



HAL
open science

Étude de l'import nucléaire de la protéine Rev du VIH-1

Marjolaine Noirclerc-savoie

► **To cite this version:**

Marjolaine Noirclerc-savoie. Étude de l'import nucléaire de la protéine Rev du VIH-1. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Grenoble - Alpes, 2024. <tel-04898549>

HAL Id: tel-04898549

<https://hal.science/tel-04898549v1>

Submitted on 20 Jan 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Étude de l'import nucléaire de la protéine Rev du VIH-1

École Doctorale Chimie Science du Vivant
Université Grenoble Alpes

Marjolaine NOIRCLERC-SAVOYE
Institut de Biologie Structurale (IBS)
Groupe Epigen

Présentée le 16/01/2024

Composition du jury :

Présidente :

Dr Cécile BREYTON, Directrice de recherche CNRS, Grenoble

Rapporteurs.trice:

Dr Nathalie ARHEL, Directrice de recherche CNRS, Montpellier

Dr Patrice GOUET, Professeur, Université Lyon 1

Dr Juan REGUERA, Directeur de recherche INSERM, Marseille

Examineur :

Dr Pascal FENDER, Directeur de recherche CNRS, Grenoble

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p 1
1- CV	p 2
2- SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DOCTORALES	p 10
3- SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS POSTDOCTORALES	p 11
3.1- RECHERCHES POST-DOCTORALES	p 11
3.1.1- FtsW et RodA : Protéines membranaires intégrales impliquées dans la synthèse de PG	p 12
3.1.2- DivIB, DivIC, FtsL : Protéines interdépendantes, essentielles à la division bactérienne	p 13
3.1.3- DivIB, DivIC, FtsL, FtsW et PBP2x : Reconstitution de complexes protéiques membranaires impliqués dans la synthèse de PG au site de division	p 16
3.2- INGENIEURE DE RECHERCHE	p 17
3.2.1- Plateforme RoBioMol	p 17
3.2.2- Collaboration sur les protéines fluorescentes, avec Antoine Royant	p 24
3.2.3- Groupe Epigen dans l'équipe de Carlo Petosa	p 25
A- Mise au point d'une nouvelle stratégie antifongique contre une levure émergente mortelle : <i>Candida auris</i>	p 26
B- Transport nucléocytoplasmique des protéines du VIH : étude structurale de l'import nucléaire de la protéine Rev du VIH-1	p 28
<i>B1- Caractérisation de la protéine Rev en interaction avec la protéine humaine Importineβ</i>	<i>p 29</i>
<i>B2- Impact de la phosphorylation de Rev sur l'interaction avec Impβ</i>	<i>p 31</i>
4- PROJET DE RECHERCHE	p 34
4.1- Connaissances actuelles	p 35
4.1.1- La protéine Rev du VIH-1 est essentielle à la réplication du virus	p 35
4.1.2- La protéine humaine Imp β est essentielle à l'import nucléaire de Rev	p 36
4.1.3- La protéine humaine NPM1 participe aussi à l'import nucléaire de Rev	p 37
4.2- Objectifs et hypothèses de travail	p 41
4.3- Partie #1 : Caractérisation de l'interaction entre Impβ/Rev : une interaction essentielle à l'import nucléaire de Rev	p 41
4.3.1- Contexte	p 41
4.3.2- Objectifs	p 42
4.3.3- Caractérisation du complexe Imp β /Rev par cryo-ME	p 42
4.4- Partie #2 : Caractérisation de l'interaction Rev/NPM1 impliquée dans la réplication du VIH-1	p 44
4.4.1- Contexte	p 44
4.4.2- Objectifs	p 44
4.4.3- Caractérisation du complexe Rev/NPM1 par cryo-EM, cristallographie et RMN	p 44
4.5- Partie #3 : Régulation de l'import nucléaire de Rev par NPM1 et Impβ	p 48
4.5.1- Contexte	p 48
4.5.2- Objectifs	p 48
4.5.3- Caractérisations structurales des différents sous-complexes impliquant Rev, NPM1 et Imp β : une approche intégrative combinant cryo-ME, cristallographie aux rayons X et RMN	p 48
4.5.4- Étude de la dynamique des interactions moléculaires dans un contexte cellulaire	p 52
4.5.5- Identification de petites molécules inhibitrices de l'import nucléaire de Rev	p 53
BIBLIOGRAPHIE	P 54

INTRODUCTION

Ce manuscrit a pour but de retracer mes expériences de recherche depuis mon doctorat jusqu'à celles que je mène aujourd'hui. Tout au long de mon **parcours professionnel scientifique** – initié après avoir été danseuse professionnelle et repris des études universitaires en biologie cellulaire et moléculaire – j'ai fait le choix d'évoluer dans des domaines et des **thématiques très différents**, allant scientifiquement **du gène à la structure de la protéine**. Ce parcours atypique a été pour moi extrêmement enrichissant, me permettant de travailler sur des thématiques différentes et d'avoir une vision élargie et complémentaire de ce qu'il est possible de faire de manière pluridisciplinaire en recherche fondamentale en biologie.

J'ai effectué ma **thèse en génétique bactérienne**, sur **l'étude de la mobilité des éléments transposables chez la bactérie *Escherichia coli***, de 1997 à 2001, au sein du Laboratoire de Plasticité et Expression des Génomes Microbiens - au CERMO de Grenoble - sous la direction de Michel Blot et la co-supervision de Dominique Schneider. Par la suite j'ai réalisé un **stage postdoctoral en biochimie des protéines membranaires**, sur la **caractérisation de protéines essentielles à la division bactérienne de l'agent pathogène *Streptococcus pneumoniae***, à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble dans le Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules dirigé par Thierry Vernet. C'est au sein de ce laboratoire que j'ai été recrutée – en 2004 par la Fondation Rhône Alpes Futur puis en 2008 par le CEA – en tant qu'**ingénieure de recherche** pour mettre en place et gérer une **plateforme automatisée dédiée à la biologie moléculaire, à l'expression et à la purification de protéines**. J'ai travaillé en tant que responsable de la plateforme RoBioMol jusqu'en décembre 2013. J'ai alors souhaité faire évoluer ma carrière et retrouver un **poste de recherche à temps plein**. C'est en janvier 2014 que j'ai rejoint le groupe Infection Virale et Cancer de l'IBS (aujourd'hui Epigen) dirigé par Carlo Petosa, et que je me suis **spécialisée** dans la **caractérisation des interactions protéiques par la biologie structurale intégrative**, en étudiant **l'interaction de la protéine Rev du VIH-1 avec la protéine humaine Imp β** , essentielle à **l'import nucléaire de Rev et à la réplication virale**.

Durant toutes ces années, j'ai toujours eu à cœur de valoriser mon travail de recherche et de développement par des publications scientifiques, afin de contribuer au mieux à l'avancée des thèmes de recherche dans lesquels j'ai été impliquée. J'ai aussi accordé beaucoup d'importance à former des étudiants à des niveaux très différents et à valoriser leur travail par des publications. J'ai ainsi encadré 18 étudiants dont **4 Masters 2, 2 doctorants** (dont un en cours en **co-supervision à l'EDCSV**) et **1 post-doctorante**, avec lesquels je **co-signe 5 publications** dont **3** en tant qu'**auteur correspondant**.

De plus, de 2004 à 2013 et depuis 2018, j'ai eu la chance de travailler en étroite collaboration avec **4 technicien(ne)s**. Ce travail d'encadrement m'a aussi permis de **co-signer 8 autres publications** dont **2** en tant qu'**auteur correspondant**.

J'ai dernièrement obtenu un **financement auprès de l'ANRS** en tant que **porteuse de projet** pour réaliser la première partie du projet de recherche que je propose.

1- CV

Marjolaine NOIRCLERC-SAVOYE (Dr)

CEA – E4

Institut de Biologie Structurale

71, avenue des Martyrs

38044 Grenoble Cedex 09

marjolaine.noirclerc@ibs.fr

Tél : 04 57 42 86 38

Mariée, 3 enfants

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- 2014-** **Ingénieure de recherche CEA - Niveau E4**
Groupe Epigenetics and molecular pathways, dirigé par **Carlo Petosa**, Institut de Biologie Structurale, Grenoble.
-> *Etude de l'interaction de la protéine virale HIV1-Rev avec la protéine humaine Importine Beta*
- 2014** **Changement d'équipe et de thématique**
- 2004-2013** **Ingénieure de recherche** (CDI Fondation Rhône Alpes Futur puis CDI **CEA depuis 2008**) + Congé Maternité
Plate-forme RoBioMol, Institut de Biologie Structurale, Grenoble
-> *Développement de procédés et exploitation d'une plate-forme automatisée pour le clonage de gènes, l'expression et la purification de protéines*
- 2001-2004** **Stage postdoctoral** (CDD CEA puis UJF) + Congé Maternité
Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules dirigé par **Thierry Vernet**, Institut de Biologie Structurale, Grenoble
-> *Caractérisation de protéines membranaires impliquées dans la division bactérienne de Streptococcus pneumoniae*
- 2001** **Changement de thématique**
- 1997-2001** **Thèse** (Allocation de recherche MENRT) + Congé Maternité
Laboratoire de Plasticité et Expression des Génomes Microbiens, dirigé par **Michel Blot**, CERMO, Université Joseph Fourier, Grenoble
-> *Transposition de Séquences d'Insertion chez la bactérie Escherichia coli*
- 1989-1992** **Danseuse Professionnelle**
Paris, Allemagne

FORMATION SUPERIEURE

- Mars 2001** **Doctorat** Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université J. Fourier, Grenoble I
- 1997** **D.E.A.** Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université J. Fourier, Grenoble I. Mention Bien
- 1996** **Maîtrise** Biologie Cellulaire et Physiologie, Université J. Fourier, Grenoble I. Mention Bien
- 1995** **Licence** Biologie Cellulaire et Physiologie. Université J. Fourier, Grenoble I. Mention A. Bien
- 1994** **DEUG** Sciences de la nature et de la Vie, Université J. Fourier, Grenoble I. Mention Bien

DISTINCTIONS

- **Qualifications** pour la fonction de **Maître de Conférence des Universités** obtenue le 29/03/2004 en **section 64** « Biochimie et biologie moléculaire » (Qualification 04264124064) et en **section 65** « Biologie cellulaire » (Qualification 04265124064)
- **Allocation de thèse** du Ministère de la Recherche (1997-2001)

FINANCEMENTS

- 2022** **Contrat d'initiation ANRS** - CSS11- Recherches fondamentales sur le VIH-Sida, obtenu en juillet 2022 en tant que **porteur de projet** : 19 968€ sur une durée de 12 mois
Projet RevNucl : Structure de la protéine Rev du VIH-1 en interaction avec Importine β : étude par cryo-microscopie électronique
- 2012** **Financement ANR** Blanc Bruno Franzetti, en tant que **prestataire RoBioMol** – 12 000€.
Projet ARCHELYSE : Nouvelles voies de protéolyse chez les Archées
- 2011** **Financement ANR** Programme JCJC Antoine Royant, en tant que **participante** sur 36 mois.
Projet SOxygen : Oxygène singulet : du dégât sur les protéines vers le développement de bio-détecteurs et générateurs
- 2010** **Financement ANR** PIRbio Jérôme Boisbouvier, en tant que **participante** sur 36 mois.
Projet NanoLife@ Work : Etudes en temps réel de NanoMachines Biomoléculaires par RMN
- 2008** **Financement ANR** Blanc André Zapun en tant que **participante** sur 36 mois.
Projet PneumoPG : Reconstitution *in vitro* de la synthèse du peptidoglycane du pneumocoque
- 2007** **Financement ANR** Blanc Dominique Bourgeois en tant que **participante** sur 36 mois.
Projet DSPF : Dynamique Structurale des Protéines Fluorescentes

ENCADREMENT ÉTUDIANTS/PERMANENTS

- Co-encadrement de 1 post-doctorant
- Co-encadrement de 2 doctorants dont un avec co-supervision reconnue par l'EDCSV
- Encadrement de 4 étudiants M2 (dont 1 co-encadrement)
- Encadrement de 4 techniciens
- Encadrement de 11 étudiants (niveaux M1 / L3 / Ecole d'ingénieur / BTS)

Post-doctorant

Céline Lafaye - Postdoctorat co-encadré avec Antoine Royant (36 mois)

-> Publications P31 et P24

Doctorant

Hasan Dawi - Thèse co-encadrée avec C. Petosa (co-supervision EDCSV) depuis octobre 2020.
Soutenance prévue en octobre 2024

Didier Spittler - 3^e et 4^e année thèse co-supervisées avec C. Petosa. Soutenance septembre 2015.

-> Publication P32 (*co-auteur correspondant)

Master 2

Hosni El Zein (2024 – 6 mois, étudiant financé par une bourse GRAL (Alliance grenobloise pour la biologie structurale et cellulaire intégrée)), M2 Physiologie, Épigénétique, Développement et Différentiation cellulaire, UGA, Grenoble

Hasan Dawi (2020 - 6 mois, co-supervision avec C. Petosa), M2 Biologie Structurale Intégrative, UGA, Grenoble

Nadia Ben Fadhel (2018 - 6 mois), M2 Biologie Moléculaire et Cellulaire, UGA, Grenoble
-> Publication P30* (*auteur correspondant)

Simon Harris (2016 - 6 mois), Uppsala University, Sweden
-> Publication P32* (*co-auteur correspondant)

Mathias Rechenmann (2011 - 6 mois), M2 ISM Biotechnologie, UGA, Grenoble
-> Publication P25* (*auteur correspondant)

Technicien

Rose-Laure Indorato (CDI technicien CNRS) - **Depuis 2018**
-> Publication P32* (*co-auteur correspondant)

Anne-Marie Villard (CDI technicien CNRS, plateforme RoBioMol) - **2012-2014**

Violaine Lantez (CDD technicien CEA, plateforme RoBioMol) - **2011-2012**
-> Publications P25*, P23, P22* (*auteur correspondant)

Benoit Gallet (CDI technicien CEA, Plateforme RoBioMol) - **2004-2010**
-> Publications P26, P14, P13*, P10, P9, P7 (*auteur correspondant)

Master 1 / Ecole d'ingénieur / Licence 3 / BTS

2019 **Lama Shamseddine** (3 mois), M1 Biologie moléculaire et cellulaire, UGA, Grenoble
2019 **Marina Callendret** (3 semaines) L3 Sciences et Technologie, mention Sciences de la Vie, Grenoble
2017 **Nadia Ben Fadhel** (2 mois 1/2), M1 Biologie moléculaire et cellulaire, UGA, Grenoble
2013 **Florence Gerin** (5 mois) L3 professionnelle Métiers de la Biotechnologie, Nîmes
2013 **Amélie Bochu** (5 mois), 3eme année BTS Ecole Supérieure de Biologie-Biochimie-Biotechnologies, Lyon
2011 **Ophélie Neurdin**, 1ere (6 semaines) et 2eme année (8 semaines) BTS Analyses et Contrôles, Louise Michel, Grenoble
2010 **Sandrine Soaritiana** (3 mois), M1 ISM Biotechnologie, Grenoble
2008 **Yacine Niang** (3 mois), étudiante en L3 de Biologie, UJF, Grenoble
2007 **Xavier Gérard** (3 mois), M1 ISM Biotechnologie/Médicament, Grenoble
2004-2006 **Marilyne Summo**, 1ere et 2eme année BTS Anabiotec (en alternance), Moirans
2002 **Etienne Rogeau** (2 mois), 1ere année Ecole Ingénieur de Chimie, Montpellier

ENSEIGNEMENT

2013-2018 **Cours, UE Biologie à Haut Débit**, module BIO531R, niveau M2 (2h/an)

2013 **Travaux Pratiques** PCR automatisée, Licence 3 pro (3 jours)
-> *Création, mise en place et réalisation des TP*

- 2004-2012 Travaux Dirigés** Biochimie des protéines **HERCULES** (High European Research Course for Users of Large Experimental System) Module PL3B : Automation in structural genomics, niveau Doctorat (8 heures/an), Grenoble
- Travaux Pratiques** Biochimie des protéines **ESONN** (European School On Nanoscience and Nanotechnologies) Module : Recombinant protein production using automated liquid handling systems, niveau Ingénieur (16 heures/an), Grenoble
- Travaux Pratiques UE Ingénierie des protéines**, niveau Master 1ère année (16 heures/an), Grenoble.
-> *Création, mise en place et réalisation des TP/ TD*
- 1999-2000 Travaux Dirigés** Génétique Microbienne, niveau Licence (35 heures), Grenoble
- 1998-1999 Travaux Dirigés** Microbiologie, niveau DEUG 2ème année (32 heures), Grenoble
- 1997-1998 Travaux Pratiques** Génétique Moléculaire des Eucaryotes, niveau Maîtrise (60 heures), Grenoble
- Travaux Pratiques** Génétique Microbienne, niveau Maîtrise (20 heures), Grenoble
- Travaux Dirigés** de Microbiologie, niveau DEUG 2ème année (8 heures), Grenoble

RESPONSABILITES SCIENTIFIQUES ET COLLECTIVES

- **Membre du Comité de Suivi Individuel (CSI)** de Marina Callandret (Doctorante à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB)) - 2021-2024
- **Rapportrice dans des journaux à comité de lecture** pour ACS Omega, Biotechnology Progress, Journal of Laboratory Automation
- **Membre du comité d'organisation des journées scientifiques** de l'IBS (depuis 2015)
- **Membre élue du conseil d'unité de l'IBS** (2010-2012)
- **Gestion du laboratoire et responsable des équipements** de l'équipe de C. Petosa au sein du groupe EPIGEN
- **Encadrement** d'étudiants, stagiaires et nouveaux arrivants
- Participation à la **gestion des commandes**
- Gestion **Dossier OGM** de l'équipe C. Petosa

PUBLICATIONS

32 publications :

> 12 en 1^{er}/2^{eme} auteur

> 14 avec étudiant/personnel encadré

> 5 en tant qu'auteur correspondant* avec des étudiants M2 et doctorant

P32 - Spittler D¹, Indorato RL², Boeri Erba E, Delaforge E, Signor L, Harris S³J, Garcia-Saez I, Palencia A, Gabel F, Blackledge M, Noirclerc-Savoie M*, Petosa C*. Binding stoichiometry and structural model of the HIV-1 Rev/importin β complex. Life Sci Alliance (2022) 5(10):e202201431.

