activité enzymatique peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase. L'inhibition de celle-ci par la CsA ou des dérivés non-immunosuppresseurs tels que l'Alisporivir empêche la réplication du VHC. Par pression de sélection à ces inhibiteurs des mutations de résistances ont été identifiées au sein des domaines 2 et 3 de NS5A et dans NS5B avec un effet prépondérant pour les mutations apparues dans le domaine 2 de NS5A.

Dans la première partie nous avons identifié et caractérisé par RMN un petit motif structural au sein du domaine désordonné NS5A-D2 (Con1) à l'aide de peptides synthétiques et de peptides ^{15}N ^{13}C produits de manière recombinante. Ce motif structural est localisé dans la zone la plus conservée de NS5A-D2 et dans le site d'interaction avec la CypA. Nous avons montré que ce motif structural, un *turn* Pro³¹⁴-Trp³¹⁶, est essentiel pour la réplication de l'ARN viral.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux conséquences structurales et fonctionnelles de mutations de résistances aux inhibiteurs de la CypA au sein de NS5A-D2 de la souche JFH1. L'étude de ces mutations permet d'apporter un éclairage sur le rôle de NS5A-D2 et de la CypA pour la réplication du VHC étant donné que ces mutations font le lien entre ces deux protéines. Nous avons montré que le motif structural au sein de NS5A-D2 n'est pas limité aux résidus $^{310}\text{PAWA}^{313}$ mais qu'il s'étend plus loin, jusqu'au résidu P320, probablement dans une conformation de type polyproline. Le PW-*turn* identifié est en équilibre dynamique entre une conformation structurée et une conformation non structurée. L'isomérisation *cis/trans* des prolines avoisinants le PW-*turn* semble être à l'origine de cet équilibre dynamique. Les mutations de résistances D316E et DEYN localisées dans ce motif structural perturbent l'équilibre dynamique entre ces deux conformations, la population de conformation non structurée augmente aux dépens de la population de conformation structurée. Cette déstabilisation peut probablement s'expliquer par un pourcentage de prolines en conformation *cis* légèrement plus important autour du PW-*turn*. Nous avons mis en évidence, dans un test de réplication de l'ARN viral, que plus le motif structural est déstabilisé plus la réplication de l'ARN viral diminue. Les mutations de résistances D316E et DEYN rendent le virus moins dépendant de la CypA, elles devraient donc reproduire le rôle de la CypA sur NS5A-D2. On peut donc supposer que la fonction de la CypA serait de déstabiliser légèrement le motif structural. Afin de mieux comprendre cette fonction, une étude de la liaison et de l'activité PPIase de la CypA sur NS5A-D2 WT et sur NS5A-D2 D316E a été réalisée. Cette étude a montré que plus le motif structural est déstabilisé plus l'affinité entre ces deux partenaires diminue, et plus l'activité PPIase de la CypA vis-à-vis de la proline 310 du motif augmente. Nous pouvons donc proposer un mécanisme hypothétique nécessaire à la réplication de l'ARN viral du VHC : la dynamique du PW-*turn* entre une conformation structurée et une conformation non structurée serait régulée de manière dynamique par la CypA. La CypA pourrait avoir comme effet de déstabiliser légèrement le PW-*turn*, ce qui permettrait à NS5A-D2 d'interagir avec d'autres partenaires, notamment NS5B. On peut donc supposer un phénomène de compétition de l'interaction de NS5A-D2 entre la CypA et NS5B, régulé de manière spatio-temporelle par la CypA.

L'interaction entre NS5A-D2 et NS5B a été étudiée dans la troisième partie. Nous avons comparé deux méthodologies pour étudier par RMN du fluor l'interaction entre ces deux protéines. Ces deux méthodes permettent d'étudier rapidement l'interaction entre deux protéines de façon qualitative et quantitative en solution.

Dans la quatrième partie nous avons résolu la structure cristallographique du complexe CypA-Alisporivir. Ces résultats permettent d'expliquer le caractère anti-VHC et non immunosuppresseur de cet inhibiteur actuellement en phase II de développement clinique pour une thérapie sans interféron.

La dernière partie de ma thèse est consacrée aux études préliminaires des interactions entre NS5A et l'hexokinase 2 humaine. Les résultats récents obtenus par nos collaborateurs indiquent que l'infection par le VHC induit une augmentation de la glycolyse anaérobie dans la cellule, et que NS5A est impliquée dans ces perturbations via son interaction avec l'hexokinase 2 humaine, la première enzyme limitant de la glycolyse. Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer par RMN que HK2 interagit au niveau des structures résiduelles du domaine 2 de NS5A et plus particulièrement au niveau du *PW-turn* décrit dans les parties précédentes. Nous avons mis au point un test d'activité de l'hexokinase 2 par RMN qui permet d'étudier l'activation ou l'inhibition de celle-ci avec différents partenaires. Ceci a permis de confirmer que NS5A-D2 est un activateur de HK2. Les résultats obtenus par nos collaborateurs indiquent que le *PW-turn* au sein de NS5A-D2 semble important pour cette activation.

Références

- Abrantes, J.L., Alves, C.M., Costa, J., Almeida, F.C.L., Sola-Penna, M., Fontes, C.F.L., and Souza, T.M.L. (2012). Herpes simplex type 1 activates glycolysis through engagement of the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1). *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1198–1206.
- Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G.B., and Zhang, Q.-X. (1999). Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 12766–12771.
- Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., and Miyano, M. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure* 7, 1417–1426.
- Alves, C., and Cunha, C. (2012). Order and disorder in viral proteins: new insights into an old paradigm. *Future Virol.* 7, 1183–1191.
- Alvisi, G., Madan, V., and Bartenschlager, R. (2011). Hepatitis c virus and host cell lipids: An intimate connection. *RNA Biol.* 8, 258–269.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J. Virol.* 76, 6919–6928.
- Appel, N., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2005). Mutational Analysis of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A: Potential Role of Differential Phosphorylation in RNA Replication and Identification of a Genetically Flexible Domain. *J. Virol.* 79, 3187–3194.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 4, e1000035.
- Appleby, T.C., Perry, J.K., Murakami, E., Barauskas, O., Feng, J., Cho, A., Fox, D., Wetmore, D.R., McGrath, M.E., Ray, A.S., et al. (2015). Viral replication. Structural basis for RNA replication by the hepatitis C virus polymerase. *Science* 347, 771–775.
- Arber, S., Krause, K.H., and Caroni, P. (1992). s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J. Cell Biol.* 116, 113–125.
- Ascher, D.B., Wielens, J., Nero, T.L., Doughty, L., Morton, C.J., and Parker, M.W. (2014). Potent hepatitis C inhibitors bind directly to NS5A and reduce its affinity for RNA. *Sci. Rep.* 4.
- Bah, A., Vernon, R.M., Siddiqui, Z., Krzeminski, M., Muhandiram, R., Zhao, C., Sonenberg, N., Kay, L.E., and Forman-Kay, J.D. (2014). Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* 519, 106–109.
- Baldwin, R.L., and Zimm, B.H. (2000). Are denatured proteins ever random coils? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12391–12392.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* 19, 95–103.
- Barth, H., Schäfer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., van Kuppevelt, T.H., Depla, E., et al. (2003). Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* 278, 41003–41012.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197, 633–642.
- Bax, A. (2003). Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein Sci.* 12, 1–16.
- Beeck, A. Op De, Cocquerel, L., and Dubuisson, J. (2001). Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 82, 2589–2595.