<https://doi.org/10.26508/lsa.202201431>

> ¹ Doctorant co-encadré, ² technicienne permanente et ³ étudiant M2 encadrés, * Co-auteur correspondant

P31 - Lafaye C¹, Aumonier S, Torra J, Signor L, von Stetten D, **Noirclerc-Savoie M**, Shu X, Ruiz-González R, Gotthard G, Royant A, Nonell S. Riboflavin-binding proteins for singlet oxygen production. *Photochem Photobiol Sci.* (2022) 21(9):1545-55. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00156-1>

> ¹ Post-doctorante co-encadrée

P30 - Ben Fadhel N¹, Signor L, Petosa C and **Noirclerc-Savoie M***. Phosphomimetic mutations modulate the ability of HIV-1 Rev to bind human Importin β *in vitro*. *Matters* (2019) DOI 10.19185/matters.201903000032. <https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/view/index/docid/3605154>

> ¹ Etudiante M2 encadrée, * Auteur correspondant

P29 - Garcia-Saez I, Menoni H, Boopathi R, Shukla MS, Soueidan L, **Noirclerc-Savoie M**, Le Roy A, Skoufias DA, Bednar J, Hamiche A, Angelov D, Petosa C and Dimitrov S. Structure of an H1-Bound 6-Nucleosome Array Reveals an Untwisted Two-Start Chromatin Fiber Conformation. *Mol Cell* (2018) 72(5):902-15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.027>

P28 - Gotthard G, von Stetten D, Clavel D, **Noirclerc-Savoie M** and Royant A. Chromophore Isomer Stabilization Is Critical to the Efficient Fluorescence of Cyan Fluorescent Proteins. *Biochemistry* (2017) 56(49):6418-22. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01088>

P27 - Coscia F, Estrozi L. F, Hans F, Malet H, **Noirclerc-Savoie M**, Schoehn G and Petosa C. Fusion to a homo-oligomeric scaffold allows cryo-EM analysis of a small protein. *Scientific Report* (2016) 6:30909. <https://doi.org/10.1038/srep30909>

P26 - **Noirclerc-Savoie M**, Flayhan A, Pereira C, Gallet B¹, Gans P, Ebel C and Breyton C. Tail proteins of phage T5: investigation of the effect of the His6-tag position, from expression to crystallisation. *Protein Expr Purif.* (2015) 109:70-8. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.02.003>

> ¹ Technicien permanent encadré

P25 - Lantez V¹, Nikolaidis I, Rechenmann M², Vernet T, **Noirclerc-Savoie M***. Rapid automated detergent screening for the solubilization and purification of membrane proteins and complexes. *Engineering in Life Sciences* (2015) 15:39-50. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400187>

> ¹ Technicienne contractuelle et ² étudiant M2 encadrés, * Auteur correspondant

P24 - Yu D, Gustafson WC, Han C, Lafaye C¹, **Noirclerc-Savoie M**, Ge WP, Thayer DA, Huang H, Kornberg TB, Royant A, Jan LY, Jan YN, Weiss WA, Shu X. An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging. *Nat Commun.* (2014) 5:3626. <https://doi.org/10.1038/ncomms4626>

> ¹ Post-doctorante co-encadrée

P23 - Crublet E, Kerfah R, Mas G, **Noirclerc-Savoie M**, Lantez V¹, Vernet T and Boisbouvier J. A Cost-Effective Protocol for the Parallel Production of Libraries of (13)CH₃-Specifically Labeled Mutants for NMR Studies of High Molecular Weight Proteins. *Methods Mol Biol.* (2014) 1091:229-44. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-691-7_17

> ¹ Technicienne contractuelle encadrée

P22 - Noirclerc-Savoie M*, Lantez V¹, Signor L, Philippe J, Vernet T*, and Zapun A. Reconstitution of Membrane Protein Complexes Involved in Pneumococcal Septal Cell Wall Assembly. PLoS ONE (2013) 8(9):e75522 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075522>

> ¹ Technicienne contractuelle encadrée, * Co-auteur correspondant

P21 - Appolaire A, Rosenbaum E, Durá A, Colombo M, Marty V, **Noirclerc Savoie M**, Godfroy A, Schoehn G, Girard E, Gabel F and Franzetti B. Pyrococcus horikoshii TET2 Peptidase Assembling Process and Associated Functional Regulation. J. Biol. Chem. (2013) 288: 22542-22554. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.450189>

P20 - von Stetten D, Batot G, **Noirclerc-Savoie M** and Royant A. Alteration of fluorescent protein spectroscopic properties upon cryoprotection” Acta Crystallographica Section D. (2012) Nov ;68(Pt 11):1578-83. <https://doi.org/10.1107/S0907444912037900>

P19 - von Stetten D, **Noirclerc-Savoie M**, Goedhart MJ, Gadella Jr TW J and Royant A. Structure of a fluorescent protein from Aequorea victoria bearing the obligate-monomer mutation A206K. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. (2012) 68(Pt 8):878-82. <https://doi.org/10.1107/S1744309112028667>

P18 - Goedhart J, von Stetten D, **Noirclerc-Savoie M**, Lelimosin M, Joosen L, Hink MA, van Weeren L, Gadella Jr TWJ. and Royant A. Structure-guided evolution of a cyan fluorescent protein leads to perfection of its quantum yield. Nature communication (2012) 3:751. <https://doi.org/10.1038/ncomms1738>

P17 - Zapun A, **Noirclerc-Savoie M**, Helassa N and Vernet T. Peptidoglycan assembly machines: the biochemical evidence. Microb Drug Resist (2012) 18(3):256-60. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0236>

P16 - Royant A and **Noirclerc-Savoie M**. Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein. Journal of structural biology (2011), 174(2):385-90. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.02.004>

P15 - Amero C, Durá MA, **Noirclerc-Savoie M**, Perollier A, Gallet B¹, Vernet T, Franzetti B and Boisbouvier J. A Systematic Mutagenesis-Driven Strategy for Site-Resolved NMR Studies of Supramolecular Assemblies. Journal of Biomolecular NMR (2011) 50(3):229-36. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9513-5>

> ¹ Technicien permanent encadré

P14 - Frolet C, Beniazza M, Roux L, Gallet B¹, **Noirclerc-Savoie M**, Vernet T and Di Guilmi A-M. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. BMC Microbiology (2010), 10:190. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-190>

> ¹ Technicien permanent encadré

P13 - Noirclerc-Savoie M*, Gallet B¹, Bernaudat F, Vernet T. Large scale purification of linear plasmid DNA for efficient high throughput cloning. *Biotechnology Journal* (2010) 5(9):978-85.
<https://doi.org/10.1002/biot.201000132>

> ¹ Technicien permanent encadré, * Auteur correspondant

P12 - Gans P, Hamelin O, Sounier R, Ayala I, Durá A, Amero C, Noirclerc-Savoie M, Franzetti B, Plevin M, Boisbouvier J. Stereospecific isotopic labeling of methyl groups for NMR studies of high molecular weight proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* (2010) 49(11):1958-62.
<https://doi.org/10.1002/anie.200905660>

P11 - Lelimosin M, Noirclerc-Savoie M, Lazareno-Saez C, Paetzold B, Le Vot S, Chazal R, Macheboeuf P, Field M, Bourgeois D and Royant A. Intrinsic dynamics in ECFP and Cerulean control fluorescence quantum yield. *Biochemistry* (2009) 48(42):10038-46. <https://doi.org/10.1021/bi901093w>

P10 - Rasia R, Noirclerc-Savoie M, Bologna N, Gallet B¹, Plevin M J, Blanchard L, Palatnik J, Brutscher B, Vernet T and Boisbouvier J. Parallel screening and optimization of protein constructs for structural studies. *Protein Science* (2009) 18(2):434-9. <https://doi.org/10.1002/pro.46>

> ¹ Technicien permanent encadré

P9 - Lundqvist J, Gallet B, Noirclerc-Savoie M and Vernet T. Automation of high-throughput expression screening on His MultiTrap HP with vacuum elution using a Hamilton Liquid Handling Workstation. *Discovery Matters* (2008), 14-15

> ¹ Technicien permanent encadré

P8 - Royant A, Carpentier P, Ohana J, McGeehan J, Paetzold B, Noirclerc-Savoie M, Vernède X, Adam V and Bourgeois D. Advances in spectroscopic methods for biological crystals. 1. Fluorescence lifetime measurements. *J. Appl. Cryst.* (2007) 40:1105-11. <https://doi.org/10.1107/S0021889807044196>

P7 - Gallet B¹, Vernet T and Noirclerc-Savoie M. High throughput automated affinity purification of His-Tagged proteins with Ni Sepharose matrices on the MICROLAB® STAR. *Life Science Robotics* (2007)

> ¹ Technicien permanent encadré

P6 - Kharat A S, Coursange E, Noirclerc-Savoie M, Lacoste J and Blot M. IS1 transposition is enhanced by translation errors and by bacterial growth at extreme glucose levels. *Acta Biochim. Pol.* (2006) 53(4):729-38. http://www.actabp.pl/pdf/4_2006/729.pdf

P5 - Noirclerc-Savoie M, Le Gouëllec A, Morlot C, Dideberg O, Vernet T and Zapun, A. *In vitro* reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* (2005) 55(2):413-24.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04408.x>

P4 - Morlot C, Noirclerc-Savoie M, Zapun A, Dideberg O and Vernet T. The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* (2004) 51(6):1641-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03953.x>

P3 - Noirclerc-Savoie M, Morlot C, Gérard P, Dideberg O, Vernet T and Zapun A. Expression and purification of FtsW and RodA from *Streptococcus pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively. *Protein Expr. Purif.* (2003) 30(1):18-25

[https://doi.org/10.1016/s1046-5928\(03\)00051-2](https://doi.org/10.1016/s1046-5928(03)00051-2)

P2 - Stüdemann A, Noirclerc-Savoie M, Klauck E, Becker G, Schneider D, and Hengge R. Sequential recognition of two distinct sites in SigmaS by the proteolytic targeting factor RssB and ClpXP. *EMBO J.*, (2003) 22(16):4111-20. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg411>

P1 - Schneider D, Faure D, Noirclerc-Savoie M, Barriere A-C, Coursange E, and Blot M. A broad-host-range plasmid to isolate mobile genetic in Gram-negative bacteria" *Plasmid*, (2000) 44(2):201-7.

<https://doi.org/10.1006/plas.2000.1483>

2- SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DOCTORALES

J'ai réalisé ma thèse de 1997 à 2001, au sein du Laboratoire de Plasticité et Expression des Génomes Microbiens - au CERMO de Grenoble - sous la direction de Michel Blot et la co-supervision de Dominique Schneider. J'ai été la première doctorante dans ce laboratoire nouvellement créé en 1995, grâce à une ATIPE obtenue par Michel Blot, et qui a été fermé en 2002 après sa disparition prématurée.

Transposition de séquences d'insertion (IS) chez la bactérie *Escherichia coli*

Au cours de ce stage doctoral, j'ai étudié la régulation de la transposition de séquences d'insertion (IS) chez la bactérie *Escherichia coli*, selon les conditions de croissance, l'état physiologique et le contexte génétique de la bactérie. Les IS sont de petits éléments transposables (ETs) simples, qui codent uniquement pour les fonctions impliquées dans leur mobilité (transposase). Les ETs jouent un rôle important dans la variation génétique et le remodelage du génome de leur hôte, même dans des conditions dans lesquelles les bactéries ne se divisent pas. Les IS interviennent dans de nombreuses mutations (effet polaire, inactivation, activation de gènes) et réarrangements chromosomiques (délétions, inversions, duplications). Le but de ce travail était de caractériser les facteurs cellulaires et environnementaux qui pouvaient moduler la mutagenèse au cours des différentes phases d'une culture bactérienne. Ce travail s'inscrit dans la compréhension de la mobilité des IS, afin d'identifier les conditions qui pourraient favoriser l'évolution des génomes bactériens.

L'étude comparative de la transposition au sein de la mutagenèse spontanée au cours de la croissance bactérienne a nécessité (1) la mise au point d'un système rapporteur et des conditions expérimentales, afin d'étudier (2) l'effet de différentes conditions physiologiques (croissance, arrêt de croissance) pour (3) des souches bactériennes aux géotypes différents.

Mise au point d'un protocole d'étude de la mutagenèse spontanée

Le système rapporteur utilisé dans cette étude est porté par un plasmide et est constitué d'un gène *tetA* conférant la résistance à la tétracycline sous le contrôle d'un promoteur régulé par un répresseur actif. Il a été optimisé pour pouvoir sélectionner des mutants de type « perte de fonction » dues à des mutations ponctuelles, des délétions et des insertions, apparaissant spontanément en conditions de croissance exponentielle et d'arrêt de la division cellulaire. La sélection de mutants résistants à la tétracycline, à l'aide de ce plasmide à large spectre d'hôtes, permet d'étudier des éléments génétiques mobiles dans une grande variété de bactéries gram-négatives. Ce développement a fait l'objet d'un **premier manuscrit (Publication P1)**.

Conditions physiologiques et génétiques favorables à la transposition des IS

La comparaison de la nature de 1674 mutants indépendants, obtenus dans plusieurs conditions physiologiques et contextes génétiques, a montré que la **mobilité des IS** n'était **pas constante au cours de la croissance bactérienne**. En milieu riche, la transposition des IS est totalement absente en phase de croissance exponentielle, et ne se produit qu'en phase stationnaire, et semble être indépendant du facteur de transcription RpoS spécifique de la phase stationnaire. Cependant, la transposition peut se produire en phase de croissance exponentielle dans un milieu où la croissance est ralentie par des carences nutritionnelles, ou

de manière beaucoup plus élevée dans la souche bactérienne dénommée 431, présentant une délétion d'une région de son chromosome. L'hypothèse formulée à l'issue de ce travail est que la transposition de certaines IS est favorisée lorsque le bon fonctionnement cellulaire est altéré, permettant à la bactérie d'évoluer pour s'adapter à de nouvelles conditions environnementales.

Caractérisation de la protéine hyperactive RpoS⁴³¹, codé par l'allèle *rpoS* de la souche 431, stabilisée en phase de croissance exponentielle

Au cours de la caractérisation génétique de la souche 431, j'ai découvert fortuitement une mutation au niveau du gène *rpoS*, conférant une protéine hyperactive, de poids moléculaire plus faible que la protéine sauvage, qui n'est plus dégradée en phase de croissance exponentielle par le système ClpXP/RSSB. La caractérisation de RpoS⁴³¹ a permis de découvrir une région N-terminale essentielle à la liaison du régulateur RssB, nécessaire à la protéolyse de la protéine RpoS par le système ClpXP, et de proposer la séquence des événements qui mènent à l'initiation de la dégradation du facteur de transcription.

Ce travail, effectué en collaboration avec l'équipe de Régine Hengge (Allemagne) spécialiste du facteur de transcription RpoS, a été valorisé par un article dans **EMBO Journal (Publication P2)**.

3- SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS POSTDOCTORALES

Les sujets de recherche dans lesquels j'ai été impliquée depuis ma thèse sont variés mais peuvent être néanmoins regroupés dans deux thématiques : (1) l'étude de **protéines** ou de **complexes protéiques essentielles à la réplication d'un agent pathogène** (bactérie, virus), dont l'activité ou l'interaction constitue une cible thérapeutique potentielle, et (2) le développement d'**outils en biologie moléculaire et biochimie des protéines**, permettant de faciliter le **criblage de conditions expérimentales**. Cette double compétence m'a aidée au fil du temps à aborder mes sujets de recherche avec une approche plus large, en n'hésitant pas à cribler pour tenter d'identifier les constructions et les procédés les plus prometteurs.

3.1- RECHERCHES POST-DOCTORALES (2001-2004)

Le travail que j'ai effectué sur la caractérisation de la protéine RpoS durant la dernière partie de ma thèse, m'a donné l'envie de réaliser un stage postdoctoral en biochimie des protéines. C'est dans ce contexte que j'ai intégré le laboratoire d'ingénierie des macromolécules (LIM) - aujourd'hui Groupe Pneumocoque (PG) - dirigé par Thierry Vernet à l'IBS, qui proposait un sujet sur la **caractérisation de protéines membranaires**. L'équipe est spécialisée dans la biologie de *Streptococcus pneumoniae* et étudie en particulier les mécanismes de synthèse de la paroi, la résistance aux antibiotiques, la division et la virulence bactérienne.

Caractérisation de protéines membranaires impliquées dans la division bactérienne de *Streptococcus pneumoniae*

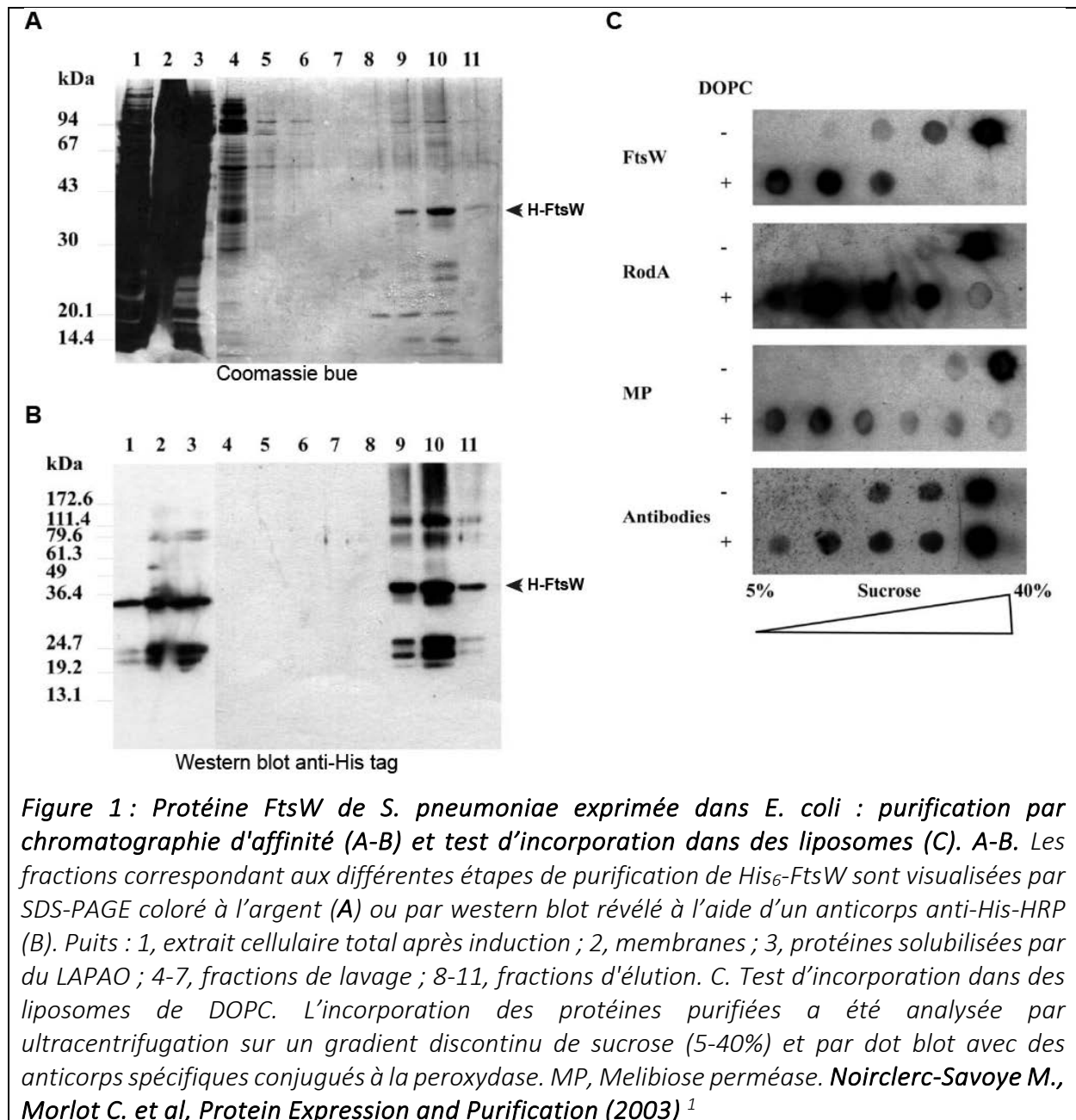
Au cours de ce stage postdoctoral, je me suis formée et intéressée à étudier et à caractériser des protéines membranaires du pneumocoque, impliquées dans le processus encore mal compris de la synthèse du peptidoglycane (PG). La structure du PG, macromolécule géante qui entoure la cellule, maintient la forme et l'intégrité de la bactérie et constitue un échafaudage pour les autres composants de la paroi cellulaire. Sa synthèse est assurée par un ensemble de protéines essentielles, qui s'associent au sein de complexes multiprotéiques pour assurer l'élongation et la division cellulaire, mais dont l'orchestration et la régulation restent à déterminer.

S. pneumoniae est un agent pathogène humain, responsable majoritairement d'otites, de pneumonies invasives et de méningites, qui présente une haute résistance aux antibiotiques et qui constitue un problème de santé publique majeur. La caractérisation et l'identification de protéines ou complexes protéiques impliqués dans la synthèse de PG et la division bactérienne du pneumocoque s'inscrit donc dans un programme de lutte contre la résistance aux antibiotiques.

3.1.1- FtsW et RodA : Protéines membranaires intégrales impliquées dans la synthèse de PG

Dans la première partie de mon stage postdoctoral, je me suis intéressée aux protéines FtsW et RodA, protéines membranaires intégrales homologues — contenant 10 segments transmembranaires — impliquées dans la translocation du précurseur lipidique du PG à travers la membrane cytoplasmique, respectivement durant la division et l'élongation des cellules bactériennes. A cette époque, le laboratoire n'avait aucune expérience dans la purification de protéines membranaires (bi- ou multi-topiques), ayant concentré ses travaux jusqu'alors sur l'activité des domaines protéiques extra-membranaires. Ainsi, nous avons mis au point la surexpression, la solubilisation et la purification de FtsW et RodA du pneumocoque dans *E. coli*, afin d'obtenir des protéines pures et fonctionnelles pouvant être incorporées dans des vésicules lipidiques reconstituées (**Figure 1**) (**Publication P3**). Cette étude a été déterminante pour la suite de notre travail, portant sur l'identification et la caractérisation de complexes protéiques membranaires spécifiquement impliqués dans la division du pneumocoque.

Ce travail a aussi été pour moi l'occasion de superviser mon **premier étudiant, Etienne Rogeau** (1ere année École d'Ingénieur de chimie, Montpellier).



3.1.2- DivIB, DivIC, FtsL : Protéines interdépendantes, essentielles à la division bactérienne

Par la suite je me suis intéressée à la caractérisation d'un complexe membranaire impliquant DivIB, DivIC, FtsL, protéines membranaires bitopiques — possédant un seul segment transmembranaire — essentielles à la division bactérienne, dont la fonction reste mal comprise mais dont l'interdépendance dans la stabilité et la localisation avait été démontrée *in vivo*.

Dans un premier temps, nous avons reconstitué *in vitro* un complexe trimérique constitué des domaines extracellulaires des trois protéines. Nous avons montré que le domaine extracellulaire de DivIB s'associe à l'hétérodimère DivIC/FtsL dont l'hétérodimérisation, essentielle à l'interaction avec DivIB, a été artificiellement contrainte avec des hélices formant un coiled-coil (Figure 2A, B). Des expériences d'immunofluorescence ont montré que DivIC est

toujours localisé au milieu de la cellule, contrairement à DivIB et FtsL, qui sont co-localisées avec DivIC seulement pendant la septation (**Figure 2C-E**). Dans l'ensemble, nos données suggèrent que l'assemblage du complexe trimérique DivIB/DivIC/FtsL est régulé au cours du cycle cellulaire par la formation contrôlée de l'hétérodimère DivIC/FtsL (**Figure 2F**).

La reconstitution *in vitro* du complexe trimérique contenant DivIB, FtsL et DivIC démontre pour la première fois l'interaction physique des 3 protéines, suggérée dans la littérature par des études génétiques et de localisation. Ce travail a fait l'objet de la **publication P5**.

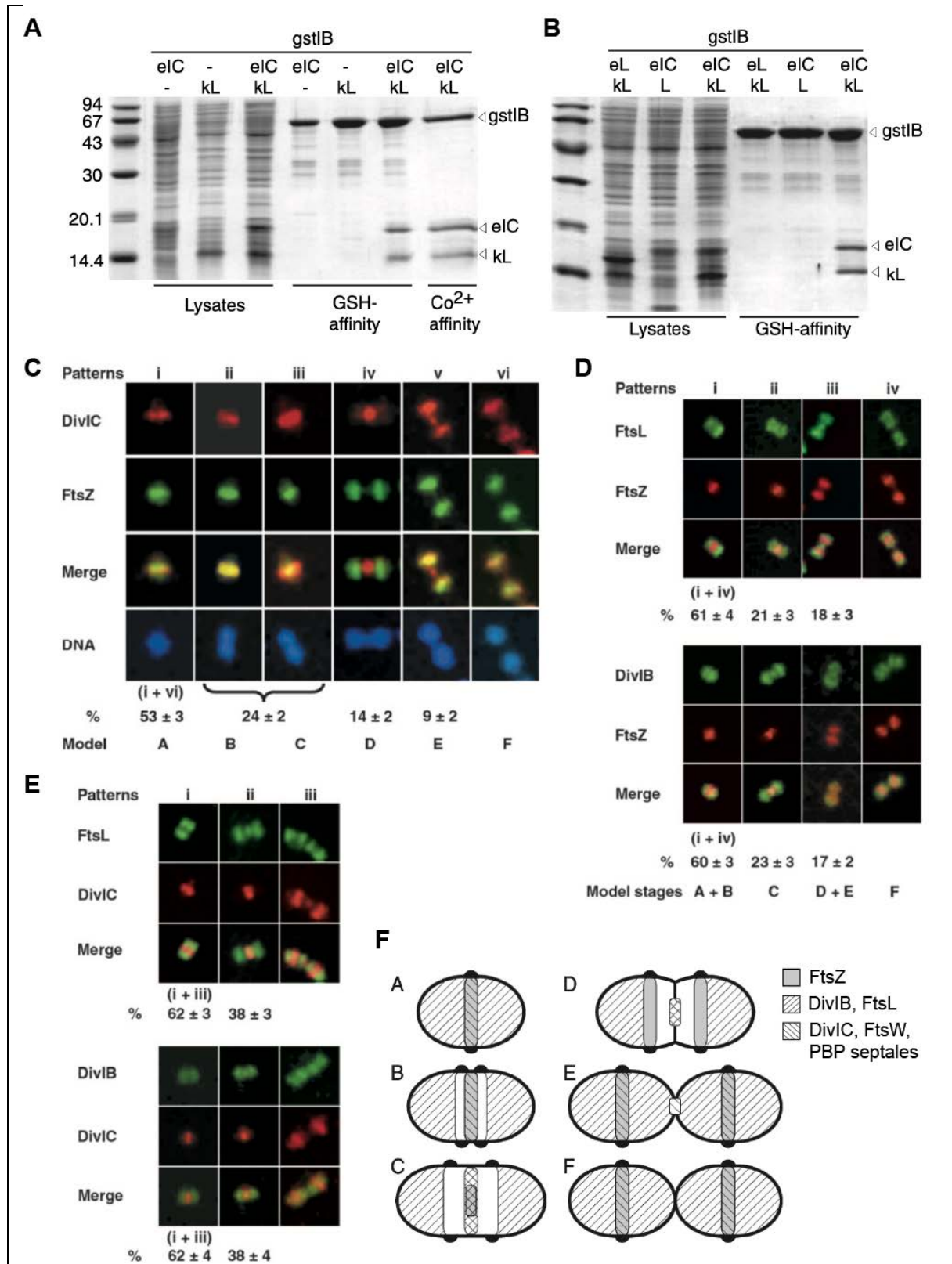


Figure 2 : Les protéines DivIB, DivIC et FtsL forment un complexe ternaire localisé au niveau de la paroi septale de *S. pneumoniae*. A-B. Purification par chromatographie des domaines extracellulaires de DivIB (*gstIB*, fusionné à la GST), de DivIC (*eIC*, fusionné au coil E5) et FtsL (*kL*, fusionné au coil K5, complémentaire de E5). C. Co-immunolocalisation de DivIC (rouge) avec FtsZ (vert) et l'ADN (bleu). FtsZ est une protéine qui joue un rôle fondamental

dans la division bactérienne, qui s'assemble en anneau à l'emplacement du futur septum au niveau duquel les cellules filles vont ensuite se séparer, et qui permet de recrutement des autres acteurs de la division bactérienne (entre autres FtsL, DivIB, DivIC et FtsW). **D.** Co-immunolocalisation de FtsL ou DivIB (vert) avec FtsZ (rouge). **E.** Co-immunolocalisation de FtsL ou DivIB (vert) avec DivIC (rouge). **F.** Modèle de localisation des protéines membranaires au cours de la division cellulaire de *S. pneumoniae* proposé à partir des expériences d'immunolocalisation présentées dans les panels C-E. La localisation de FtsZ est représentée en gris, les hachures penchées vers la droite indiquent la présence de DivIB et de FtsL, les hachures penchées vers la gauche celle de DivIC, de FtsW et des Penicillin Binding Proteins (PBP) septales. Les PBP non septales suivent la localisation des anneaux équatoriaux dupliqués, représentés par des bosses noires de peptidoglycane. **Noirclerc-Savoye M., Le Gouellec A. et al, Mol Microbiol (2005) ².**

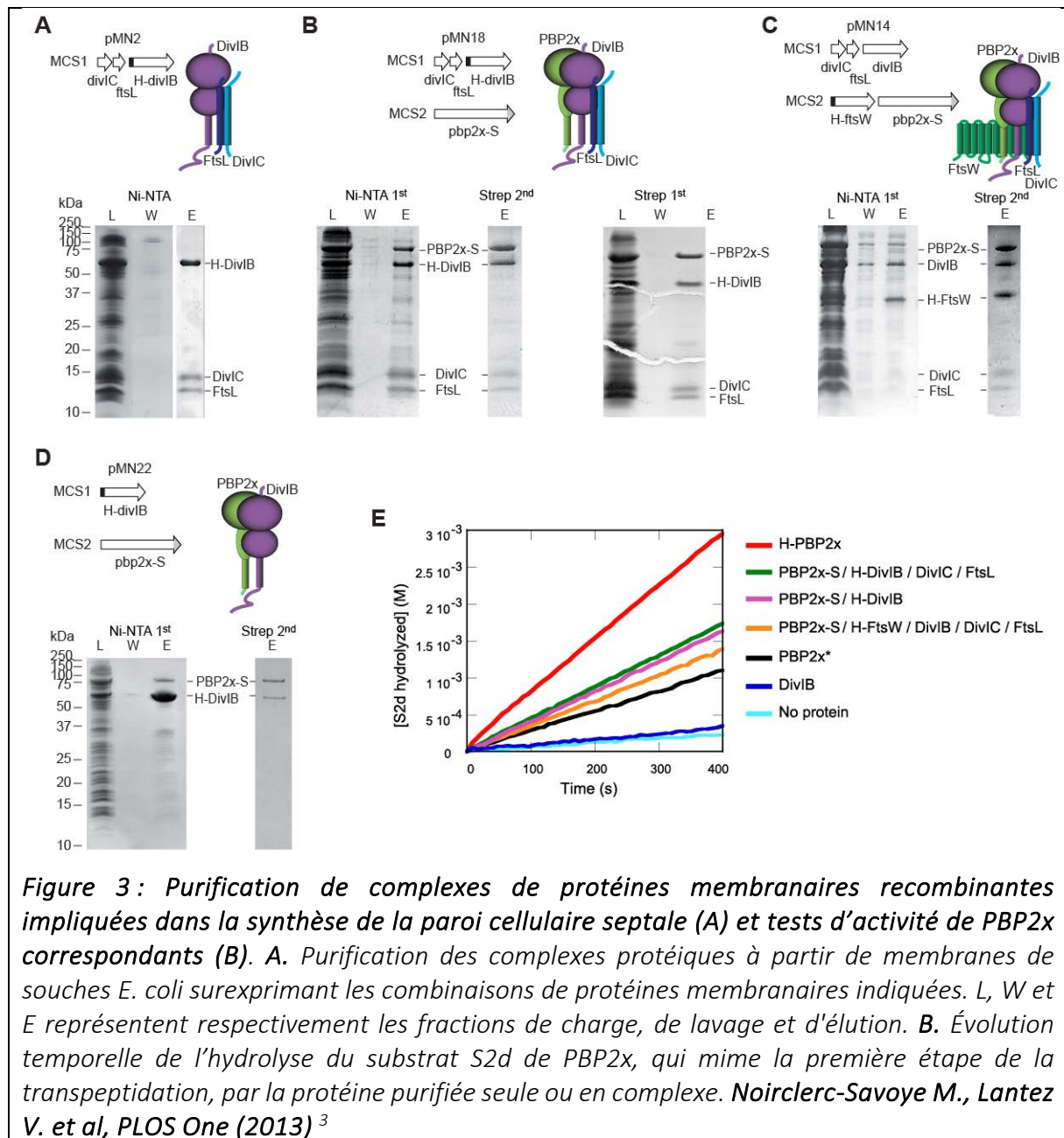
3.1.3- DivIB, DivIC, FtsL, FtsW et PBP2x : Reconstitution de complexes protéiques membranaires impliqués dans la synthèse de PG au site de division

Par la suite nous nous sommes concentrés sur les protéines membranaires entières, intégrant les domaines transmembranaires essentiels au recrutement des protéines au site de division et probablement impliqués dans des interactions protéine-protéine.

Nous avons alors mis au point la co-surexpression de plusieurs protéines membranaires et leurs extractions des membranes à l'aide de détergents, pour obtenir des complexes de protéines membranaires purs et fonctionnels. Ce travail a fortement participé à la mise au point et au développement du service de « criblage de détergents pour la solubilisation de protéines membranaires » proposé par la suite par la plateforme RoBioMol (voir plus loin).

De cette manière nous avons pu isoler avec une excellente pureté quatre complexes membranaires de la division tardive de *S. pneumoniae*, dont l'existence était suggérée mais qui n'avaient pas pu être purifiés *in vivo* de par leurs instabilités et leurs labilités : DivIB/DivIC/FtsL, DivIB/DivIC/FtsL/PBP2x, DivIB/DivIC/FtsL/FtsW/PBP2x et FtsW/PBP2x (**Figure 3A-D**). A l'aide des tests d'activité de PBP2x — Penicillin-Binding Protein 2x protéine impliquée dans la réticulation des chaînes glycanes du PG au cours de la division — nous avons pu confirmer la fonctionnalité de la protéine au sein des complexes reconstitués (**Figure 3E**). Puisque qu'aucun autre test d'activité *in vitro* n'existe pour les protéines DivIB, DivIC, FtsL et FtsW, la fonctionnalité des autres complexes ne contenant pas PBP2x n'a pu être démontrée. Cependant, nous avons mis en évidence le rôle stabilisateur des interactions protéine-protéine au sein de chaque complexe isolé, à l'aide de tests comparatifs de digestion à la trypsine.

Ce travail a permis d'isoler des complexes de protéines membranaires spécifiquement impliqués dans la division cellulaire de *S. pneumoniae*, ce qui constitue la première étape nécessaire à la reconstitution *in vitro* de la synthèse septale de PG. Cette étude a fait l'objet de **deux publications (P17, P22)** dont une que je **co-signe** avec **Violaine Lantez**, technicienne que j'ai supervisée, en **co-auteur correspondant (P22)**.



L'ensemble des travaux réalisés au cours de ce stage postdoctoral a participé à faire progresser la compréhension du métabolisme de synthèse de PG chez le pneumocoque, en démontrant l'existence de complexes membranaires stables impliqués dans la synthèse septale de PG. Ils ouvrent la voie à une reconstitution complète de la synthèse de PG *in vitro*, qui sera essentielle pour l'élucidation de ses mécanismes de régulation extrêmement complexes.