- Benkimoun, C.H. et P. (2015). Hépatite C : bataille pour l'accès à un traitement révolutionnaire. *Le Monde.fr*.
- Berger, K.L., Kelly, S.M., Jordan, T.X., Tartell, M.A., and Randall, G. (2011). Hepatitis C Virus Stimulates the Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha-Dependent Phosphatidylinositol 4-Phosphate Production That Is Essential for Its Replication. *J. Virol.* **85**, 8870–8883.
- Bergsma, D.J., Eder, C., Gross, M., Kersten, H., Sylvester, D., Appelbaum, E., Cusimano, D., Livi, G.P., McLaughlin, M.M., and Kasyan, K. (1991). The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms. *J. Biol. Chem.* **266**, 23204–23214.
- Bernadó, P., Bertoncini, C.W., Griesinger, C., Zweckstetter, M., and Blackledge, M. (2005). Defining Long-Range Order and Local Disorder in Native α -Synuclein Using Residual Dipolar Couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17968–17969.
- Blackledge, M. (2005). Recent progress in the study of biomolecular structure and dynamics in solution from residual dipolar couplings. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **46**, 23–61.
- Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., and Rice, C.M. (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972–1974.
- Bosco, D.A., and Kern, D. (2004). Catalysis and Binding of Cyclophilin A with Different HIV-1 Capsid Constructs [†]. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 6110–6119.
- Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R., and Cosset, F.-L. (2011). A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog.* **7**, e1002144.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F., and Lavergne, J.-P. (2005). Hepatitis C Virus Core Protein Is a Dimeric Alpha-Helical Protein Exhibiting Membrane Protein Features. *J. Virol.* **79**, 11353–11365.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R.G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F., and McLauchlan, J. (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* **281**, 22236–22247.
- Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J. Gen. Virol.* **88**, 2204–2213.
- Bowen, D.G., and Walker, C.M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* **436**, 946–952.
- Braaten, D., Ansari, H., and Luban, J. (1997). The hydrophobic pocket of cyclophilin is the binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J. Virol.* **71**, 2107–2113.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., and Elledge, S.J. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* **319**, 921–926.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). An Amino-terminal Amphipathic α -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J. Biol. Chem.* **277**, 8130–8139.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rousset, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F.A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13034–13039.
- Broers, B., Helbling, B., François, A., Schmid, P., Chuard, C., Hadengue, A., Negro, F., and Swiss Association for the Study of the Liver (SASL 18) (2005). Barriers to interferon-alpha therapy are higher in intravenous drug users than in other patients with acute hepatitis C. *J. Hepatol.* **42**, 323–328.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921.
- Buck, M. (1998). Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.* **31**, 297–355.

- Bukh, J., Wantzin, P., Krogsgaard, K., Knudsen, F., Purcell, R.H., and Miller, R.H. (1993). High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. Copenhagen Dialysis HCV Study Group. *J. Infect. Dis.* *168*, 1343–1348.
- Bukh, J., Meuleman, P., Tellier, R., Engle, R.E., Feinstone, S.M., Eder, G., Satterfield, W.C., Govindarajan, S., Krawczynski, K., Miller, R.H., et al. (2010). Challenge pools of hepatitis C virus genotypes 1-6 prototype strains: replication fitness and pathogenicity in chimpanzees and human liver-chimeric mouse models. *J. Infect. Dis.* *201*, 1381–1389.
- Callebaut, I., Labesse, G., Durand, P., Poupon, A., Canard, L., Chomilier, J., Henrissat, B., and Mornon, J.P. (1997). Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *53*, 621–645.
- Camilloni, C., Sahakyan, A.B., Holliday, M.J., Isern, N.G., Zhang, F., Eisenmesser, E.Z., and Vendruscolo, M. (2014). Cyclophilin A catalyzes proline isomerization by an electrostatic handle mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 10203–10208.
- Cardenas, M.E., Muir, R.S., Breuder, T., and Heitman, J. (1995). Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. *EMBO J.* *14*, 2772–2783.
- Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J. Virol.* *76*, 3720–3730.
- Carroll, S.S., Ludmerer, S., Handt, L., Koeplinger, K., Zhang, N.R., Graham, D., Davies, M.-E., MacCoss, M., Hazuda, D., and Olsen, D.B. (2009). Robust antiviral efficacy upon administration of a nucleoside analog to hepatitis C virus-infected chimpanzees. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 926–934.
- Casteleijn, M.G., Alahuhta, M., Groebel, K., El-Sayed, I., Augustyns, K., Lambeir, A.-M., Neubauer, P., and Wierenga, R.K. (2006). Functional role of the conserved active site proline of triosephosphate isomerase. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 15483–15494.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., III, A.G.P., and Skelton, N.J. (1995). *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice* (Academic Press).
- Chambers, J.W., Maguire, T.G., and Alwine, J.C. (2010). Glutamine metabolism is essential for human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* *84*, 1867–1873.
- Chan, T.M., Lok, A.S., Cheng, I.K., and Chan, R.T. (1993). Prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: a longitudinal study comparing the results of RNA and antibody assays. *Hepatol. Baltim. Md* *17*, 5–8.
- Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z., and Luo, G. (2007). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J. Virol.* *81*, 13783–13793.
- de Chasse, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M.S., Aublin-Gex, A., Agaagué, S., Meiffren, G., Pradezynski, F., Faria, B.F., Chantier, T., et al. (2008). Hepatitis C virus infection protein network. *Mol. Syst. Biol.* *4*.
- Chatterji, U., Bobardt, M., Selvarajah, S., Yang, F., Tang, H., Sakamoto, N., Vuagniaux, G., Parkinson, T., and Galloway, P. (2009). The Isomerase Active Site of Cyclophilin A Is Critical for Hepatitis C Virus Replication. *J. Biol. Chem.* *284*, 16998–17005.
- Chatterji, U., Garcia-Rivera, J.A., Baugh, J., Gawlik, K., Wong, K.A., Zhong, W., Brass, C.A., Naoumov, N.V., and Galloway, P.A. (2014). The Combination of Alisporivir plus an NS5A Inhibitor Provides Additive to Synergistic Anti-Hepatitis C Virus Activity without Detectable Cross-Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 3327–3334.
- Chatterji, U., Bobardt, M., Tai, A., Wood, M., and Galloway, P.A. (2015). Cyclophilin and NS5A Inhibitors, but Not Other Anti-Hepatitis C Virus (HCV) Agents, Preclude HCV-Mediated Formation of Double-Membrane-Vesicle Viral Factories. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 2496–2507.
- Chen, S.L., and Morgan, T.R. (2006). The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int. J. Med. Sci.* *3*, 47–52.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2010a). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 12–21.

- Chen, Y.-C., Su, W.-C., Huang, J.-Y., Chao, T.-C., Jeng, K.-S., Machida, K., and Lai, M.M.C. (2010b). Polo-Like Kinase 1 Is Involved in Hepatitis C Virus Replication by Hyperphosphorylating NS5A. *J. Virol.* **84**, 7983–7993.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362.
- Chung, H.-Y., Gu, M., Buehler, E., MacDonald, M.R., and Rice, C.M. (2014). Seed Sequence-Matched Controls Reveal Limitations of Small Interfering RNA Knockdown in Functional and Structural Studies of Hepatitis C Virus NS5A-MOBKL1B Interaction. *J. Virol.* **88**, 11022–11033.
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F., and Dubuisson, J. (2000). Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J. Virol.* **74**, 3623–3633.
- Coelmont, L., Kaptein, S., Paeshuyse, J., Vliegen, I., Dumont, J.-M., Vuagniaux, G., and Neyts, J. (2009). Debio 025, a Cyclophilin Binding Molecule, Is Highly Efficient in Clearing Hepatitis C Virus (HCV) Replicon-Containing Cells When Used Alone or in Combination with Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV (STAT-C) Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 967–976.
- Coelmont, L., Hanouille, X., Chatterji, U., Berger, C., Snoeck, J., Bobardt, M., Lim, P., Vliegen, I., Paeshuyse, J., and Vuagniaux, G. (2010). DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One* **5**, e13687.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763.
- Copeland, R.A., Pompliano, D.L., and Meek, T.D. (2006). Drug–target residence time and its implications for lead optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 730–739.
- Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **13**, 289–302.
- Crowley, P.B., Kyne, C., and Monteith, W.B. (2012). Simple and inexpensive incorporation of 19F-Tryptophan for protein NMR spectroscopy. *Chem. Commun.* **48**, 10681.
- Curtis-Marof, R., Doko, D., Rowe, M.L., Richards, K.L., Williamson, R.A., and Howard, M.J. (2014). 19F NMR spectroscopy monitors ligand binding to recombinantly fluorine-labelled b'x from human protein disulphide isomerase (hPDI). *Org. Biomol. Chem.* **12**, 3808.
- Delgado, T., Carroll, P.A., Punjabi, A.S., Margineantu, D., Hockenbery, D.M., and Lagunoff, M. (2010). Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is required for the maintenance of latently infected endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 10696–10701.
- Demarest, S.J., Zhou, S.-Q., Robblee, J., Fairman, R., Chu, B., and Raleigh, D.P. (2001). A Comparative Study of Peptide Models of the α -Domain of α -Lactalbumin, Lysozyme, and α -Lactalbumin/Lysozyme Chimeras Allows the Elucidation of Critical Factors That Contribute to the Ability to Form Stable Partially Folded States [†]. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 2138–2147.
- Diamond, D.L., Syder, A.J., Jacobs, J.M., Sorensen, C.M., Walters, K.-A., Proll, S.C., McDermott, J.E., Gritsenko, M.A., Zhang, Q., Zhao, R., et al. (2010). Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog.* **6**, e1000719.
- Didenko, T., Liu, J.J., Horst, R., Stevens, R.C., and Wüthrich, K. (2013). Fluorine-19 NMR of integral membrane proteins illustrated with studies of GPCRs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 740–747.
- Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M.P., and Schuster, C. (2003). Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* **77**, 5401–5414.
- Disfani, F.M., Hsu, W.-L., Mizianty, M.J., Oldfield, C.J., Xue, B., Dunker, A.K., Uversky, V.N., and Kurgan, L. (2012). MoRFpred, a computational tool for sequence-based prediction and characterization of short disorder-to-order transitioning binding regions in proteins. *Bioinformatics* **28**, i75–i83.
- Domingo, E. (1998). Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin. Diagn. Virol.* **10**, 97–101.