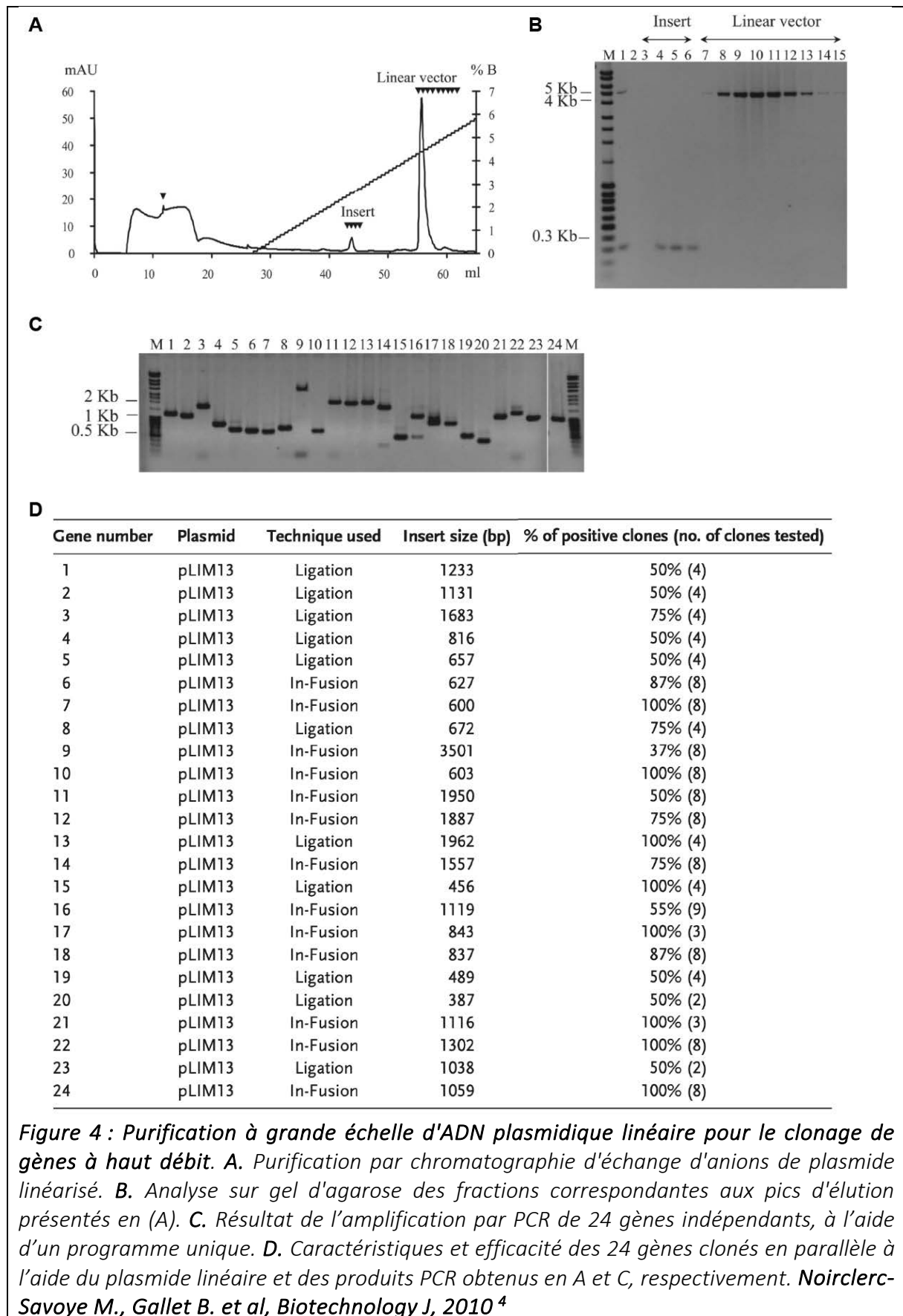
3.2- INGENIEURE DE RECHERCHE

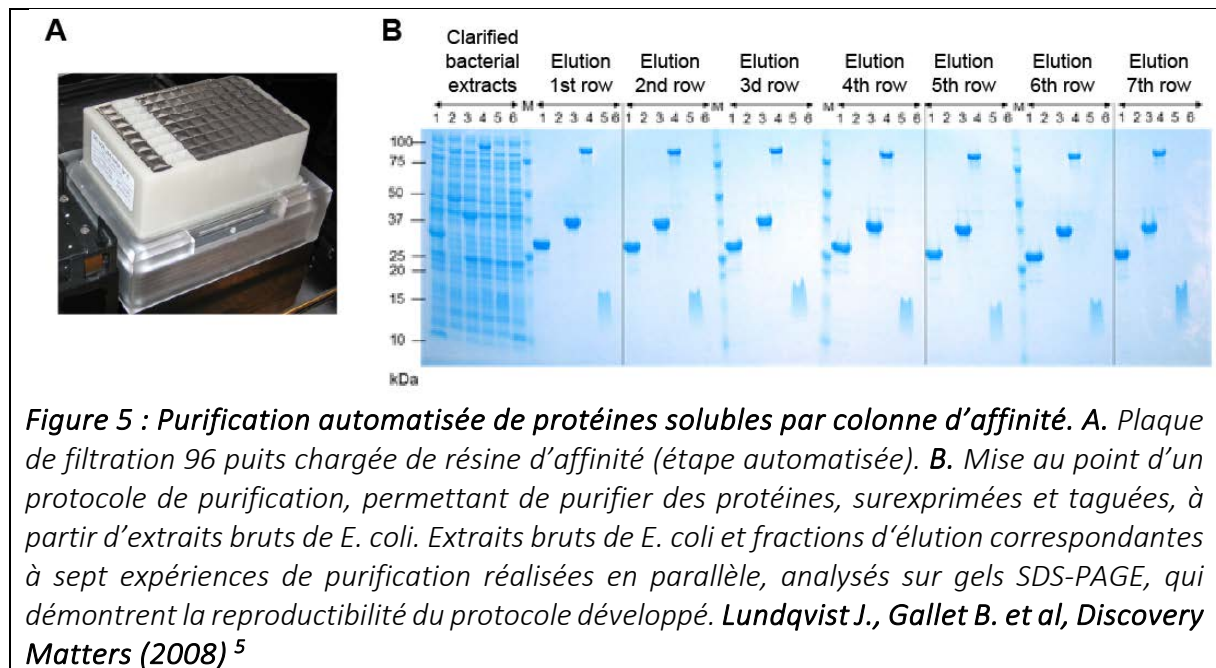
3.2.1- Plateforme RoBioMol (2004-2013)

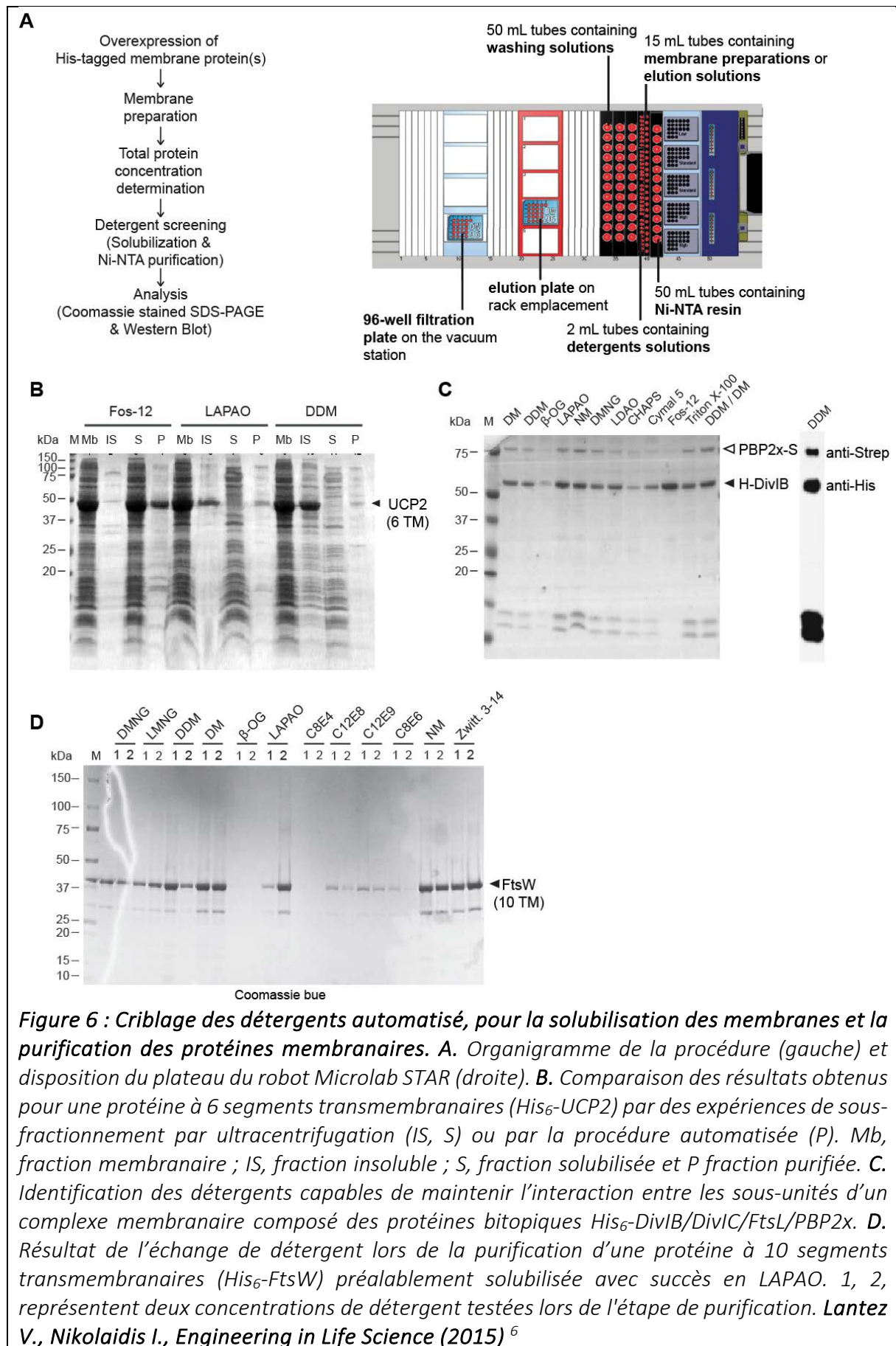
A la fin de mon contrat postdoctoral, Thierry Vernet m'a proposé de rester au sein de son laboratoire pour monter avec lui la plateforme (PF) automatisée RoBioMol, PF de services

spécialisée dans les processus de biologie moléculaire et biochimie des protéines à haut débit. J'ai tout d'abord été embauchée, fin 2004, en CDI par la Fondation Rhône Alpes Futur, puis j'ai obtenu un poste permanent d'ingénieure de recherche au CEA en 2008. Durant toute cette période, j'ai eu la chance de travailler avec Benoit Gallet, recruté en tant que technicien sur la PF jusqu'en 2010, puis Violaine Lantez embauchée en CDD de 2011 à 2012 et enfin Anne-Marie Villard arrivée en renfort en 2012. J'ai été responsable de la PF jusqu'à fin 2013.

Pour monter cette PF *de novo* nous avons dû au préalable faire une étude comparative des automates disponibles sur le marché, visiter les laboratoires académiques pionniers dans l'automatisation et le haut débit, et rédiger les cahiers des charges afin d'acquérir les deux systèmes d'automates sélectionnés (Qiagen et Hamilton). Nous avons alors développé tout un ensemble de **protocoles de biologie moléculaire** robustes et universels, permettant d'effectuer jusqu'à **96 expériences en parallèle** pour une large variété de cibles et d'être **exécutés par les automates** que nous avons acquis. L'ensemble des protocoles développés regroupent toutes les étapes nécessaires à la réalisation — en format 24-96 puits — d'expériences de (i) PCR, (ii) clonage de gènes (**Figure 4**), (iii) mutagenèse dirigée, (iv) transformation bactérienne, (v) cultures bactériennes, (vi) purification de plasmide, (vii) expression et (viii) purification de protéines solubles (**Figure 5**) et membranaires, (ix) criblage de détergents (**Figure 6**), (x) marquage isotopique (**Figure 7**) ou (xi) repliement de protéines marquées dénaturées (**Figure 8**).







L'ensemble de ces services étaient disponibles, au niveau national, à la communauté scientifique et aux industriels sous forme de campagnes organisées tout au long de l'année : (i) campagne de clonages de gènes ou de mutagenèse associées à des tests d'expression et de purification des protéines correspondantes, ou (ii) campagne de criblage de détergents pour la solubilisation et la purification de protéines membranaires (individuelles ou en complexes). RoBioMol, comme toutes les PF de l'institut, a été certifiée ISO 9001 grâce à la mise en place des procédures de qualité (rédaction des modes opératoires des protocoles utilisés, enregistrement de toutes les étapes effectuées, contrôles des équipements, ...) afin d'assurer une parfaite reproductibilité et traçabilité de l'ensemble des procédés utilisés.

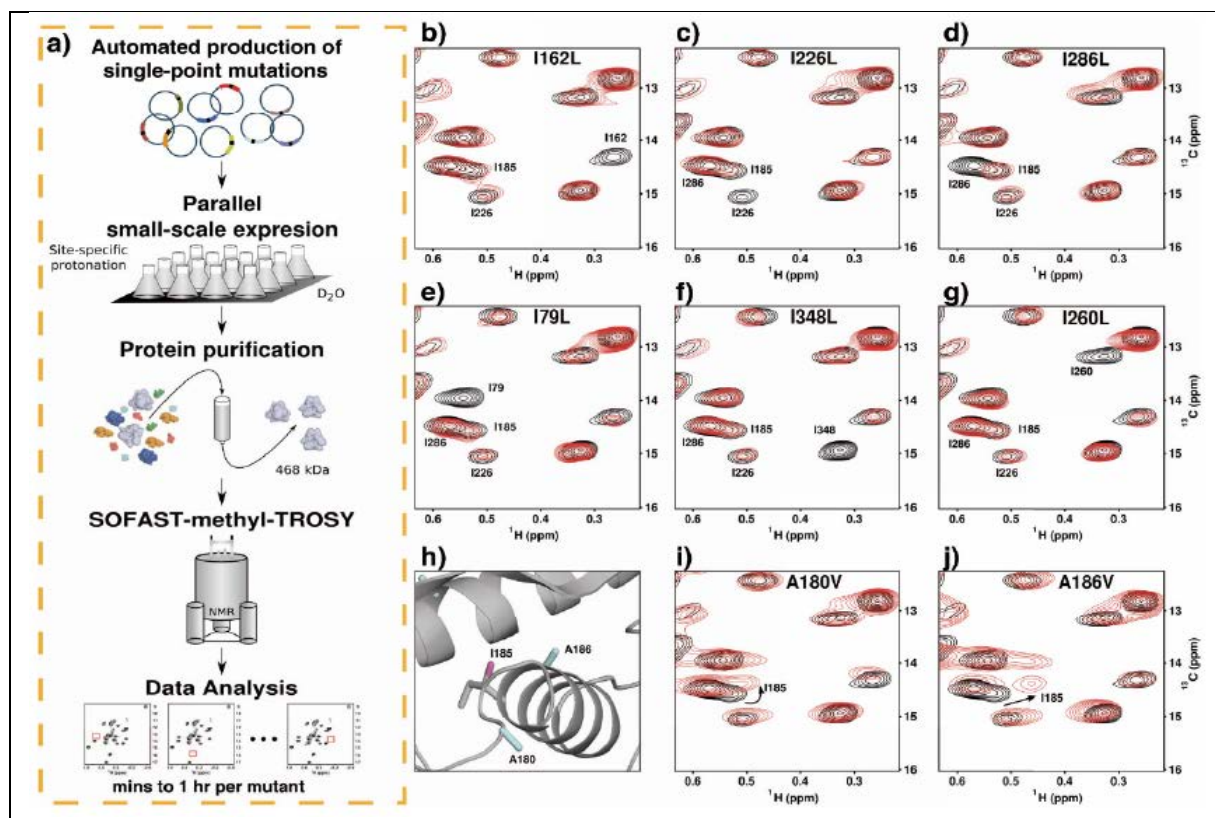
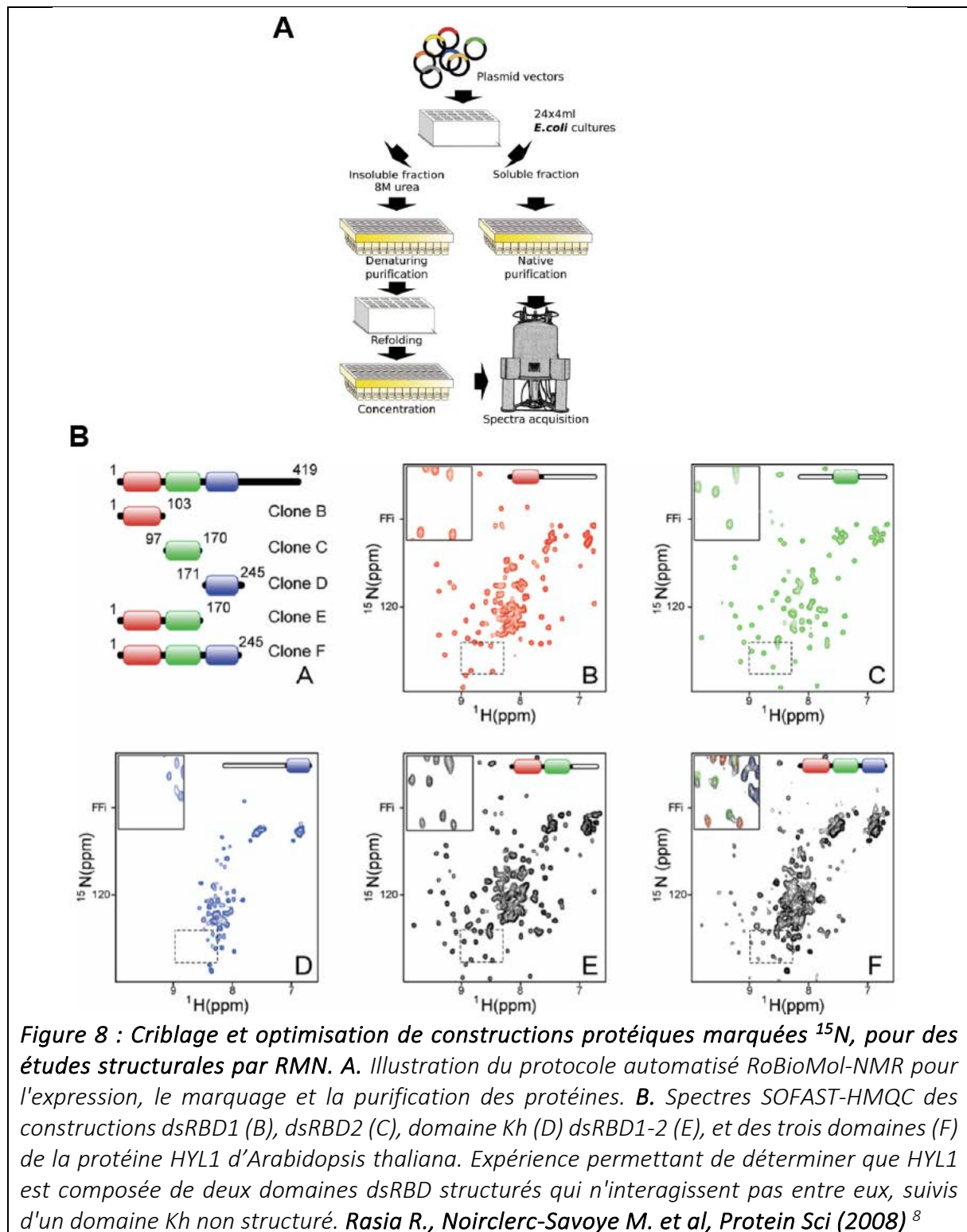


Figure 7 : Stratégie systématique basée sur la mutagenèse pour des études par RMN à l'aide de marquages isotopiques sur des groupes méthyles. a) Schéma de la stratégie d'assignation RMN parallèle basée sur les mutations et des marquages spécifiques de groupes méthyles. b-g) Exemples de spectres de mutants utilisés pour assigner des corrélations d'isoleucines individuelles. En noir, spectres de référence de la protéine native, en rouge, spectres des protéines mutantes. Amero C., Asuncion Dura M. et al, J Biol Mol (2011) ⁷



Durant toutes ces années où j'ai été en charge de la PF RoBioMol, j'ai directement **supervisé** le travail des **3 technicien(ne)s**, avec qui j'ai étroitement travaillé. Malgré l'appartenance à une plateforme de service, j'ai toujours cherché à valoriser les développements effectués par la PF sous forme de publications scientifiques. J'ai aussi accordé beaucoup d'importance et pris beaucoup de plaisir à **former des étudiants** dont j'ai été la maître de stage : **Mathias Rechenmann (Master 2)** avec qui je **co-signe** la **publication P25** en tant qu'auteur

correspondant ; Xavier Gérard et Sandrine Soaritia (Masters 1) ; Yacine Niang et Florence Gerin (Licences 3) ; Marilyne Summo, Ophélie Neurdin et Amélie Bochu (BTS). L'activité RoBioMol a permis de publier **10 publications** directement liées à ses développements (**Publications P7, P9, P13, P25**) ou à ses collaborations (**Publications P10, P12, P15, P21, P23, P26**) (**Figures 7 et 8**) et a été reconnue comme **prestataire** dans une **ANR financée en 2012** (ANR ARCHELYSE, Bruno Franzetti). Durant cette période, j'ai été **partenaire** de **quatre ANR** (DSPF, D. Bourgeois ; PneumoPG, A. Zapun ; NanoLife@work, J. Boisbouvier ; SOxygen, A. Royant).

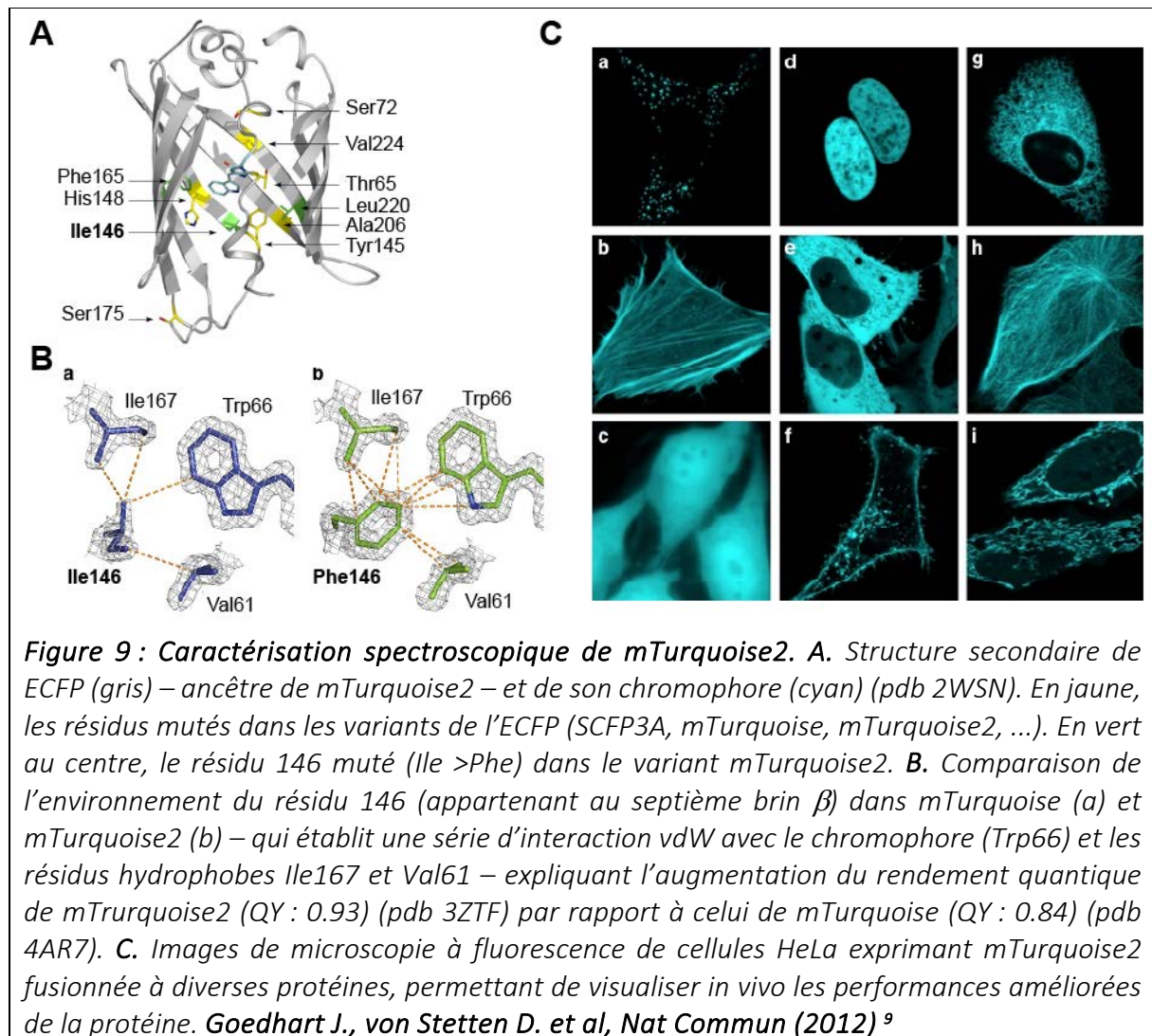
3.2.2- Collaboration sur les protéines fluorescentes, avec Antoine Royant

En parallèle de l'activité de la PF RoBioMol, j'ai initié une étroite collaboration avec Antoine Royant — chercheur CNRS dans l'équipe de Dominique Bourgeois (IBS) — sur la caractérisation de protéines fluorescentes, afin de déterminer les détails structuraux responsables de leurs propriétés de fluorescence dans le but d'établir des stratégies d'amélioration. Cette collaboration a débuté par la caractérisation de l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), protéine utilisée comme outil rapporteur au sein d'expériences de criblage d'expression protéique par la PF RoBioMol.

Caractérisation des protéines fluorescentes

La GFP, et plus largement les protéines fluorescentes (FP), ont révolutionné les sciences de la vie en permettant de suivre l'expression, la localisation et le mouvement *in vivo* de protéines auxquelles elles sont fusionnées. L'identification ou l'obtention de nouveaux variants de GFP, avec des propriétés spectroscopiques et biophysiques différentes, permet d'élargir la palette des applications mais nécessite souvent une certaine optimisation. Le travail principalement réalisé avec A. Royant, est basé sur la détermination des structures de variants de FP afin de relier la présence de mutations — au sein ou à proximité du chromophore — aux propriétés photophysiques ou physicochimiques d'une FP. Ces analyses permettent de suivre les améliorations progressives des variants de FP, et d'ouvrir de nouvelles perspectives sur l'évolution rationnelle des protéines fluorescentes et leurs applications.

Nos travaux ont principalement porté sur la GFP améliorée EGFP (**Publication P16**) ; la protéine Cyan ECFP (**Figure 9A**) et ses variants Cerulean, mTurquoise et mTurquoise2 (**Publications P11, P18, P19, P20, P28**) ; mais aussi la FP infrarouge IFP2.0 (**Publication P24**). Pour exemple, l'étude structurale de la protéine mTurquoise2, en comparaison avec son ancêtre mTurquoise, a permis de rationaliser l'amélioration des propriétés spectroscopiques, résultant de la stabilisation du septième brin β et du chromophore par un ensemble de liaisons de type van der Waals (vdW), (**Figure 9B**). La protéine mTurquoise2 devient la variante cyan préférée pour l'imagerie (**Figure 9C**) et le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) à une protéine fluorescente jaune.



L'ensemble de cette collaboration a été productive (**8 publications**) et m'a permis d'être **partenaire** de deux ANR (ANR Blanc obtenue par Dominique Bourgeois en 2007 (Projet DSPF) et ANR Jeune Chercheur obtenue par Antoine Royant en 2011 (Projet SOxygen)) et de **co-superviser** avec A. Royant le travail de **Céline Lafaye**, **postdoctorante** embauchée dans le cadre de l'ANR SOxygen et avec laquelle je **co-signe 2 publications (P24, P31)**.

3.2.3- Groupe Epigen dans l'équipe de Carlo Petosa

En 2014, j'ai souhaité retrouver un poste 100% recherche, en acceptant de changer d'équipe et de projet de recherche. C'est dans ce contexte que j'ai quitté la PF RoBioMol et rejoint l'équipe de Carlo Petosa au sein du groupe VIC (Viral Infection and Cancer), aujourd'hui devenu Epigen (Epigenetics and molecular pathways). L'équipe de C. Petosa s'est toujours intéressée à l'étude structurale et fonctionnelle des protéines ayant une interaction avec des acides nucléiques, y compris des facteurs qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de gènes. Les travaux de l'équipe portent sur : (i) l'inhibition des cibles épigénétiques dans les champignons pathogènes, (ii) la structure du nucléosome et de la chromatine et (iii) le transport nucléocytoplasmique des protéines du VIH. Le but commun de ces études est d'utiliser les données structurales — obtenues, par cristallographie aux rayons-

X, cryo-microscopie électronique (cryo-ME) et techniques complémentaires — pour faciliter le développement de nouvelles molécules d'utilité thérapeutique.

Depuis octobre 2020, en parallèle de mon **implication principale dans le sujet sur l'import nucléaire de Rev du VIH-1**, je **co-supervise** le travail de **thèse d'Hasan Dawi**, sur la **mise au point d'une nouvelle stratégie antifongique contre une levure émergente mortelle : *Candida auris***. Ma supervision porte principalement sur les activités biochimiques et biophysiques d'Hasan, d'un point de vue méthodologique et stratégique, et sur la communication de ses résultats, plus que sur la thématique de recherche en elle-même, pour laquelle Carlo Petosa est en étroite collaboration avec Jérôme Govin à Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB) de Grenoble.

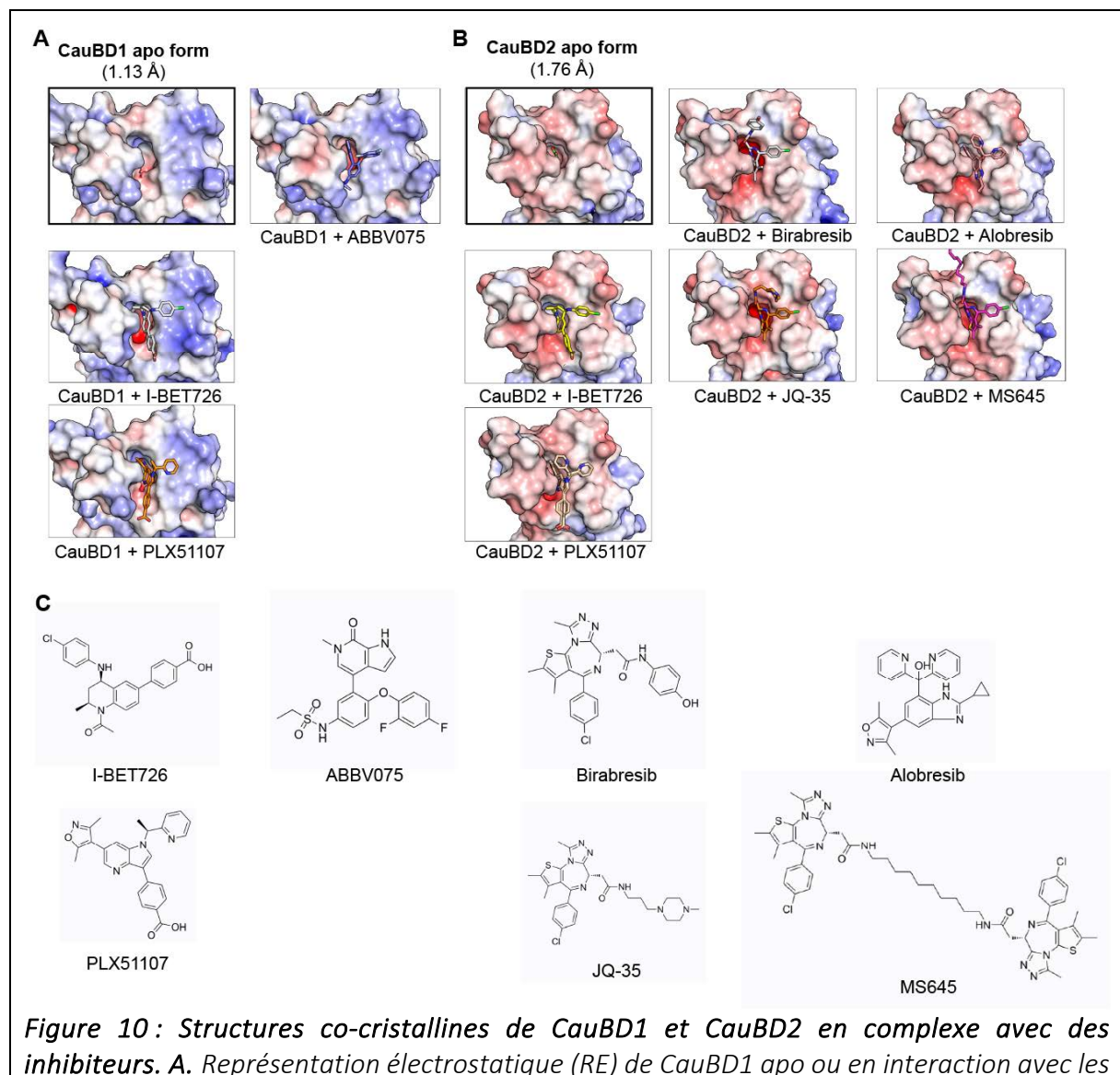
Pour des raisons de clarté de ce manuscrit je souhaite (1) présenter succinctement le travail d'Hasan Dawi sur la mise au point d'une nouvelle stratégie antifongique contre une levure émergente mortelle : *Candida auris*, puis (2) présenter de manière un peu plus détaillée le travail réalisé, depuis mon intégration dans l'équipe de Carlo, sur le transport nucléocytoplasmique de la protéine Rev du VIH-1, en lien avec le projet de recherche que je propose de mener ces prochaines années.

A- Mise au point d'une nouvelle stratégie antifongique contre une levure émergente mortelle : *Candida auris*

Les levures du genre *Candida* font partie des pathogènes fongiques humains les plus importants, responsables d'infections invasives associées à une mortalité dans 30-40% des cas. La vulnérabilité de l'homme à ces infections est notamment accrue chez les personnes immunodéprimées, comme celles atteintes du SIDA, et l'utilisation de médicaments antifongiques conventionnels (tels que les azoles et les polyènes) semblent conduire à un échec clinique. Parmi les champignons commensaux humains, la levure multi-drogues résistante *Candida auris* est responsable d'une part croissante et inquiétante des infections fongiques en milieu hospitalier. Ce constat crée un besoin urgent de trouver de nouveaux agents thérapeutiques pour combattre ce pathogène. Les protéines bromodomaines et extra-terminales (BET), qui reconnaissent les lysines acétylées des histones à l'aide de leurs bromodomaines (BD), sont impliquées dans la régulation de la transcription des gènes et l'organisation de la chromatine. La protéine Bdf1, est l'unique représentante de la famille de protéines BET chez les espèces de *Candida*, et a été préalablement identifiée au laboratoire comme nouvelle cible antifongique chez *C. albicans*. Bdf1 contient deux BD, essentiels à la survie de *C. albicans* et *C. glabrata*.

La thèse d'Hasan Dawi se focalise sur Bdf1 de *C. auris* (CauBdf1), afin d'identifier de petites molécules inhibitrices spécifiques de chacun des deux BD sans inhiber de manière significative les BD des BET humaines. Cependant, le projet de trouver des composés ayant une activité antifongique significative *in vivo* reste ambitieux, de par la capacité des champignons à évacuer les composés toxiques par des pompes à efflux.

Durant ces trois dernières années, Hasan s'est principalement intéressé (i) à caractériser biochimiquement et biophysiquement l'interaction de 21 inhibiteurs connus pour lier BD1 et BD2 des protéines BET humaines, (ii) à déterminer des structures cristallines de chacun des BD liés ou non à un sous-ensemble d'inhibiteurs les plus prometteurs pour *C. auris* (**Figure 10**), et (iii) à réaliser des tests d'inhibition de la croissance cellulaire sur diverses souches fongiques (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. auris*) afin d'évaluer *in vivo* l'activité et la spécificité des inhibiteurs sélectionnés (en collaboration avec le laboratoire de Jérôme Govin, IAB). L'ensemble de ce travail a demandé une part importante d'optimisation expérimentale (i) pour obtenir des constructions protéiques stables et pures, compatibles avec des tests biochimiques ou de cristallisation/diffraction, (ii) pour réaliser de manière reproductible des tests d'interaction protéine-inhibiteur *in vitro*, ou (iii) des tests d'inhibition de croissance *in vivo*. L'ensemble du travail réalisé par Hasan a permis d'identifier jusqu'alors deux composés qui semblent être prometteurs pour l'inhibition spécifique de BD1 et BD2 sur plusieurs espèces de *Candida*, et qui devraient participer à la recherche et au développement de nouvelles molécules inhibitrices plus puissantes et plus sélectives (en collaboration avec le groupe de chimie médicinale de Charles McKenna à Los Angeles).



inhibiteurs I-BET726, PLX51107 et ABBV075. B. RE de CauBD2 apo ou en interaction avec les inhibiteurs I-BET726, PLX51107 Birabresib, JQ-35, Alobresib et MS645. C. Structure chimique des inhibiteurs co-cristallisés avec CauBD1 ou CauBD2.

La quantité et la qualité des résultats obtenus jusqu'à maintenant par Hasan, et la prévision de ceux qu'il devrait obtenir dans les prochains mois, devraient lui permettre de soutenir sa thèse dans d'excellentes conditions, en octobre 2024.

B- Transport nucléocytoplasmique des protéines du VIH : étude structurale de l'import nucléaire de la protéine Rev du VIH-1

En 2014, l'une des principales thématiques de l'équipe de C. Petosa était l'étude du transport nucléocytoplasmique de la protéine Rev (import et export), pour laquelle C. Petosa a obtenu une ATIPE en 2008. L'objectif principal du projet « Études structurales du transport nucléocytoplasmique du VIH-1 Rev et Tat » était de résoudre la structure du complexe hétérotrimérique CRM1/Rev/Ran et des complexes hétérodimériques Imp β /Rev et Imp β /Tat, identifiés comme cibles pour inhiber la réplication du virus.

A mon arrivée dans l'équipe, j'ai apporté mon soutien scientifique à Didier Spittler qui avait débuté sa thèse 2 ans et demi plus tôt (2011-2015) sur l'import nucléaire de Rev, dans un contexte où aucune donnée structurale du complexe Imp β /Rev n'avait été obtenue par cristallographie. Cette position m'a amené à **co-superviser la fin de son travail de thèse**. Après la soutenance de **Didier Spittler**, j'ai poursuivi le sujet afin d'obtenir les données supplémentaires permettant de publier et valoriser le travail de thèse de Didier. C'est dans ce cadre que j'ai supervisé le travail de **Rose-Laure Indorato (technicienne permanente)**, **Simon Harris (étudiant M2)**, **Nadia Ben Fadhel (étudiante M1 & M2)** et **Lama Shamseddine (étudiante M1)**, avec qui je **co-signe deux publications** en étant **auteur correspondant (Publications P30 et P32)**.

L'infection par le VIH reste un problème sanitaire mondial malgré des progrès scientifiques remarquables et des **traitements antirétroviraux (ARV)** améliorés. Bien que la mise sous traitement de prévention précoce permette une espérance de vie qui tend à celle de la population générale, les effets secondaires à court et plus long terme ainsi que l'émergence de variants résistants aux ARV, illustrent l'intérêt de continuer à trouver de nouvelles thérapies. Actuellement, 5 des 8 étapes du cycle de réplication du VIH sont ciblées par les molécules antirétrovirales, mais parmi la vingtaine d'antirétroviraux existants à ce jour, **aucun ne cible l'import nucléaire de Rev pourtant essentielle à la réplication virale du VIH-1**. La caractérisation structurale à résolution atomique du complexe Imp β /Rev s'inscrit donc dans un programme d'identification de cible potentielle de lutte contre la réplication virale du VIH-1.