- Dorner, M., and Ploss, A. (2011). Deconstructing hepatitis C virus infection in humanized mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1245, 59–62.
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* 21, 3433–3434.
- Doyle, J.S., Aspinall, E., Liew, D., Thompson, A.J., and Hellard, M.E. (2013). Current and emerging antiviral treatments for hepatitis C infection. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 931–943.
- Drummer, H.E., Maerz, A., and Pountourios, P. (2003). Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett.* 546, 385–390.
- Dubuisson, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol.* 12, 517–523.
- Dunker, A.K., Oldfield, C.J., Meng, J., Romero, P., Yang, J.Y., Chen, J., Vacic, V., Obradovic, Z., and Uversky, V.N. (2008). The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* 9, S1.
- Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 197–208.
- Eckert, B., Martin, A., Balbach, J., and Schmid, F.X. (2005). Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 619–623.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* 76, 5974–5984.
- Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M., and Glenn, J.S. (2004). An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J. Virol.* 78, 11393–11400.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501.
- Exnowitz, F., Meyer, B., and Hackl, T. (2012). NMR for direct determination of K_m and V_{max} of enzyme reactions based on the Lambert W function-analysis of progress curves. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1824, 443–449.
- Fan, X., Xue, B., Dolan, P.T., LaCount, D.J., Kurgan, L., and Uversky, V.N. (2014). The intrinsic disorder status of the human hepatitis C virus proteome. *Mol. Biosyst.* 10, 1345.
- Farci, P., Munoz, S.J., Shimoda, A., Govindarajan, S., Wong, D.C., Coiana, A., Peddis, G., Rubin, R., and Purcell, R.H. (1999). Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J. Infect. Dis.* 179, 1007–1011.
- Farrow, N.A., Zhang, O., Forman-Kay, J.D., and Kay, L.E. (1994). A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of ^{15}N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium. *J. Biomol. NMR* 4, 727–734.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., Holland, P.V., and Zuckerman, R. by A.J. (2001). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B†. *Rev. Med. Virol.* 11, 3–9.
- Fernandes, F., Poole, D.S., Hoover, S., Middleton, R., Andrei, A.-C., Gerstner, J., and Striker, R. (2007). Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B. *Hepatology* 46, 1026–1033.
- Fernandes, F., Ansari, I.H., and Striker, R. (2010). Cyclosporine Inhibits a Direct Interaction between Cyclophilins and Hepatitis C NS5A. *PLoS ONE* 5, e9815.
- Ferrari, E., He, Z., Palermo, R.E., and Huang, H.-C. (2008). Hepatitis C virus NS5B polymerase exhibits distinct nucleotide requirements for initiation and elongation. *J. Biol. Chem.* 283, 33893–33901.
- Ferreon, A.C.M., Ferreon, J.C., Wright, P.E., and Deniz, A.A. (2013). Modulation of allostery by protein intrinsic disorder. *Nature* 498, 390–394.

- Feuerstein, S., Solyom, Z., Aladag, A., Favier, A., Schwarten, M., Hoffmann, S., Willbold, D., and Brutscher, B. (2012). Transient Structure and SH3 Interaction Sites in an Intrinsically Disordered Fragment of the Hepatitis C Virus Protein NS5A. *J. Mol. Biol.* *420*, 310–323.
- Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984). [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed. Biochim. Acta* *43*, 1101–1111.
- Fischer, G., Tradler, T., and Zarnt, T. (1998). The mode of action of peptidyl prolyl cis/trans isomerases in vivo: binding vs. catalysis. *FEBS Lett.* *426*, 17–20.
- Fisher, C.K., and Stultz, C.M. (2011). Constructing ensembles for intrinsically disordered proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *21*, 426–431.
- Flisiak, R., Horban, A., Gallay, P., Bobardt, M., Selvarajah, S., Wiercinska-Drapalo, A., Siwak, E., Cielniak, I., Higersberger, J., Kierkus, J., et al. (2008). The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatol. Baltim. Md* *47*, 817–826.
- Flisiak, R., Feinman, S.V., Jablkowski, M., Horban, A., Kryczka, W., Pawlowska, M., Heathcote, J.E., Mazzella, G., Vandelli, C., Nicolas-Métral, V., et al. (2009). The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. *Hepatol. Baltim. Md* *49*, 1460–1468.
- Fontaine, K.A., Camarda, R., and Lagunoff, M. (2014). Vaccinia virus requires glutamine but not glucose for efficient replication. *J. Virol.* *88*, 4366–4374.
- Fontaine, K.A., Sanchez, E.L., Camarda, R., and Lagunoff, M. (2015). Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication. *J. Virol.* *89*, 2358–2366.
- Forns, X., Payette, P.J., Ma, X., Satterfield, W., Eder, G., Mushahwar, I.K., Govindarajan, S., Davis, H.L., Emerson, S.U., Purcell, R.H., et al. (2000). Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatol. Baltim. Md* *32*, 618–625.
- Frank, C., Mohamed, M.K., Strickland, G.T., Lavanchy, D., Arthur, R.R., Magder, L.S., Khoby, T.E., Abdel-Wahab, Y., Ohn, E.S.A., Anwar, W., et al. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *The Lancet* *355*, 887–891.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* *75*, 12047–12057.
- Friedman, J., and Weissman, I. (1991). Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: One in the presence and one in the absence of CsA. *Cell* *66*, 799–806.
- Fruman, D.A., Klee, C.B., Bierer, B.E., and Burakoff, S.J. (1992). Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 3686–3690.
- Fuxreiter, M., Simon, I., Friedrich, P., and Tompa, P. (2004). Preformed Structural Elements Feature in Partner Recognition by Intrinsically Unstructured Proteins. *J. Mol. Biol.* *338*, 1015–1026.
- Fuxreiter, M., Tompa, P., and Simon, I. (2007). Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics* *23*, 950–956.
- Galat, A. (1999). Variations of Sequences and Amino Acid Compositions of Proteins That Sustain Their Biological Functions: An Analysis of the Cyclophilin Family of Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* *371*, 149–162.
- Gamble, T.R., Vajdos, F.F., Yoo, S., Worthylake, D.K., Houseweart, M., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (1996). Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* *87*, 1285–1294.
- Gao, M., Nettles, R.E., Belema, M., Snyder, L.B., Nguyen, V.N., Fridell, R.A., Serrano-Wu, M.H., Langley, D.R., Sun, J.-H., O'Boyle II, D.R., et al. (2010). Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* *465*, 96–100.
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., and Olson, W.C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 4498–4503.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* *82*, 2120–2129.