Pour cette partie du rapport, j'ai fait le choix de faire une introduction très restreinte sur Rev et Imp β afin de privilégier une présentation plus complète dans la partie « projet de recherche ».

B1- Caractérisation de la protéine Rev en interaction avec la protéine humaine Importine β

Rev (Regulator of Expression of Virion) est une protéine nucléocytoplasmique de liaison à l'ARN, exprimée en phase précoce de l'infection du VIH-1 et essentielle à la synthèse de nouvelles particules virales. Pour assurer sa fonction, Rev doit être importée dans le noyau par la protéine humaine Importine β (Imp β)^{10, 11, 12, 13}. Imp β est une protéine humaine nucléocytoplasmique impliquée dans le transport nucléaire – en association avec la protéine cellulaire Importine alpha (Imp α) – des protéines porteuses d'un signal de localisation nucléaire (NLS) (pour revue^{14, 15}). La protéine Rev, contourne cette voie d'import dépendante de Imp α , en interagissant directement avec Imp β ¹³. L'interaction entre Rev et Imp β est directe, et l'inhibition spécifique de cette interaction bloque l'import nucléaire de Rev^{11, 13}. Bien que cette interaction ait été décrite et étudiée *in vitro* depuis la fin des années 90, les détails moléculaires de cette interaction restent encore mal connus¹⁶.

L'étude de l'interaction entre Imp β et Rev a pu être initiée grâce à une forte optimisation de la purification de Rev, et une reconstitution *in vitro* du complexe à partir des protéines Rev et Imp β purifiées individuellement. Malgré l'obtention d'un complexe homogène extrêmement pur, les essais de cristallisation se sont avérés infructueux. La caractérisation de l'interaction entre Imp β et Rev a alors été réalisée par un **ensemble d'analyses biochimiques et biophysiques** approfondies. La formation du complexe Imp β /Rev a été étudiée par chromatographie d'exclusion de taille (SEC), gel natif et spectrométrie de masse native et les résidus impliqués dans la stabilité du complexe ont été identifiés par réticulation couplée à la spectrométrie de masse (XL-MS), polarisation de fluorescence et RMN.

Les résultats principaux de cette étude sont résumés dans la Figure 11. Ils montrent que :

(i) Imp β , lie successivement deux monomères de Rev, par l'intermédiaire de deux sites de liaison indépendants de haute et de basse affinité (sites C et N, respectivement) (**Figure 11A-C**). Ce résultat était inattendu puisque dans tous les complexes Imp β /protéine cargo caractérisés à ce jour, Imp β lie toujours une seule molécule de protéine cargo.

(ii) Imp β conserve une conformation étendue lors de sa liaison avec Rev (**Figure 11D**).

(iii) Rev se lie spécifiquement à la surface interne de Imp β , par son domaine hélicoïdal structuré en épingle à cheveux (**Figure 11C,E**)

(iv) L'interaction entre Rev et Imp β engage des résidus arginine (chargés positivement) spécifiques de Rev et des résidus aspartate ou glutamate (chargés négativement) de Imp β (**Figure 11F**).

L'ensemble de ces données, couplées à des simulations d'amarrage moléculaires, ont permis d'identifier un site probable de fixation de Rev et de proposer un **premier modèle structural hypothétique de Imp β en interaction avec le premier monomère de Rev**, au site C de plus haute affinité de Imp β (**Figure 11G**).

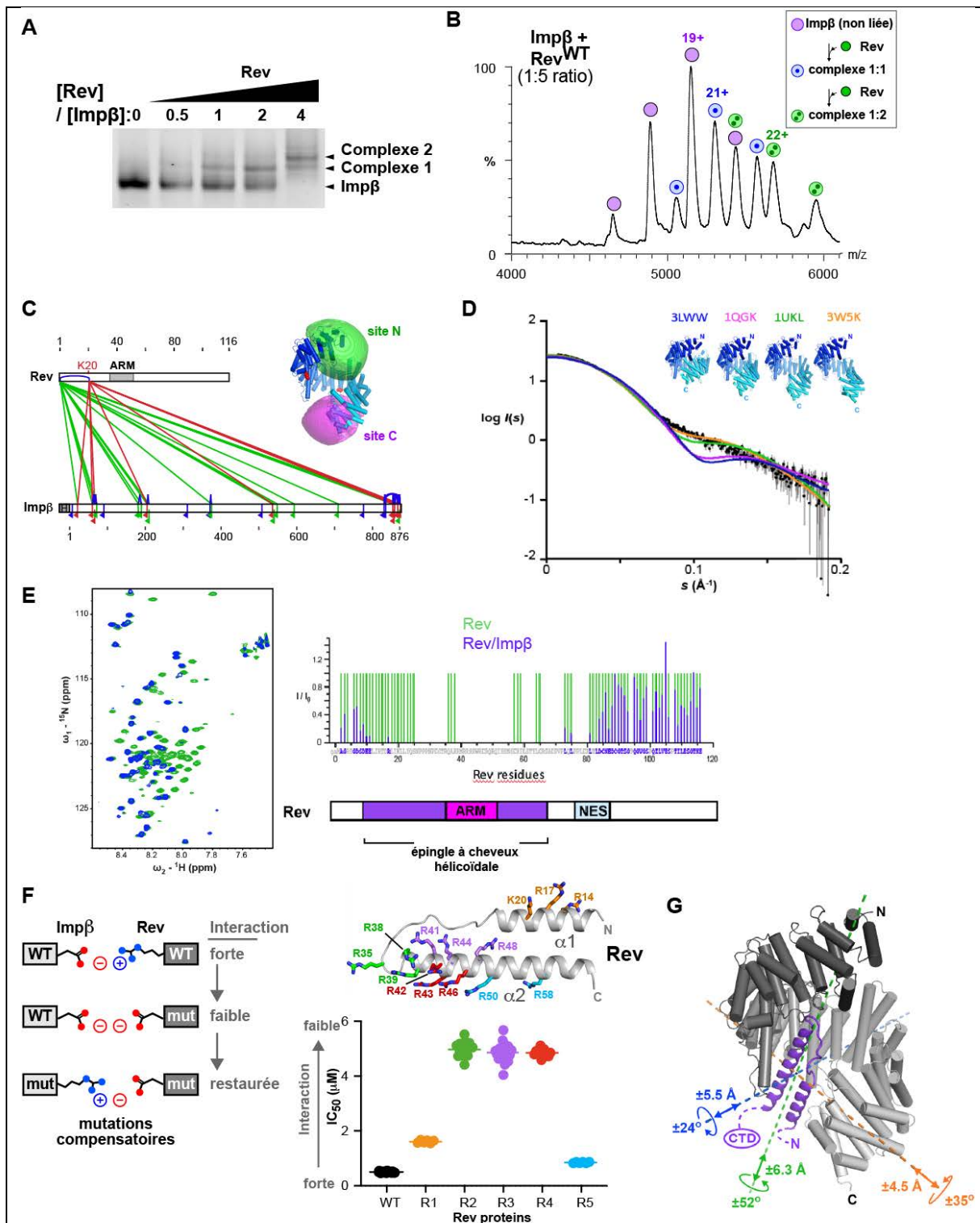


Figure 11 : Caractérisation biophysique et modèle structural hypothétique de l'interaction entre Impβ et Rev. A-B. Analyse montrant l'association de Impβ avec un ou deux monomères de Rev par migration sur gel natif (A) ou par spectrométrie de masse native (B). C. Données de réticulation couplée à la spectrométrie de masse (XL-MS), permettant de localiser deux régions de liaison de Rev sur Impβ, dénommés sites N et C. D. Données expérimentales de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) du complexe Impβ/Rev (en noir) comparées aux courbes de SAXS théoriques (en couleurs) des structures cristallographiques de Impβ en interaction avec des protéines cargos IBBspn1, IBBα, SREBP2 et Snail (codes PDB : 3LWW,

1QGK, 1UKL et 3W5K, respectivement). Ces résultats montrent que Imp β garde une conformation allongée lorsqu'elle s'associe avec Rev. **E.** Analyse RMN de la liaison de Rev par Imp β . Gauche : Spectre $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC de Rev en absence (vert) ou en présence (bleu) de Imp β , Droite : Rapport des intensités des pics pour les résidus de Rev en absence et en présence de Imp β . Ces résultats montrent que Imp β fixe Rev par son domaine en épingle à cheveux. **F.** Mutations d'inversion de charge, couplées à des expériences de polarisation de fluorescence. Les données représentées montrent que certaines mutations de Rev de type Arg \rightarrow Asp compromettent l'interaction avec Imp β . Des mutations inverses de Imp β (Asp/Glu \rightarrow Arg) permettent de restaurer cette affinité (données non représentées). Ces résultats permettent d'identifier des résidus de Rev et de Imp β situés à proximité les uns des autres. **G.** Modèle hypothétique de Imp β en interaction avec la première molécule de Rev liée au site C de Imp β . L'emplacement de Rev dans ce modèle est très approximatif : l'incertitude de son orientation et sa position est indiquée par les chiffres en bleu, vert et orange. L'emplacement de la deuxième molécule de Rev n'est pas pris en compte par ce modèle. **Spittler, D., Indorato, R-L. et al, Life Science Alliance (2022)** ¹⁷

Ces résultats éclairent la base moléculaire de la reconnaissance de Rev par Imp β et mettent en évidence un comportement de liaison séquentielle atypique, qui distingue Rev des autres protéines cargos cellulaires canoniques importées dans le noyau par Imp β . Cette étude, récemment publiée dans Life Science Alliance (**Publication P32**, pour laquelle je suis **co-auteur correspondant**), rassemble les **travaux de thèse** de **Didier Spittler**, enrichis par de nombreuses études complémentaires réalisées avec l'aide de **Rose-Laure Indorato** (technicienne permanente), **Simon Harris** (étudiant M2) et **Lama Shamseddine** (étudiante M1), que j'ai directement **encadrés**.

B2- Impact de la phosphorylation de Rev sur l'interaction avec Imp β

Rev existe en tant que phosphoprotéine *in vivo* ^{18, 19}. Bien que la/les kinase(s) responsable(s) n'ai(en)t pas encore été identifiée(s), des études montrent que la phosphorylation a lieu dans le noyau et se produit exclusivement sur les résidus sérine ^{18, 19, 20}. Puisque la phosphorylation de résidus est capable de moduler la nature et la force des interactions protéine-protéine et entraîner la stabilisation de complexes ²¹, nous avons naturellement étudié l'impact de la phosphorylation de Rev sur sa capacité à interagir avec Imp β , afin de déterminer si cette modification post-traductionnelle (PTM) pouvait stabiliser l'interaction entre les deux protéines et peut-être nous aider à obtenir des cristaux et des données cristallographiques du complexe.

Sur les 11 résidus sérine contenus dans la séquence de Rev, 6 ont été identifiés comme des sites potentiels de phosphorylation ^{20, 22, 23, 24, 25} : 2 dans la queue N-terminale (Ser5 et Ser8), 2 dans le domaine hélicoïdal en épingle à cheveux (Ser54 et Ser56), et 2 dans le domaine C-terminal (Ser92 et Ser99). Quatre de ces résidus sérine sont hautement conservés dans le groupe M du VIH-1 – responsable de la majorité de l'épidémie mondiale – alors qu'aucun n'est conservé dans le VIH-2, moins virulent (**Figure 12A**).

Afin de tester l'impact de la phosphorylation de Rev sur sa capacité à interagir avec Imp β et à former un complexe hétérodimérique stable, (i) des mutations de substitution (Ser > Glu) ont été introduites de manière combinée ou isolée afin de mimer la phosphorylation des résidus

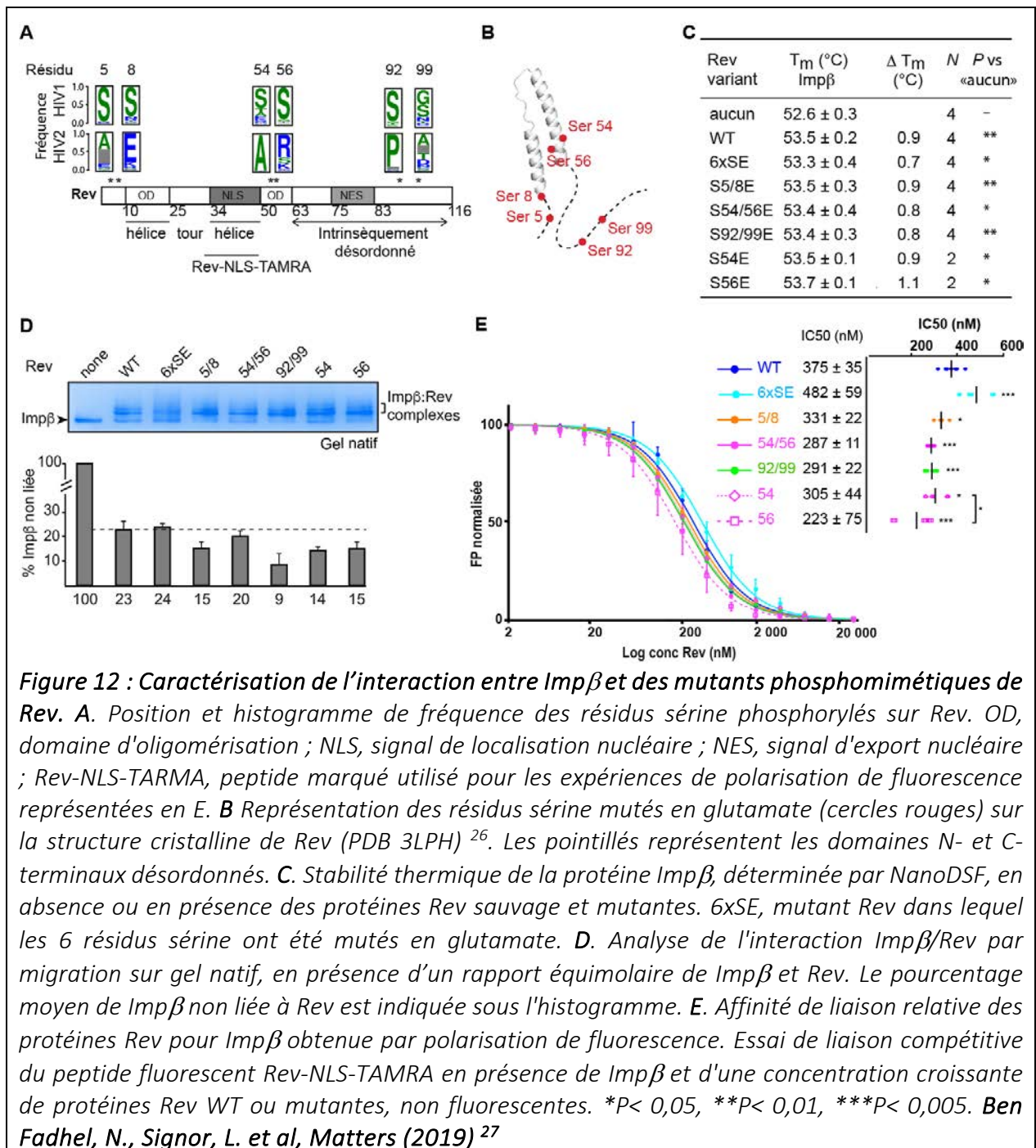
précédemment identifiés dans la littérature (**Figure 12B**) et (ii) les affinités des protéines Rev mutantes avec Imp β ont été comparées par des tests d'interactions biochimiques.

Les résultats de cette étude sont résumés dans la Figure 12. Ils montrent que :

(i) les mutations phosphomimétiques introduites dans la queue N-terminale, le domaine hélicoïdal en épingle à cheveux ou le domaine C-terminal de Rev ont un effet stabilisateur faible mais reproductible sur le complexe Imp β /Rev (**Figure 12C-E**).

(ii) l'effet stabilisateur de S56E, par rapport aux autres mutations testées, indique que la face du domaine en épingle à cheveux de Rev contenant la Sérine 56 est orientée vers Imp β et participe à la stabilisation du complexe.

Bien que ces résultats suggèrent que la phosphorylation peut moduler de manière significative la capacité de Rev à s'associer à Imp β , les tests de cristallisation réalisés avec le complexe Imp β /RevS56E sont restés infructueux, nous poussant à envisager une autre stratégie pour obtenir des informations structurales à haute résolution du complexe Imp β /Rev (voir projet de recherche proposé).



Cette étude, qui a été le sujet des **stages M1 et M2** de **Nadia Ben Fadhel**, et a été valorisée par une **publication** dans **Matters (P30)**, que je **co-signe** avec l'étudiante en étant qu'**auteur correspondant**.

4- PROJET DE RECHERCHE

Le projet de recherche que je propose de développer est en continuité avec la thématique dans laquelle j'ai été principalement impliquée depuis mon arrivée dans l'équipe de C. Petosa : l'étude de **l'import nucléaire de la protéine Rev du VIH-1**.

Ce projet a pour objectif **d'identifier et de caractériser les étapes clés de l'import de Rev dans les cellules humaines infectées** par le VIH-1, notamment en essayant de comprendre comment la protéine virale Rev détourne l'activité de plusieurs protéines humaines pour être spécifiquement importée dans le noyau. Ce projet serait dans un premier temps focalisé sur l'import nucléaire de Rev dans les lymphocytes T CD4+, principale cible du VIH, impliquant la karyophérine **Importine β (Imp β)**. L'import nucléaire de Rev dans d'autres types cellulaires, impliquant d'autres protéines de la famille des karyophérines β pourrait être étudié dans un second temps, afin d'apprécier la spécificité des interactions en fonction des lignées cellulaires infectées par le virus. Cependant, je souhaiterais surtout élargir le sujet à une deuxième protéine humaine, la **Nucléophosmine (NPM1)**, dont l'implication dans l'infection et la réplication du VIH humain a récemment été décrite, et dont le rôle régulateur dans la localisation nucléaire de Rev serait dépendant de la voie d'import médiée par Imp β .

Par ce travail, je souhaiterais arriver à **définir les rôles spécifiques des protéines Imp β et NPM1 dans l'import nucléaire de Rev**, en caractérisant indépendamment les **interactions de ces deux protéines avec Rev** et en obtenant des **données structurales des différents complexes** dans lesquels Rev est impliquée. Je souhaiterais déterminer si les protéines Imp β et NPM1 sont impliquées dans des voies d'import distinctes qui pourraient coexister dans la cellule, ou si elles participent à une seule et même voie. Dans tous les cas, je souhaiterais mieux comprendre les processus moléculaires qui conduisent à l'import nucléaire de Rev. La caractérisation de ces complexes protéiques dans lesquels Rev est impliquée constitue un réel défi en raison de la nature transitoire des interactions entre Rev et les partenaires qui régulent son transport nucléocytoplasmique.

A plus long terme, les structures de ces complexes, obtenues dans un cadre de recherche fondamentale, pourraient aider à la conception et au développement d'inhibiteurs spécifiques de l'import nucléaire de Rev et par conséquent de la réplication du VIH-1. La caractérisation de l'interaction de NPM1 avec Rev pourrait aussi plus largement profiter aux études d'interactions de NPM1 avec différentes protéines virales, qui ont lieu au cours d'infections humaines spécifiques.

Pour réaliser ce projet, je ferai appel à la complémentarité des compétences acquises durant mon parcours professionnel et notamment l'expertise « haut débit » que j'ai développée en tant que responsable de la PF RoBioMol, pour cribler largement les conditions nécessaires à la formation de complexes impliqués dans l'import nucléaire de Rev. Ce projet nécessitera une combinaison de méthodes de biologie structurale, d'outils biochimiques et biophysiques et de fluorescence *in cellulo*, et permettra - je l'espère - d'établir ou de renforcer des collaborations avec des experts en RMN, Cryo-ME, biologie cellulaire et criblage de petites molécules

4.1- Connaissances actuelles

4.1.1- La protéine Rev du VIH-1 est essentielle à la réplication du virus

Caractéristiques et fonctions :

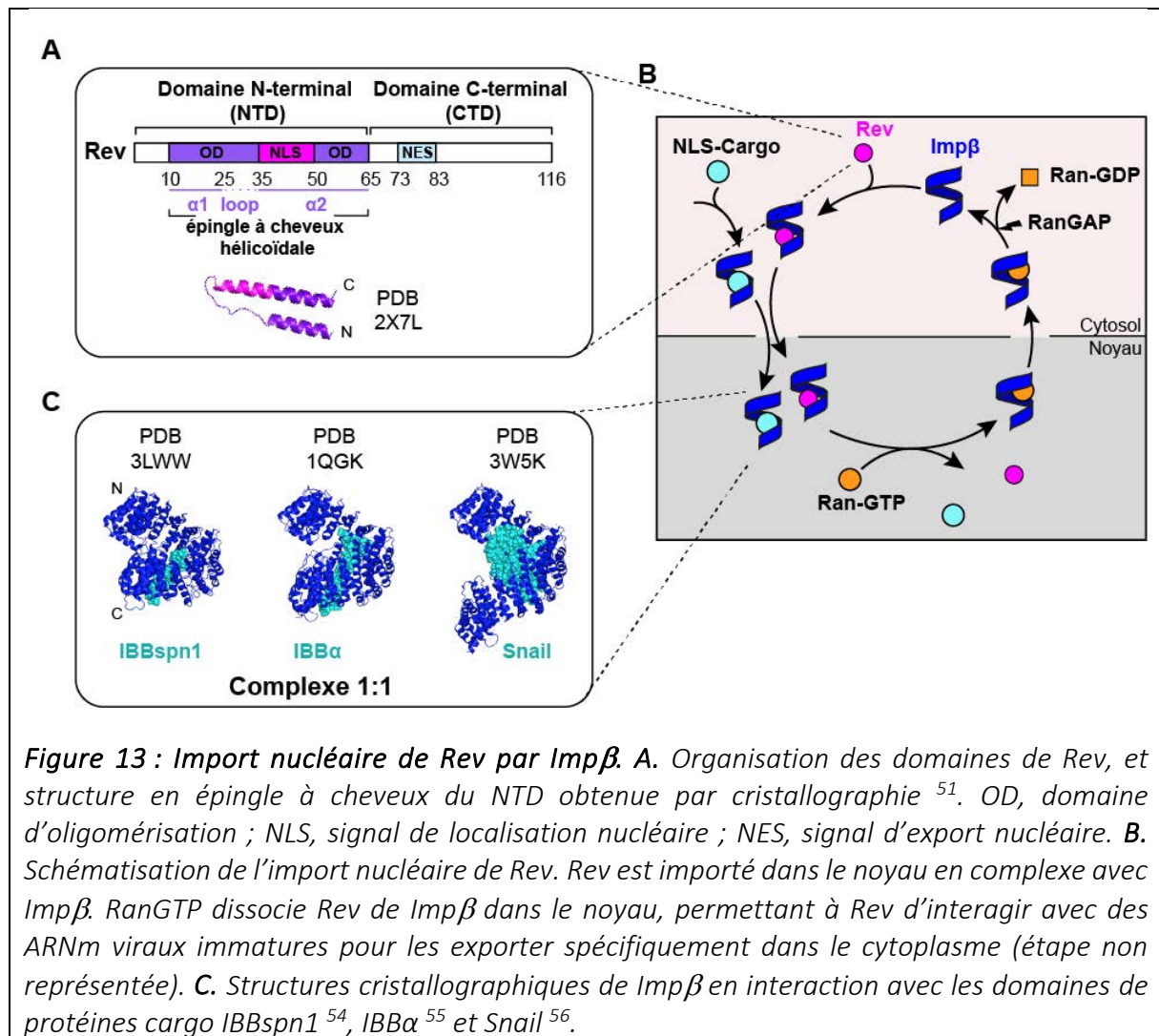
Rev est une protéine nucléocytoplasmique de 13 kDa de liaison à l'ARN, principalement localisée dans le nucléole et essentielle à la production de nouvelles particules virales. Rev est exprimée en phase précoce de l'infection du VIH-1, synthétisée à partir de molécules d'ARNm viral matures (dépourvues d'introns) ²⁸⁻³⁰ rapidement exportées vers le cytoplasme par les mécanismes endogènes de la cellule hôte ^{31, 32}. Une fois produite dans le cytoplasme, Rev est importée dans le noyau par l'intermédiaire de protéines de la famille des karyophérines β , qui reconnaissent directement le signal de localisation nucléaire (NLS) de Rev ^{10, 12}.

L'une des fonctions de la protéine Rev dans le cycle de réplication du VIH est l'export de l'ARN viral contenant des introns, du noyau vers le cytoplasme ³⁰. Dans le noyau, Rev se lie avec coopérativité sur une petite région d'ARN localisée dans un intron de l'ARN viral, appelée Rev Response Element (RRE), par l'intermédiaire de son domaine de liaison riche en arginine (ARM) ^{20, 33}. La multimérisation de Rev est cruciale pour cette fonction ³⁴, et semblerait se dérouler principalement dans le nucléole ³⁵. Le complexe Rev/RRE recrute alors le facteur d'export nucléaire de la cellule hôte CRM1/RanGTP ³⁶⁻⁴⁰, pour exporter spécifiquement les ARN viraux immatures, qui codent pour les protéines structurales et enzymatiques virales et qui constituent l'ARN génomique, nécessaires à la synthèse de nouveaux virions.

Données structurales :

Rev est composée de 116 acides aminés, organisés en un domaine N-terminal (NTD) structuré et un domaine C-terminal (CTD) intrinsèquement désordonné (**Figure 13A**). Le NTD contient le signal de localisation nucléaire et de liaison à l'ARN, riche en arginines (NLS, résidus 35-50), reconnu par Imp β ^{12, 13} et le signal de localisation nucléolaire (NoLS, résidus 45-51) reconnu par NPM1 ^{41, 42}. Le NTD comprend également deux domaines d'oligomérisation (OD) constitués de résidus hydrophobes impliqués dans la formation de multimères de Rev ⁴³⁻⁴⁵. Le CTD contient un signal d'export nucléaire (NES) reconnu dans le noyau par le complexe d'export nucléaire de la cellule hôte CRM1/RanGTP ^{46, 47}.

Différentes structures à résolution atomique de Rev ont été déterminées et sont référencées dans la Protein Data Bank (PDB) ^{26, 48-51}. Ces structures ont révélé que le NTD (résidus 10-65) forme une structure stable organisée en épingle à cheveux hélicoïdale (**Figure 13A**). Cependant, il semblerait que la fonction de Rev s'étende au-delà de ses motifs structurés et puisse impliquer des déterminants situés dans des parties apparemment plastiques de sa séquence ^{52, 53}.



4.1.2- La protéine humaine Impβ est essentielle à l'import nucléaire de Rev

L'import nucléaire de Rev dans les cellules dérivées des lymphocytes T CD4+, cible principale du VIH-1, serait réalisé par l'intermédiaire de Impβ ¹¹, bien que d'autres membres de la famille des karyophérines β tels que transportine-1, importine-5 et importine-7, peuvent également être impliqués dans d'autres cellules hôtes ¹⁰⁻¹³. L'interaction entre Rev et Impβ est directe, impliquant le NLS de Rev et un site de liaison de Impβ similaire à ou chevauchant celui qui interagit avec Importine alpha (Impα) ^{13, 55}. L'accessibilité cytoplasmique du NLS de Rev constitue une étape clé de la voie d'import nucléaire réalisée par Impβ, puisque sa séquestration par la protéine humaine MyoD family inhibitor domain-containing protein (MDFIC) inhibe spécifiquement cette voie d'import, soulignant la nature multivalente du NLS de Rev pour différents récepteurs d'import nucléaire ¹¹.

Bien que l'interaction entre Rev et Impβ ait été décrite et étudiée depuis la fin des années 90, principalement en utilisant des tests d'import nucléaire *in vitro*, les **détails moléculaires de cette interaction restent encore mal caractérisés.**

Caractéristiques et fonctions :

Imp β (KPNB1) est une protéine humaine nucléocytoplasmique de 97 kDa de la famille des karyophérines β , impliquée dans le transport nucléaire des protéines porteuses d'un NLS (appelées protéines cargo). Imp β est principalement impliquée dans le transport nucléaire en association avec la protéine cellulaire Imp α (pour revue ^{14, 15}). Ces deux protéines forment un hétérodimère par interaction directe du domaine IBB (Importin β binding domain) N-terminal de Imp α avec Imp β ⁵⁵. Imp α reconnaît alors le NLS des protéines à transporter par son domaine C-terminal ^{57, 58}. La protéine Rev, comme certaines protéines cellulaires, contourne cette voie d'import, dépendante de Imp α , en interagissant directement avec Imp β ¹³. L'interaction entre Imp β et la protéine cargo transportée (directement ou par l'intermédiaire de Imp α) est régulée par Ran ^{13, 17}, une GTPase qui est principalement liée au GTP dans le noyau et au GDP dans le cytosol (**Figure 13B**). Dans le cytosol, Imp β s'associe à la protéine cargo pour l'importer dans le noyau en passant les pores nucléaires grâce à des interactions faibles et transitoires avec des nucléoporines ⁵⁹⁻⁶¹.

Données structurales :

Plusieurs structures atomiques de Imp β ont été déterminées, à l'état non lié ^{62, 63} ou en interaction avec d'autres protéines ^{54-56, 59-61, 64-71}. Imp β adopte une structure en forme de spirale, due à la disposition en tandem de 19 répétitions HEAT (motifs structurels constitués de deux hélices α liées par une petite boucle). Cette organisation structurale entraîne une grande flexibilité de Imp β ^{62, 72}, qui est inhérente à sa capacité d'interaction avec une variété de protéines cargo et à sa fonction de transport. Son interaction avec des protéines cargo implique différents sous-ensembles de répétitions HEAT, qui confère à Imp β une structure plus ou moins allongée (**Figure 13C**). La surface convexe externe de Imp β interagit avec les protéines du pore nucléaire, tandis que RanGTP et les protéines cargos se lient à sa surface concave interne.

4.1.3- La protéine humaine NPM1 participe aussi à l'import nucléaire de Rev

La protéine Rev du VIH-1 a été l'une des premières protéines virales identifiées comme partenaire de NPM1 au début des années 90 ⁷³⁻⁷⁵. L'interaction entre Rev et NPM1 est directe ⁷⁶⁻⁷⁹, essentielle à la localisation nucléolaire de Rev et la réplication du VIH-1 ⁴² et du VIB, son homologue bovin ⁸⁰. NPM1 agirait comme une chaperonne moléculaire, augmentant la solubilité et la mobilité de Rev, qui a tendance à s'agréger dans des conditions physiologiques normales, permettant de stabiliser Rev afin qu'elle puisse effectuer plusieurs cycles d'export d'ARN viraux contenant des RRE ^{51, 73, 81, 82}. NPM1 accélérerait l'import nucléaire de Rev, de manière dépendante de la voie d'import qui implique Imp β ⁸³. Aujourd'hui, **l'association et la régulation de l'interaction de NPM1 avec Rev et le lien avec Imp β restent mal compris.**

Caractéristiques et fonctions :

La protéine nucléophosmine NPM1 (ou B23) est une protéine nucléocytoplasmique multifonctionnelle de 32 kDa de la famille des chaperonnes moléculaires nucléophosmines/nucléoplasmines (NPM) impliquées dans la prévention du mauvais repliement des protéines ⁸⁴. NPM1, phosphorylée ⁸⁵⁻⁸⁷, est un composant majeur du nucléole où elle réside sous la forme d'un oligomère stable ⁸⁸ qui favorise une séparation de phase liquide-liquide (LLPS) ⁸⁹⁻⁹¹. Malgré sa localisation nucléolaire prédominante, NPM1 est capable de passer rapidement du noyau au cytoplasme pour exercer ses nombreuses fonctions. NPM1 est en effet impliquée dans divers processus cellulaires, tels que la biogenèse des ribosomes,

la duplication des centrosomes, la réplication et la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription, la réponse au stress et le transport nucléocytoplasmique de petites protéines (pour revues ⁹²⁻⁹⁴). **NPM1 participe aussi activement à la réplication de certains virus**, en jouant un rôle fonctionnel à différents stades de la réplication virale, tels que : l'import nucléaire, la transcription, l'assemblage du génome viral et la formation de la particule finale ^{42, 73, 76, 81, 83, 86, 95-106}. Par conséquent, NPM1 pourrait constituer une **cible intéressante pour le traitement d'infections virales** (pour revue ¹⁰⁷), **y compris par le VIH-1** ^{42, 86, 106}.

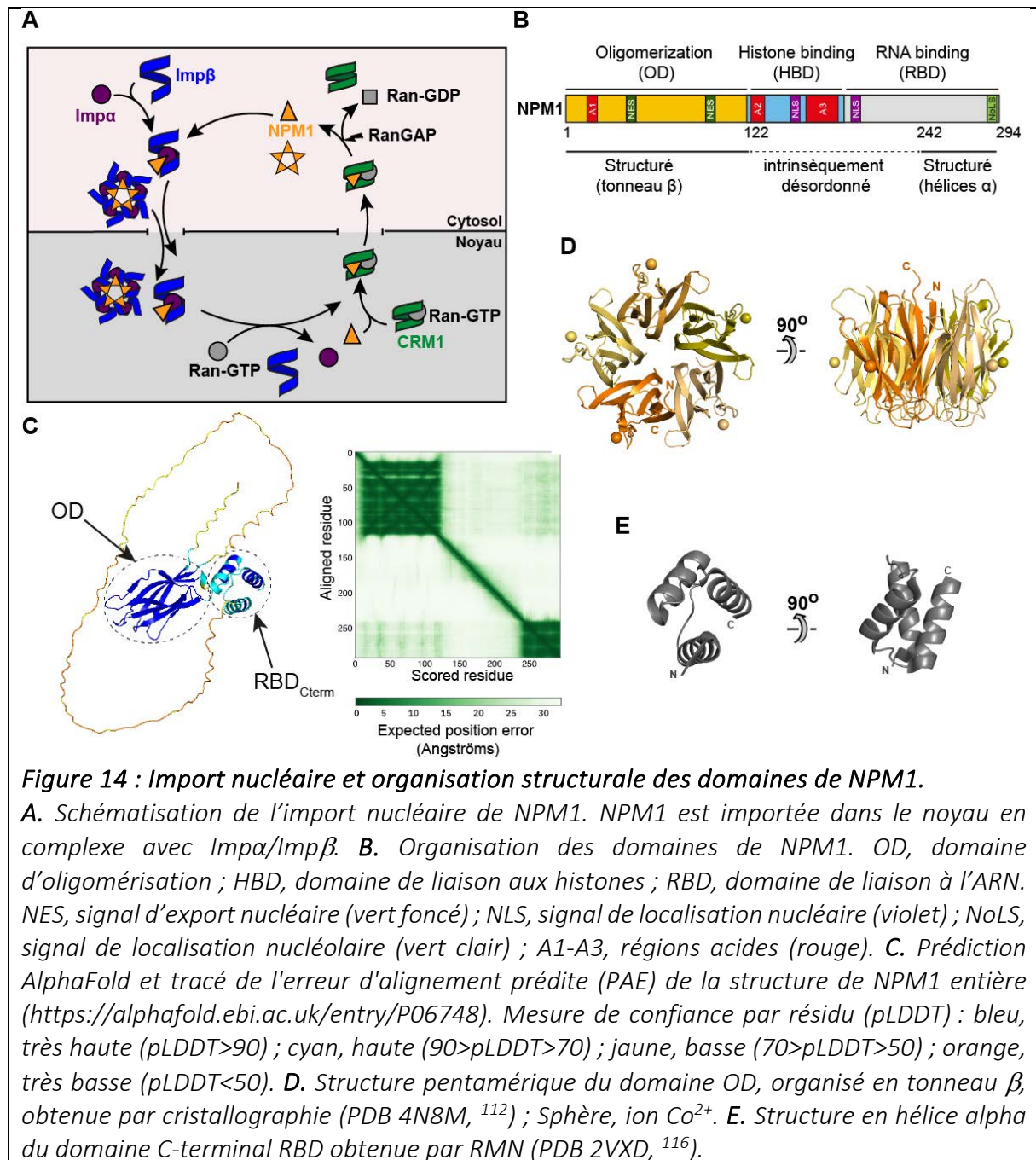
La **localisation subcellulaire et les fonctions moléculaires de NPM1 semblent être régulées** par l'interdépendance complexe entre les séquences d'import/export nucléaire (NES/NLS/NoLS) ¹⁰⁸⁻¹¹⁰, les facteurs cellulaires régis par des modifications post-traductionnelles ^{86, 111, 112}, et l'état d'oligomérisation de NPM1. Dans des conditions physiologiques, le transport nucléo-cytoplasmique de NPM1 nécessite l'intervention de facteurs protéiques de la famille des karyophérines. Par alignement de séquences entre des orthologues de NPM1 ⁵⁷ et des tests d'interactions *in vitro* ¹¹⁰, il est proposé que le NLS1 de NPM1 soit reconnu par Imp α , permettant la formation d'un complexe ternaire pentamérique composé de NPM1 et de l'hétérodimère Imp β /Imp α . Dans le noyau, le NES1 permettrait le recrutement de CRM1/RanGTP pour assurer l'export de NPM1 (**Figure 14A**) ^{108, 109}.

Données structurales

NPM1 est organisée en trois domaines : un domaine d'oligomérisation N-terminale (**OD**), un domaine central de liaison aux histones (**HBD**) et un domaine C-terminal de liaison aux acides nucléiques (**RBD**) (**Figure 14B**). Ces trois domaines fonctionnels sont impliqués dans des interactions qui ont lieu dans le cytoplasme et/ou dans le compartiment nucléaire/nucléolaire de la cellule (pour revue ¹⁰⁷).