- Ghayathri, V.R., Vinodhini, C., Gayatri, S., and Chitra, K. (2014). DRUG PROFILE OF SOFOSBUVIR-A NUCLEOTIDE ANALOG INHIBITOR OF THE HEPATITIS C VIRUS POLYMERASE.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J. Virol.* *77*, 5487–5492.
- Goto, K., Watashi, K., Inoue, D., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2009). Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Sci.* *100*, 1943–1950.
- Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruysschaert, J.-M., Diesis, E., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2009a). Identification of a Novel Determinant for Membrane Association in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *J. Virol.* *83*, 6257–6268.
- Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F., and Moradpour, D. (2009b). An Amphipathic α -Helix at the C Terminus of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Mediates Membrane Association. *J. Virol.* *83*, 11378–11384.
- Grebely, J., and Tyndall, M.W. (2011). Management of HCV and HIV infections among people who inject drugs. *Curr. Opin. HIV AIDS* *6*, 501–507.
- Grisé, H., Frausto, S., Logan, T., and Tang, H. (2012). A conserved tandem cyclophilin-binding site in hepatitis C virus nonstructural protein 5A regulates alisporivir susceptibility. *J. Virol.* *86*, 4811–4822.
- Grossbard, L., and Schimke, R.T. (1966). Multiple Hexokinases of Rat Tissues PURIFICATION AND COMPARISON OF SOLUBLE FORMS. *J. Biol. Chem.* *241*, 3546–3560.
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., and Dore, G.J. (2013). Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 553–562.
- Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., and Speicher, D.W. (1984). Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* *226*, 544–547.
- Hanoulle, X., Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszkeski, J.M., Penin, F., and Lippens, G. (2009a). Domain 3 of non-structural protein 5A from hepatitis C virus is natively unfolded. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *381*, 634–638.
- Hanoulle, X., Badillo, A., Wieruszkeski, J.M., Verdegem, D., Landrieu, I., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lippens, G. (2009b). Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B. *J. Biol. Chem.* *284*, 13589–13601.
- Hanoulle, X., Badillo, A., Verdegem, D., Penin, F., and Lippens, G. (2010). The domain 2 of the HCV NS5A protein is intrinsically unstructured. *Protein Pept. Lett.* *17*, 1012–1018.
- Harding, M.W., Handschumacher, R.E., and Speicher, D.W. (1986). Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* *261*, 8547–8555.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* *324*, 1029–1033.
- Holt, C., Wahlgren, N., and Drakenberg, T. (1996). Ability of a beta-casein phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters. *Biochem J* *314*, 1035–1039.
- Honda, A., Arai, Y., Hirota, N., Sato, T., Ikegaki, J., Koizumi, T., Hatano, M., Kohara, M., Moriyama, T., Imawari, M., et al. (1999). Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *J. Med. Virol.* *59*, 281–289.
- Honda, A., Hatano, M., Kohara, M., Arai, Y., Hartatik, T., Moriyama, T., Imawari, M., Koike, K., Yokosuka, O., Shimotohno, K., et al. (2000). HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J. Hepatol.* *33*, 440–447.
- Hong, Z., Cameron, C.E., Walker, M.P., Castro, C., Yao, N., Lau, J.Y.N., and Zhong, W. (2001). A Novel Mechanism to Ensure Terminal Initiation by Hepatitis C Virus NS5B Polymerase. *Virology* *285*, 6–11.
- Hopkins, S., and Gallay, P. (2012). Cyclophilin Inhibitors: An Emerging Class of Therapeutics for the Treatment of Chronic Hepatitis C Infection. *Viruses* *4*, 2558–2577.

- Hopkins, S., Bobardt, M., Chatterji, U., Garcia-Rivera, J.A., Lim, P., and Gallay, P.A. (2012). The Cyclophilin Inhibitor SCY-635 Disrupts Hepatitis C Virus NS5A-Cyclophilin A Complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 3888–3897.
- Horst, R., Liu, J.J., Stevens, R.C., and Wüthrich, K. (2013). β_2 -Adrenergic Receptor Activation by Agonists Studied with ^{19}F NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* *52*, 10762–10765.
- Houben, K., Marion, D., Tarbouriech, N., Ruigrok, R.W.H., and Blanchard, L. (2007). Interaction of the C-Terminal Domains of Sendai Virus N and P Proteins: Comparison of Polymerase-Nucleocapsid Interactions within the Paramyxovirus Family. *J. Virol.* *81*, 6807–6816.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7271–7276.
- Huai, Q., Kim, H.-Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J.O., and Ke, H. (2002). Crystal structure of calcineurin–cyclophilin–cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 12037–12042.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., and Ye, J. (2007a). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 5848–5853.
- Huang, Y., Staschke, K., De Francesco, R., and Tan, S.-L. (2007b). Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* *364*, 1–9.
- Hwang, J., Huang, L., Cordek, D.G., Vaughan, R., Reynolds, S.L., Kihara, G., Raney, K.D., Kao, C.C., and Cameron, C.E. (2010). Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A: Biochemical Characterization of a Novel Structural Class of RNA-Binding Proteins. *J. Virol.* *84*, 12480–12491.
- Iakoucheva, L.M. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1037–1049.
- Icard, V., Diaz, O., Scholtes, C., Perrin-Cocon, L., Ramière, C., Bartenschlager, R., Penin, F., Lotteau, V., and André, P. (2009). Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One* *4*, e4233.
- Ide, Y., Zhang, L., Chen, M., Inchauspe, G., Bahl, C., Sasaguri, Y., and Padmanabhan, R. (1996). Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* *182*, 203–211.
- Indolfi, G., and Resti, M. (2009). Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J. Med. Virol.* *81*, 836–843.
- Inoue, K., Umehara, T., Ruegg, U.T., Yasui, F., Watanabe, T., Yasuda, H., Dumont, J.-M., Scalfaro, P., Yoshida, M., and Kohara, M. (2007). Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo. *Hepatology* *45*, 921–928.
- Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., et al. (2011). Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* *364*, 2405–2416.
- Jensen, M.R., Houben, K., Lescop, E., Blanchard, L., Ruigrok, R.W.H., and Blackledge, M. (2008). Quantitative conformational analysis of partially folded proteins from residual dipolar couplings: application to the molecular recognition element of Sendai virus nucleoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 8055–8061.
- Jensen, M.R., Salmon, L., Nodet, G., and Blackledge, M. (2010). Defining Conformational Ensembles of Intrinsically Disordered and Partially Folded Proteins Directly from Chemical Shifts. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 1270–1272.
- Jiang, J., and Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J. Virol.* *83*, 12680–12691.
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010). Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog.* *6*, e1001233.
- Jones, D.T., and Ward, J.J. (2003). Prediction of disordered regions in proteins from position specific score matrices. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *53*, 573–578.

- Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J., and Rice, C.M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol.* **81**, 8374–8383.
- Joosten, R.P., Long, F., Murshudov, G.N., and Perrakis, A. (2014). The *PDB_REDO* server for macromolecular structure model optimization. *IUCr J* **1**, 213–220.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800.
- Kallen, J., Mikol, V., Taylor, P., and D Walkinshaw, M. (1998). X-ray structures and analysis of 11 cyclosporin derivatives complexed with cyclophilin A. *J. Mol. Biol.* **283**, 435–449.
- Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J., and Nagata, Y. (2004). Structural Basis for Allosteric Regulation of the Monomeric Allosteric Enzyme Human Glucokinase. *Structure* **12**, 429–438.
- Kapadia, S.B., and Chisari, F.V. (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2561–2566.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Scheel, T.K.H., Hjelle, B., Cullen, J.M., Burbelo, P.D., Chauhan, L.V., Duraisamy, R., Sanchez Leon, M., Jain, K., et al. (2013). Identification of Rodent Homologs of Hepatitis C Virus and Pegiviruses. *mBio* **4**, e00216–13 – e00216–13.
- Karplus, M. (1959). Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J. Chem. Phys.* **30**, 11–15.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., and Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.* **64**, 334–339.
- Katzen, H.M. (1967). The multiple forms of mammalian hexokinase and their significance to the action of insulin. *Adv. Enzyme Regul.* **5**, 335–336.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., and Rice, C.M. (2009). Essential Role of Cyclophilin A for Hepatitis C Virus Replication and Virus Production and.
- Ke, H., Mayrose, D., and Cao, W. (1993). Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 3324–3328.
- Ke, H.M., Zydowsky, L.D., Liu, J., and Walsh, C.T. (1991). Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 9483–9487.
- Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H., and Phillips, D.C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**, 662–666.
- Kim, J., Lee, D., and Choe, J. (1999). Hepatitis C Virus NS5A Protein Is Phosphorylated by Casein Kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 777–781.
- Kleckner, I.R., and Foster, M.P. (2011). An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1814**, 942–968.
- Ko, M.S.H. (1991). A stochastic model for gene induction. *J. Theor. Biol.* **153**, 181–194.
- Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* **70**, 3363–3371.
- Koshland Jr, D.E. (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 98.
- Kowdley, K.V., Gordon, S.C., Reddy, K.R., Rossaro, L., Bernstein, D.E., Lawitz, E., Shiffman, M.L., Schiff, E., Ghalib, R., Ryan, M., et al. (2014). Ledipasvir and Sofosbuvir for 8 or 12 Weeks for Chronic HCV without Cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1879–1888.
- Krzeminski, M., Marsh, J.A., Neale, C., Choy, W.-Y., and Forman-Kay, J.D. (2013a). Characterization of disordered proteins with ENSEMBLE. *Bioinformatics* **29**, 398–399.
- Krzeminski, M., Marsh, J.A., Neale, C., Choy, W.-Y., and Forman-Kay, J.D. (2013b). Characterization of disordered proteins with ENSEMBLE. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **29**, 398–399.

- Kumada, H., Suzuki, Y., Ikeda, K., Toyota, J., Karino, Y., Chayama, K., Kawakami, Y., Ido, A., Yamamoto, K., Takaguchi, K., et al. (2014). Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology* *59*, 2083–2091.
- Kursula, I., Salin, M., Sun, J., Norledge, B.V., Haapalainen, A.M., Sampson, N.S., and Wierenga, R.K. (2004). Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Protein Eng. Des. Sel.* *17*, 375–382.
- Kwofie, S.K., Schaefer, U., Sundararajan, V.S., Bajic, V.B., and Christoffels, A. (2011). HCVpro: Hepatitis C virus protein interaction database. *Infect. Genet. Evol.* *11*, 1971–1977.
- Lambert, S.M., Langley, D.R., Garnett, J.A., Angell, R., Hedgethorpe, K., Meanwell, N.A., and Matthews, S.J. (2014). The crystal structure of NS5A domain 1 from genotype 1a reveals new clues to the mechanism of action for dimeric HCV inhibitors. *Protein Sci.* *23*, 723–734.
- Lamed, R., Kenig, R., Morag, E., Yaron, S., Shoham, Y., and Bayer, E.A. (2001). Nonproteolytic cleavage of aspartyl proline bonds in the cellulosomal scaffoldin subunit from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *90*, 67–73.
- Landrieu, I., Hanouille, X., Bonachera, F., Hamel, A., Sibille, N., Yin, Y., Wieruszkeski, J.-M., Horvath, D., Wei, Q., Vuagniaux, G., et al. (2010). Structural Basis for the Non-Immunosuppressive Character of the Cyclosporin A Analogue Debio 025. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 4679–4686.
- Landrieu, I., Hanouille, X., Fritzinger, B., Horvath, D., Wieruszkeski, J.-M., and Lippens, G. (2011). Ranking High Affinity Ligands of Low Solubility by NMR Spectroscopy. *ACS Med. Chem. Lett.* *2*, 485–487.
- Larion, M., Salinas, R.K., Bruschweiler-Li, L., Miller, B.G., and Brüschweiler, R. (2012). Order–Disorder Transitions Govern Kinetic Cooperativity and Allostery of Monomeric Human Glucokinase. *PLoS Biol.* *10*, e1001452.
- Launay, H., Parent, B., Page, A., Hanouille, X., and Lippens, G. (2013). Dissociation kinetics of a binary complex in solution by protein displacement. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *52*, 12587–12591.
- Lavanchy, D. (2009). The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* *29*, 74–81.
- Lavanchy, D. (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin. Microbiol. Infect.* *17*, 107–115.
- Lebedev, A.A., Young, P., Isupov, M.N., Moroz, O.V., Vagin, A.A., and Murshudov, G.N. (2012). *JLigand*: a graphical tool for the CCP 4 template-restraint library. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *68*, 431–440.
- Lee, M.-H., Yang, H.-I., Yuan, Y., L'Italien, G., and Chen, C.-J. (2014). Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol. WJG* *20*, 9270–9280.
- Lee, S.-H., Kim, D.-H., Han, J.J., Cha, E.-J., Lim, J.-E., Cho, Y.-J., Lee, C., and Han, K.-H. (2012). Understanding pre-structured motifs (PreSMos) in intrinsically unfolded proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* *13*, 34–54.
- Lenz, O., Vijgen, L., Berke, J.M., Cummings, M.D., Fevery, B., Peeters, M., Smedt, G.D., Moreno, C., and Picchio, G. (2013). Virologic response and characterisation of HCV genotype 2–6 in patients receiving TMC435 monotherapy (study TMC435-C202). *J. Hepatol.* *58*, 445–451.
- Lerat, H., Honda, M., Beard, M.R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.-Y., Weinman, S.A., et al. (2002). Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* *122*, 352–365.
- Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., and Weber, P.C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat. Struct. Biol.* *6*, 937–943.
- Lescar, J., and Canard, B. (2009). RNA-dependent RNA polymerases from flaviviruses and Picornaviridae. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 759–767.
- Li, null, Romero, null, Rani, null, Dunker, null, and Obradovic, null (1999). Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions. *Genome Inform. Workshop Genome Inform.* *10*, 30–40.
- Li, X., Obradovic, Z., Brown, C.J., Garner, E.C., and Dunker, A.K. (2000). Comparing predictors of disordered protein. *Genome Inform. Workshop Genome Inform.* *11*, 172–184.

- Liang, Y., Ye, H., Kang, C.B., and Yoon, H.S. (2007). Domain 2 of Nonstructural Protein 5A (NS5A) of Hepatitis C Virus Is Natively Unfolded[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 11550–11558.
- Lim, P.J., and Gallay, P.A. (2014). Hepatitis C NS5A protein: two drug targets within the same protein with different mechanisms of resistance. *Curr. Opin. Virol.* **8**, 30–37.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., et al. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623–626.
- Liou, T.C., Chang, T.T., Young, K.C., Lin, X.Z., Lin, C.Y., and Wu, H.L. (1992). Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J. Med. Virol.* **37**, 197–202.
- Liu, J., Farmer Jr., J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807–815.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., and Wang, T. (2009a). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* **83**, 2011–2014.
- Liu, Z., Robida, J.M., Chinnaswamy, S., Yi, G., Robotham, J.M., Nelson, H.B., Irsigler, A., Kao, C.C., and Tang, H. (2009b). Mutations in the hepatitis C virus polymerase that increase RNA binding can confer resistance to cyclosporine A. *Hepatology* **50**, 25–33.
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U., and Bartenschlager, R. (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* **71**, 8416–8428.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110–113.
- Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., and Rice, C.M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831–835.
- Lorho, R., Turlin, B., de Lajarte-Thirouard, A.S., Camus, C., Lakehal, M., Compagnon, P., Meunier, B., Boudjema, K., and Messner, M. (2005). Improved liver function and decreased hepatitis C viral load after tacrolimus was replaced by cyclosporine. *Transplant. Proc.* **37**, 2871–2872.
- Love, R.A., Brodsky, O., Hickey, M.J., Wells, P.A., and Cronin, C.N. (2009). Crystal Structure of a Novel Dimeric Form of NS5A Domain I Protein from Hepatitis C Virus. *J. Virol.* **83**, 4395–4403.
- Luna-Vargas, M.P.A., Christodoulou, E., Alfieri, A., van Dijk, W.J., Stadnik, M., Hibbert, R.G., Sahtoe, D.D., Clerici, M., Marco, V.D., Littler, D., et al. (2011). Enabling high-throughput ligation-independent cloning and protein expression for the family of ubiquitin specific proteases. *J. Struct. Biol.* **175**, 113–119.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* **17**, 589–595.
- Ma, S., Boerner, J.E., TiongYip, C., Weidmann, B., Ryder, N.S., Cooreman, M.P., and Lin, K. (2006). NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis C virus alone or in combination with alpha interferon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2976–2982.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J.M., Shanmugam, S., Singh, S.M., Lemon, S.M., and Yi, M. (2011). Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with both Structural and Nonstructural Proteins. *J. Virol.* **85**, 86–97.
- Macdonald, A. (2004). Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.* **85**, 2485–2502.
- Marsh, J.A., Singh, V.K., Jia, Z., and Forman-Kay, J.D. (2009). Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between α - and γ -synuclein: Implications for fibrillation. *Protein Sci.* **15**, 2795–2804.
- Martinot-Peignoux, M., Roudot-Thoraval, F., Mendel, I., Coste, J., Izopet, J., Duverlie, G., Payan, C., Pawlotsky, J.M., Defer, C., Bogard, M., et al. (1999). Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *J. Viral Hepat.* **6**, 435–443.

- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., et al. (2008). Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. *J. Virol.* *82*, 7964–7976.
- Masaki, T., Matsunaga, S., Takahashi, H., Nakashima, K., Kimura, Y., Ito, M., Matsuda, M., Murayama, A., Kato, T., Hirano, H., et al. (2014). Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production. *J. Virol.* *88*, 7541–7555.
- Mathy, J.E., Ma, S., Compton, T., and Lin, K. (2008). Combinations of Cyclophilin Inhibitor NIM811 with Hepatitis C Virus NS3-4A Protease or NS5B Polymerase Inhibitors Enhance Antiviral Activity and Suppress the Emergence of Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 3267–3275.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). *Phaser* crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* *40*, 658–674.
- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* *21*, 3980–3988.
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., et al. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* *7*, 927–933.
- Mikol, V., Kallen, J., Pflügl, G., and Walkinshaw, M.D. (1993). X-ray Structure of a Monomeric Cyclophilin A-Cyclosporin A Crystal Complex at 2.1 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* *234*, 1119–1130.
- Mittermaier, A.K., and Kay, L.E. (2009). Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 601–611.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1089–1097.
- Moradpour, D., and Penin, F. (2013). Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*, R. Bartenschlager, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 113–142.
- Moradpour, D., Evans, M.J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H.E., Goff, S.P., Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2004a). Insertion of Green Fluorescent Protein into Nonstructural Protein 5A Allows Direct Visualization of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *J. Virol.* *78*, 7400–7409.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lohmann, V. (2004b). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* *78*, 13278–13284.
- Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 453–463.
- Morikawa, K., Lange, C.M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., and Moradpour, D. (2011). Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* *18*, 305–315.
- Mosley, R.T., Edwards, T.E., Murakami, E., Lam, A.M., Grice, R.L., Du, J., Sofia, M.J., Furman, P.A., and Otto, M.J. (2012). Structure of Hepatitis C Virus Polymerase in Complex with Primer-Template RNA. *J. Virol.* *86*, 6503–6511.
- Munger, J., Bennett, B.D., Parikh, A., Feng, X.-J., McArdle, J., Rabitz, H.A., Shenk, T., and Rabinowitz, J.D. (2008). Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1179–1186.
- Murphy, D.G., Willems, B., Deschênes, M., Hilzenrat, N., Mousseau, R., and Sabbah, S. (2007). Use of Sequence Analysis of the NS5B Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C/E1 and 5' Untranslated Region Sequences. *J. Clin. Microbiol.* *45*, 1102–1112.
- Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., and Vagin, A.A. (2011). *REFMAC 5* for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *67*, 355–367.
- Nakagawa, M., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Kanazawa, N., Koyama, T., Kurosaki, M., Maekawa, S., Yamashiro, T., Chen, C.-H., et al. (2004). Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *313*, 42–47.

- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L., and De Francesco, R. (2004). Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J. Virol.* *78*, 13306–13314.
- Neduva, V., Linding, R., Su-Angrand, I., Stark, A., Masi, F. de, Gibson, T.J., Lewis, J., Serrano, L., and Russell, R.B. (2005). Systematic Discovery of New Recognition Peptides Mediating Protein Interaction Networks. *PLoS Biol* *3*, e405.
- Nettles, J.H., Stanton, R.A., Broyde, J., Amblard, F., Zhang, H., Zhou, L., Shi, J., McBrayer, T.R., Whitaker, T., Coats, S.J., et al. (2014). Asymmetric Binding to NS5A by Daclatasvir (BMS-790052) and Analogs Suggests Two Novel Modes of HCV Inhibition. *J. Med. Chem.* *57*, 10031–10043.
- Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J., and Perelson, A.S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* *282*, 103–107.
- Ogata, N., Alter, H.J., Miller, R.H., and Purcell, R.H. (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 3392–3396.
- Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2006). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.* *25*, 5015–5025.
- Oldfield, C.J., Cheng, Y., Cortese, M.S., Romero, P., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2005). Coupled Folding and Binding with α -Helix-Forming Molecular Recognition Elements†. *Biochemistry (Mosc.)* *44*, 12454–12470.
- Olson, M.C., Gardenier, D., and Jacobson, I.M. (2015). The Revolution of Hepatitis C Treatments: Review for Nurse Practitioners. *J. Nurse Pract.* *11*, 116–123.
- Ottiger, M., and Bax, A. (1998). Determination of Relative N–HN, N–C', C α –C', and C α –H α Effective Bond Lengths in a Protein by NMR in a Dilute Liquid Crystalline Phase. *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 12334–12341.
- Ozenne, V., Bauer, F., Salmon, L., Huang, J. -r., Jensen, M.R., Segard, S., Bernado, P., Charavay, C., and Blackledge, M. (2012). Flexible-meccano: a tool for the generation of explicit ensemble descriptions of intrinsically disordered proteins and their associated experimental observables. *Bioinformatics* *28*, 1463–1470.
- Paeshuyse, J., Kaul, A., De Clercq, E., Rosenwirth, B., Dumont, J.-M., Scalfaro, P., Bartenschlager, R., and Neyts, J. (2006). The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* *43*, 761–770.
- Paintsil, E., He, H., Peters, C., Lindenbach, B.D., and Heimer, R. (2010). Survival of hepatitis C virus in syringes: implication for transmission among injection drug users. *J. Infect. Dis.* *202*, 984–990.
- Paul, D., Romero-Brey, I., Gouttenoire, J., Stoitsova, S., Krijnse-Locker, J., Moradpour, D., and Bartenschlager, R. (2011). NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *J. Virol.* *85*, 6963–6976.
- Pavlović, D., Neville, D.C.A., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., and Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6104–6108.
- Pawlotsky, J.-M. (2006). Therapy of hepatitis C: From empiricism to eradication. *Hepatology* *43*, S207–S220.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J.-M. (2004a). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatol. Baltim. Md* *39*, 5–19.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004b). Structure and Function of the Membrane Anchor Domain of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J. Biol. Chem.* *279*, 40835–40843.
- Petit, P., Antoine, M., Ferry, G., Boutin, J.A., Lagarde, A., Gluais, L., Vincentelli, R., and Vuillard, L. (2011). The active conformation of human glucokinase is not altered by allosteric activators. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *67*, 929–935.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* *282*, 938–941.

- Piszkiewicz, D., Landon, M., and Smith, E.L. (1970). Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *40*, 1173–1178.
- Ploss, A., and Dubuisson, J. (2012). New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* *61*, i25–i35.
- Pol, S., and Corouge, M. (2014). Treatment of hepatitis C: Perspectives. *Médecine Mal. Infect.* *44*, 449–454.
- Polyak, S.J. (2003). Hepatitis C virus–cell interactions and their role in pathogenesis. *Clin. Liver Dis.* *7*, 67–88.
- Polyak, S.J., Khabar, K.S.A., Rezeiq, M., and Gretch, D.R. (2001). Elevated Levels of Interleukin-8 in Serum Are Associated with Hepatitis C Virus Infection and Resistance to Interferon Therapy. *J. Virol.* *75*, 6209–6211.
- Poordad, F., McCone, J., Bacon, B.R., Bruno, S., Manns, M.P., Sulkowski, M.S., Jacobson, I.M., Reddy, K.R., Goodman, Z.D., Boparai, N., et al. (2011). Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *N. Engl. J. Med.* *364*, 1195–1206.
- Popescu, C.-I., and Dubuisson, J. (2010). Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *102*, 63–74.
- Puoti, M., Zonaro, A., Ravaggi, A., Marin, M.G., Castelnovo, F., and Cariani, E. (1992). Hepatitis C virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis C virus infection. *Hepatol. Baltim. Md* *16*, 877–881.
- Pushker, R., Mooney, C., Davey, N.E., Jacqué, J.-M., and Shields, D.C. (2013). Marked Variability in the Extent of Protein Disorder within and between Viral Families. *PLoS ONE* *8*, e60724.
- Ragni, M.V., Ndimbie, O.K., Rice, E.O., Bontempo, F.A., and Nedjar, S. (1993). The presence of hepatitis C virus (HCV) antibody in human immunodeficiency virus-positive hemophilic men undergoing HCV “seroreversion.” *Blood* *82*, 1010–1015.
- Ramiere, C., Rodriguez, J., Enache, L.S., Lotteau, V., Andre, P., and Diaz, O. (2014). Activity of Hexokinase Is Increased by Its Interaction with Hepatitis C Virus Protein NS5A. *J. Virol.* *88*, 3246–3254.
- Ramière, C., Rodriguez, J., Enache, L.S., Lotteau, V., André, P., and Diaz, O. (2014). Activity of hexokinase is increased by its interaction with hepatitis C virus protein NS5A. *J. Virol.* *88*, 3246–3254.
- Raney, K.D., Sharma, S.D., Moustafa, I.M., and Cameron, C.E. (2010). Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *J. Biol. Chem.* *285*, 22725–22731.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., et al. (2011). Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Hepatitis C Virus NS5A Is Essential for Integrity of the Membranous Replication Compartment. *Cell Host Microbe* *9*, 32–45.
- Richter, T., and Berger, S. (2013). A NMR method to determine the anomeric specificity of glucose phosphorylation. *Bioorg. Med. Chem.* *21*, 2710–2714.
- Ripoli, M., Aprile, A. D', Quarato, G., Sarasin-Filipowicz, M., Gouttenoire, J., Scrima, R., Cela, O., Boffoli, D., Heim, M.H., Moradpour, D., et al. (2010). Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation. *J. Virol.* *84*, 647–660.
- Robida, J.M., Nelson, H.B., Liu, Z., and Tang, H. (2007). Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro. *J. Virol.* *81*, 5829–5840.
- Romero, null, Obradovic, null, and Dunker, null (1997). Sequence Data Analysis for Long Disordered Regions Prediction in the Calcineurin Family. *Genome Inform. Workshop Genome Inform.* *8*, 110–124.
- Romero, P., Obradovic, Z., Kissinger, C.R., Villafranca, J.E., Garner, E., Guillot, S., and Dunker, A.K. (1998). Thousands of proteins likely to have long disordered regions. *Pac. Symp. Biocomput. Pac. Symp. Biocomput.* 437–448.
- Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E.C., Brown, C.J., and Dunker, A.K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* *42*, 38–48.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., et al. (2012). Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathog.* *8*, e1003056.

- Rosnoblet, C., Fritzingler, B., Legrand, D., Launay, H., Wieruszkeski, J.-M., Lippens, G., and Hanoulle, X. (2012). Hepatitis C Virus NS5B and Host Cyclophilin A Share a Common Binding Site on NS5A. *J. Biol. Chem.* *287*, 44249–44260.
- Ross-Thriepand, D., and Harris, M. (2014). Insights into the Complexity and Functionality of Hepatitis C Virus NS5A Phosphorylation. *J. Virol.* *88*, 1421–1432.
- Ross-Thriepand, D., Amako, Y., and Harris, M. (2013). The C terminus of NS5A domain II is a key determinant of hepatitis C virus genome replication, but is not required for virion assembly and release. *J. Gen. Virol.* *94*, 1009–1018.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A.H., Maertens, G., et al. (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J. Virol.* *80*, 2832–2841.
- Rozovsky, S., Jogl, G., Tong, L., and McDermott, A.E. (2001). Solution-state NMR investigations of triosephosphate isomerase active site loop motion: ligand release in relation to active site loop dynamics. *J. Mol. Biol.* *310*, 271–280.
- Rückert, M., and Otting, G. (2000). Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments. *J. Am. Chem. Soc.* *122*, 7793–7797.
- Ruschak, A.M., and Kay, L.E. (2012). PNAS Plus: Proteasome allostery as a population shift between interchanging conformers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, E3454–E3462.
- Ryffel, B. (1993). Cyclosporin binding proteins: Identification, distribution, function and relation to FK binding proteins. *Biochem. Pharmacol.* *46*, 1–12.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11646–11651.
- Salonen, A., Ahola, T., and Kääriäinen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *285*, 139–173.
- Santantonio, T., Wiegand, J., and Tilman Gerlach, J. (2008). Acute hepatitis C: Current status and remaining challenges. *J. Hepatol.* *49*, 625–633.
- Sarrazin, C., Hézode, C., Zeuzem, S., and Pawlotsky, J.-M. (2012). Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* *56*, *Supplement 1*, S88–S100.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* *21*, 5017–5025.
- Schmitt, M., Scrima, N., Radujkovic, D., Caillet-Saguy, C., Simister, P.C., Friebe, P., Wicht, O., Klein, R., Bartenschlager, R., Lohmann, V., et al. (2011). A comprehensive structure-function comparison of hepatitis C virus strain JFH1 and J6 polymerases reveals a key residue stimulating replication in cell culture across genotypes. *J. Virol.* *85*, 2565–2581.
- Schneider, R., Huang, J., Yao, M., Communie, G., Ozenne, V., Mollica, L., Salmon, L., Ringkjøbing Jensen, M., and Blackledge, M. (2012). Towards a robust description of intrinsic protein disorder using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mol BioSyst* *8*, 58–68.
- Schneider, R., Maurin, D., Communie, G., Kragelj, J., Hansen, D.F., Ruigrok, R.W.H., Jensen, M.R., and Blackledge, M. (2015). Visualizing the Molecular Recognition Trajectory of an Intrinsically Disordered Protein Using Multinuclear Relaxation Dispersion NMR. *J. Am. Chem. Soc.* *137*, 1220–1229.
- Schnell, S., and Mendoza, C. (1997). Closed form solution for time-dependent enzyme kinetics. *J. Theor. Biol.* *187*, 207–212.
- Schreiber, S.L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* *251*, 283–287.
- Schubert, M., Labudde, D., Oschkinat, H., and Schmieider, P. (2002). A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ¹³C chemical shift statistics. *J. Biomol. NMR* *24*, 149–154.

- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., and Bartenschlager, R. (2007). The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J. Biol. Chem.* **282**, 37158–37169.
- Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., and Bax, A. (2009). TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR* **44**, 213–223.
- Shortle, D., and Ackerman, M.S. (2001). Persistence of Native-Like Topology in a Denatured Protein in 8 M Urea. *Science* **293**, 487–489.
- Sickmeier, M., Hamilton, J.A., LeGall, T., Vacic, V., Cortese, M.S., Tantos, A., Szabo, B., Tompa, P., Chen, J., Uversky, V.N., et al. (2007). DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, D786–D793.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., et al. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 962–973.
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., and Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **59**, 318–327.
- Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., and Kocher, H.P. (1991). A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* **266**, 10735–10738.
- Stapleton, J.T., Fong, S., Muerhoff, A.S., Bukh, J., and Simmonds, P. (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **92**, 233–246.
- Starzl, T.E., Klintmalm, G.B.G., Porter, K.A., Iwatsuki, S., and Schröter, G.P.J. (1981). LIVER TRANSPLANTATION WITH USE OF CYCLOSPORIN A AND PREDNISONE. *N. Engl. J. Med.* **305**, 266–269.
- Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* **2**, 2078–2095.
- Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2013). Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*, R. Bartenschlager, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 17–48.
- Tai, A.W., Benita, Y., Peng, L.F., Kim, S.-S., Sakamoto, N., Xavier, R.J., and Chung, R.T. (2009). A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication. *Cell Host Microbe* **5**, 298–307.
- Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473–475.
- Tamiola, K., Acar, B., and Mulder, F.A. (2010). Sequence-specific random coil chemical shifts of intrinsically disordered proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18000–18003.
- Tang, H. (2010). Cyclophilin inhibitors as a novel HCV therapy. *Viruses* **2**, 1621–1634.
- Tedesco, D., and Haragsim, L. (2012). Cyclosporine: A Review. *J. Transplant.* **2012**, e230386.
- Tellinghuisen, T.L., and Rice, C.M. (2002). Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 419–427.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (2004). The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein. *J. Biol. Chem.* **279**, 48576–48587.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**, 374–379.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., Treadaway, J.C., and Rice, C.M. (2007). Identification of Residues Required for RNA Replication in Domains II and III of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *J. Virol.* **82**, 1073–1083.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008). Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathog* **4**, e1000032.

- Terry, L.J., Vastag, L., Rabinowitz, J.D., and Shenk, T. (2012). Human kinome profiling identifies a requirement for AMP-activated protein kinase during human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3071–3076.
- Tews, B.A., Popescu, C.-I., and Dubuisson, J. (2010). Last stop before exit - hepatitis C assembly and release as antiviral drug targets. *Viruses* *2*, 1782–1803.
- Thai, M., Graham, N.A., Braas, D., Nehil, M., Komisopoulou, E., Kurdistan, S.K., McCormick, F., Graeber, T.G., and Christofk, H.R. (2014). Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication. *Cell Metab.* *19*, 694–701.
- Thompson, A.A., Zou, A., Yan, J., Duggal, R., Hao, W., Molina, D., Cronin, C.N., and Wells, P.A. (2009). Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 906–916.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4673–4680.
- Tokunaga, Y., Takeuchi, K., Takahashi, H., and Shimada, I. (2014). Allosteric enhancement of MAP kinase p38 α 's activity and substrate selectivity by docking interactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 704–711.
- Tokuriki, N., Oldfield, C.J., Uversky, V.N., Berezovsky, I.N., and Tawfik, D.S. (2009). Do viral proteins possess unique biophysical features? *Trends Biochem. Sci.* *34*, 53–59.
- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 527–533.
- Tompa, P. (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* *18*, 1169–1175.
- Tompa, P. (2005). The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett.* *579*, 3346–3354.
- Tompa, P., and Fuxreiter, M. (2008). Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein–protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 2–8.
- Tsai, H.J., and Wilson, J.E. (1996). Functional organization of mammalian hexokinases: both N- and C-terminal halves of the rat type II isozyme possess catalytic sites. *Arch. Biochem. Biophys.* *329*, 17–23.
- Tzeng, S.R., and Kalodimos, C.G. (2012). Protein activity regulation by conformational entropy. *Nature* *488*, 236–240.
- Uversky, V.N., Oldfield, C.J., and Dunker, A.K. (2008). Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D² Concept. *Annu. Rev. Biophys.* *37*, 215–246.
- Vajdos, F.F., Yoo, S., Houseweart, M., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2008). Crystal structure of cyclophilin A complexed with a binding site peptide from the HIV-1 capsid protein. *Protein Sci.* *6*, 2297–2307.
- Vastag, L., Koyuncu, E., Grady, S.L., Shenk, T.E., and Rabinowitz, J.D. (2011). Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathog.* *7*, e1002124.
- Vausselin, T., Calland, N., Belouzard, S., Descamps, V., Douam, F., Helle, F., François, C., Lavillette, D., Duverlie, G., Wahid, A., et al. (2013). The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus. *Hepatol. Baltim. Md* *58*, 86–97.
- Vercauteren, K., de Jong, Y.P., and Meuleman, P. (2014). HCV animal models and liver disease. *J. Hepatol.* *61*, S26–S33.
- Verdegem, D., Dijkstra, K., Hanouille, X., and Lippens, G. (2008). Graphical interpretation of Boolean operators for protein NMR assignments. *J. Biomol. NMR* *42*, 11–21.
- Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszkeski, J.M., Landrieu, I., Leroy, A., Bartenschlager, R., Penin, F., Lippens, G., and Hanouille, X. (2011). Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic α -helical propensity and is a substrate of Cyclophilin A. *J. Biol. Chem.* *286*, 20441–20454.
- Volkman, B.F., Lipson, D., Wemmer, D.E., and Kern, D. (2001). Two-State Allosteric Behavior in a Single-Domain Signaling Protein. *Science* *291*, 2429–2433.

- Vuister, G.W., and Bax, A. (1993). Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HNH.alpha.) coupling constants in ¹⁵N-enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *115*, 7772–7777.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* *11*, 791–796.
- Watashi, K., Hijikata, M., Hosaka, M., Yamaji, M., and Shimotohno, K. (2003). Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* *38*, 1282–1288.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., and Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* *19*, 111–122.
- Wells, M., Tidow, H., Rutherford, T.J., Markwick, P., Jensen, M.R., Mylonas, E., Svergun, D.I., Blackledge, M., and Fersht, A.R. (2008). Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 5762–5767.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* *5*, 365–375.
- Wilson, J.E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* *206*, 2049–2057.
- Wishart, D.S., and Sykes, B.D. (1994). The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR* *4*, 171–180.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D., and Richards, F.M. (1991). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* *222*, 311–333.
- Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* *293*, 321–331.
- Wright, P.E., and Dyson, H.J. (2009). Linking folding and binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 31–38.
- Wu, W.-J., and Raleigh, D.P. (1998). Local control of peptide conformation: Stabilization of cis proline peptide bonds by aromatic proline interactions. *Biopolymers* *45*, 381–394.
- Wuthrich, K. (1986). NMR of proteins and nucleic acids. George Fish. Bak. Non-Resid. Lecturesh. Chem. Cornell University USA.
- Xue, B., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2012). Orderly order in protein intrinsic disorder distribution: disorder in 3500 proteomes from viruses and the three domains of life. *J. Biomol. Struct. Dyn.* *30*, 137–149.
- Yamashita, T., Kaneko, S., Shirota, Y., Qin, W., Nomura, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (1998). RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* *273*, 15479–15486.
- Yang, F., Robotham, J.M., Nelson, H.B., Irsigler, A., Kenworthy, R., and Tang, H. (2008). Cyclophilin A Is an Essential Cofactor for Hepatitis C Virus Infection and the Principal Mediator of Cyclosporine Resistance In Vitro. *J. Virol.* *82*, 5269–5278.
- Yang, F., Robotham, J.M., Grise, H., Frausto, S., Madan, V., Zayas, M., Bartenschlager, R., Robinson, M., Greenstein, A.E., and Nag, A. (2010). A major determinant of cyclophilin dependence and cyclosporine susceptibility of hepatitis C virus identified by a genetic approach. *PLoS Pathog.* *6*, e1001118.
- Yao, N., Reichert, P., Taremi, S.S., Prosser, W.W., and Weber, P.C. (1999). Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *7*, 1353–1363.
- Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S.-I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J.R., and Kohara, M. (1998). The Native Form and Maturation Process of Hepatitis C Virus Core Protein. *J. Virol.* *72*, 6048–6055.
- Ye, J. (2007). Reliance of Host Cholesterol Metabolic Pathways for the Life Cycle of Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog* *3*, e108.

- Yi, M., and Lemon, S.M. (2003). 3' Nontranslated RNA Signals Required for Replication of Hepatitis C Virus RNA. *J. Virol.* *77*, 3557–3568.
- Yu, Y., Maguire, T.G., and Alwine, J.C. (2011). Human cytomegalovirus activates glucose transporter 4 expression to increase glucose uptake during infection. *J. Virol.* *85*, 1573–1580.
- Zeuzem, S., Asselah, T., Angus, P., Zarski, J., Larrey, D., Müllhaupt, B., Gane, E., Schuchmann, M., Lohse, A., Pol, S., et al. (2011). Efficacy of the Protease Inhibitor BI 201335, Polymerase Inhibitor BI 207127, and Ribavirin in Patients With Chronic HCV Infection. *Gastroenterology* *141*, 2047–2055.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9294–9299.
- Zhong, W., Ferrari, E., Lesburg, C.A., Maag, D., Ghosh, S.K., Cameron, C.E., Lau, J.Y., and Hong, Z. (2000). Template/primer requirements and single nucleotide incorporation by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J. Virol.* *74*, 9134–9143.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J., et al. (2008). Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* *4*, 495–504.
- Zhu, L., Yang, J., Li, H., Sun, H., Liu, J., and Wang, J. (2015). Conformational change study of dengue virus NS2B-NS3 protease using 19F NMR spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *461*, 677–680.
- Zor, T., Mayr, B.M., Dyson, H.J., Montminy, M.R., and Wright, P.E. (2002). Roles of Phosphorylation and Helix Propensity in the Binding of the KIX Domain of CREB-binding Protein by Constitutive (c-Myb) and Inducible (CREB) Activators. *J. Biol. Chem.* *277*, 42241–42248.
- (2000). Hepatitis C--global prevalence (update). *Relevé Épidémiologique Hebd. Sect. Hygiène Secrétariat Société Nations Wkly. Epidemiol. Rec. Health Sect. Secr. Leag. Nations* *75*, 18–19.