D'un point de vue structural, le domaine NPM1-OD est un tonneau beta compact constitué de 9 brins beta connectés par des linkers flexibles, capable de former un pentamère ou un décimère (**Figure 14C,D**) ¹¹²⁻¹¹⁴. A l'autre extrémité de la protéine, le domaine C-terminal de NPM1-RBD est un domaine de liaison nucléotidique composé de 3 hélices α (**Figure 14C,E**) ^{115, 116}. Entre les deux, la région centrale composée de NPM1-HBD et de la partie N-terminale de NPM1-RBD est quant à elle prédite pour être intrinsèquement désordonnée (**Figure 14C**).

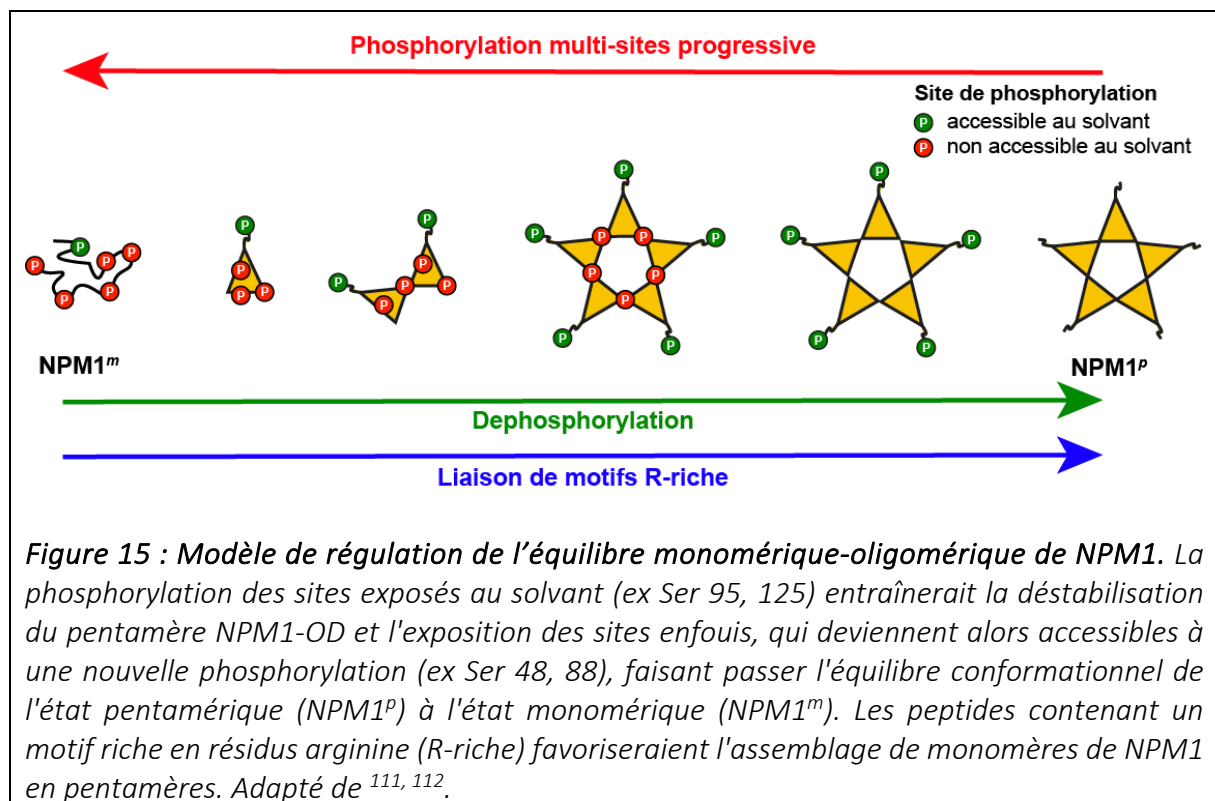
NPM1-OD est décrit comme essentiel à l'activité chaperonne de la protéine ^{81, 114} et contient une séquence riche en résidus acides (A1) et deux NES, indispensables au déplacement nucléocytoplasmique de NPM1 ^{109, 117}. NPM1-HBD contient deux séquences riches en résidus acides (A2-A3) et un NLS ^{98, 118}. NPM1-RBD contient un second NLS, une séquence enrichie en résidus basiques, et un domaine C-terminal indispensable au ciblage nucléolaire de la protéine ^{116, 119, 120}. Les motifs chargés négativement de NPM1 (A1-A3) interagissent directement avec les motifs riches en arginine (ARM) et autres NLS/NoLS de protéines hôtes et virales ^{112, 121}. La région A1, qui présente un haut degré de flexibilité entre les structures des cinq sous-unités du pentamère ¹¹², semble responsable de la reconnaissance de tous les peptides NLS testés, bien que la stœchiométrie NPM1:peptide NLS puisse être modulée par des événements de phosphorylation ¹¹². Les motifs A2-A3 pourraient interagir avec les motifs chargés positivement de la protéine pour favoriser des conformations compactes de la région intrinsèquement désordonnée ⁹⁰.



État oligomérique et phosphorylation

L'état d'oligomérisation de NPM1 semble être lié à l'activité chaperonne de la protéine ¹²². L'oligomérisation de NPM1 apparaît finement régulée par un mécanisme de phosphorylation multisite qui induit le dépliage du monomère, et par des interactions intermoléculaires qui favorisent l'assemblage de l'oligomère et la liaison avec des partenaires jouant le rôle d'interrupteurs régulateurs ^{111, 112, 123} (**Figure 15**). Bien que les transitions ordre-désordre semblent essentielles à la fonction de NPM1, le mécanisme de cette transition et sa régulation restent encore mal compris. Le changement de l'état oligomérique de NPM1 semble néanmoins être associé au contrôle de sa localisation dans le nucléole, le nucléoplasme et le cytoplasme. Des études du phosphoprotéome issus d'extraits cellulaires ont montré l'existence de l'état phosphorylé des sites exposés au solvant et enfouis de NPM1 (**Figure 15**), suggérant

que la forme monomérique de NPM1 est bien peuplée dans les cellules vivantes ^{85, 87}. La phosphorylation de ces différents résidus pourrait être le résultat de l'activité de plusieurs kinases cellulaires telles que CK2, PDK, cdc2 et p38MAPK (pour revue, ¹¹²). De manière générale, les événements de phosphorylation sont liés à l'augmentation de la flexibilité structurale des protéines, dans le but de faciliter la liaison d'un partenaire particulier ¹¹¹. Par exemple, le rôle de la phosphorylation de NPM1 – au niveau du résidu accessible au solvant Ser-125 – a été récemment mis en avant dans l'interaction et l'import nucléaire de VIH-1 Tat (protéine nucléocytoplasmique impliquée dans la transactivation du génome viral) et dans l'activation de la transcription virale, démontrant un lien entre phosphorylation de NPM1 et infection du VIH-1 ⁸⁶.



Il est intéressant de noter à ce stade que le comportement polymorphe de NPM1 observé expérimentalement n'est pas détecté par les algorithmes standards de prédiction de domaines non structurés ou de structures secondaires ¹¹¹, ni même par les logiciels de prédiction de structures des protéines à partir de leur séquence en acides aminés (Figure 14C), qui prédisent la même organisation structurale de NPM1, sous forme monomérique ou oligomérique.

4.2- Objectifs et hypothèses de travail :

La protéine Rev interagit avec les protéines humaines Imp β et NPM1. La question de savoir **comment le transport nucléocytoplasmique de Rev est influencé et affecté par l'activité et le transport nucléocytoplasmique de Imp β et NPM1** reste ouverte et intrigante. Il a été proposé que la protéine NPM1 pourrait avoir un rôle de facteur accessoire en stimulant l'import nucléaire de Rev dépendant de Imp β ⁸³. Le rôle de NPM1 dans la localisation nucléolaire de Rev a aussi été identifié comme essentiel pour la production de particules virales infectieuses⁴².

A ce stade, **plusieurs hypothèses sur le rôle de NPM1 dans l'import nucléaire de Rev peuvent être émises** pour expliquer les résultats expérimentaux obtenus et décrits dans la littérature, dont trois, pas totalement exclusives, sont exposées ci-dessous.

Hypothèse 1 - Rev pourrait bénéficier (1) d'une voie d'import qui impliquerait NPM1 et l'hétérodimère Imp α /Imp β et (2) d'une voie d'import qui impliquerait une interaction directe avec Imp β . Si tel était le cas, alors je souhaiterais caractériser ces deux voies d'import et tenter d'identifier la voie favorisée *in vivo* dans les cellules infectées.

Hypothèse 2 - Rev cytoplasmique serait stabilisée par son interaction avec NPM1, constituant un « réservoir » de molécules solubles, favorisant l'interaction de Rev avec Imp β et son import nucléaire. NPM1 serait alors importée indépendamment dans le noyau, où elle récupérerait Rev pour assurer sa localisation nucléolaire. Dans ce cas, je souhaiterais caractériser chacun des complexes identifiés (stables ou transitoires) au sein des différents compartiments cellulaires.

Hypothèse 3 - Rev cytoplasmique, en interaction avec NPM1, pourrait interagir avec Imp β constituant un complexe ternaire plus stable pour assurer et stimuler l'import nucléaire de Rev. Dans ce cas, je souhaiterais étudier les complexes Rev/NPM1 en présence ou en absence de Imp β , pour identifier les interactions moléculaires qui opèrent au sein des différents compartiments cellulaires.

L'ensemble du travail proposé, qui vise à déterminer comment Rev est reconnue par Imp β et NPM1 en obtenant des données biochimiques, biophysiques et structurales sur les différents complexes protéiques, devrait permettre de mieux comprendre comment Rev est importée dans le noyau de la cellule hôte.

4.3- Partie #1 : Caractérisation de l'interaction entre Imp β /Rev : une interaction essentielle à l'import nucléaire de Rev

4.3.1- Contexte

Nous avons obtenu, et récemment publié, les premiers détails moléculaires de l'interaction Imp β /Rev et ainsi montré que Imp β est capable de lier deux monomères de Rev par le biais de deux sites de liaison indépendants¹⁷. Ces résultats mettent en évidence un comportement de liaison séquentielle atypique, qui distingue Rev des autres protéines cargos cellulaires canoniques importées dans le noyau par Imp β . Malgré nos nombreuses tentatives, à ce jour, nous n'avons malheureusement pas réussi à obtenir de structure à haute résolution de ce

complexe, permettant d'obtenir les détails à l'échelle atomique de cette interaction et de comprendre comment la surface de Imp β est impliquée dans la reconnaissance de Rev.

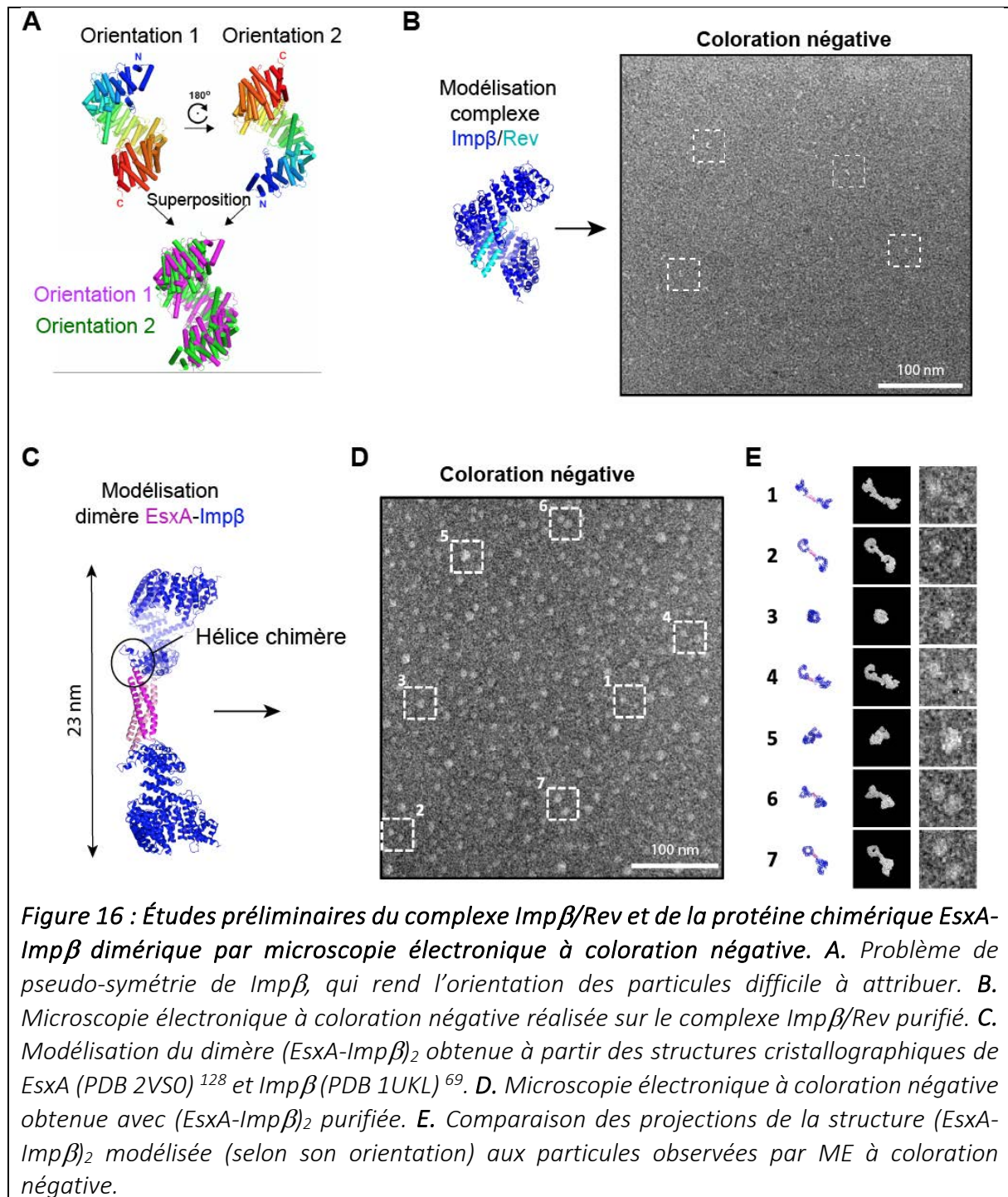
4.3.2- Objectifs

Pour comprendre la spécificité de l'interaction entre Rev et Imp β , je souhaiterais poursuivre nos efforts afin d'obtenir une **structure à haute résolution du complexe Imp β /Rev**. La connaissance de l'ensemble des interactions qui stabilisent le complexe permettrait de répondre aux questions suivantes : (i) peut-on concevoir des mutations ponctuelles de Imp β qui bloqueraient l'import de Rev sans inhiber celui des autres protéines cargos cellulaires importées par Imp β ? et (ii) peut-on identifier des petites molécules qui inhiberaient de manière spécifique l'interaction de Rev avec Imp β ?

4.3.3- Caractérisation du complexe Imp β /Rev par cryo-ME

Malgré l'obtention d'un complexe Imp β /Rev homogène extrêmement pur, les essais de cristallisation sont restés infructueux. L'approche que je souhaite utiliser aujourd'hui est celle de la **résolution de structure à partir de particules isolées par cryo-ME**. Ces dernières années, cette technique a en effet permis la détermination de nombreuses structures de complexes protéiques réfractaires à la cristallisation et la cristallographie aux rayons X¹²⁴, à des résolutions comparables à celles de la cristallographie pour des macromolécules de taille supérieure à ~100-150 kDa (pour revue :¹²⁵⁻¹²⁷). Cette partie du projet est actuellement en cours et bénéficie de l'étroite **collaboration** que j'ai établie avec **Emmanuelle Neumann et Guy Schoehn** du groupe Microscopie Électronique et Méthodes de l'IBS.

Pour atteindre ce premier objectif, nous cherchons à prévenir les caractéristiques initiales limitantes du complexe Imp β /Rev pour la cryo-ME (i) un poids moléculaire relativement faible (123 kDa) et (ii) un axe de pseudo-symétrie pour Imp β qui relie les moitiés N- et C-terminale, rendant l'attribution de l'orientation des particules de Imp β incertaine (**Figure 16A**). Pour résoudre ces deux problèmes, je propose de fusionner Imp β à une protéine dimérique, afin d'obtenir des particules plus grosses qui permettent d'attribuer l'orientation de Imp β de façon non ambiguë. L'option choisie impose que (i) la construction chimérique ne compromette pas la stabilité de Imp β et (ii) n'entrave pas son interaction avec les 2 molécules de Rev aux sites N et C que nous avons préalablement identifiés¹⁷. Mes recherches dans la littérature se sont focalisées sur des partenaires de fusion, compatibles avec la structure en forme de spirale de Imp β , qui forment des homodimères impliquant des interactions fortes, et dont l'extrémité C-terminale de chaque monomère est stériquement accessible pour être fusionnée avec la région N-terminale de Imp β . La protéine retenue, EsxA de *Staphylococcus aureus*, regroupe toutes ces caractéristiques (**Figure 16C**).



Les résultats préliminaires obtenus sur cette première partie du sujet, montrent que la fusion EsxA-Impβ forme un dimère stable, qui forme des particules de plus grande taille que le complexe monomérique Impβ/Rev, comme observé en coloration négative (Figure 16B vs D, E). Cependant la taille des particules semble hétérogène soulignant la nécessité d'optimiser les conditions expérimentales (optimisation de la longueur de l'hélice α chimère pour limiter la flexibilité entre EsxA et Impβ, ajout d'agent réticulant ou liaison d'anticorps monoclonal spécifique de Impβ pour limiter la flexibilité intrinsèque de Impβ, ...), afin d'identifier les conditions permettant d'obtenir un ensemble de particules de conformations plus homogènes avant de réaliser l'analyse en cryo-ME. Ce travail est actuellement en cours.

Ces résultats préliminaires m'ont permis d'obtenir un **financement** de l'**Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS)** en novembre 2022, pour une durée d'un an, afin d'initier ce projet.

4.4- Partie #2 : Caractérisation de l'interaction Rev/NPM1 impliquée dans la réplication du VIH-1

4.4.1- Contexte

L'interaction de Rev avec NPM1 a initialement été révélée par des études de pulldowns à partir d'extraits cellulaires^{73, 79}, et des études de colocalisation nucléolaire dans des cellules transfectées^{129, 130}. Elle a par la suite été confirmée par des études d'interactions biochimiques et biophysiques^{76, 77, 112}. NPM1 forme un complexe spécifique avec la protéine Rev, dont l'interaction est stœchiométrique^{73, 76, 83, 131}. Deux sites de liaison de Rev ont été identifiés au sein de NPM1 – un site de haute affinité contenu dans le domaine d'oligomérisation NPM1-OD, et un site de plus faible affinité localisé dans le domaine NPM1-HBD, suggérant un mécanisme de liaison bimodale⁷⁶.

4.4.2- Objectifs

Pour comprendre la spécificité de l'interaction entre Rev et NPM1, je souhaiterais obtenir des données structurales à **haute résolution des complexes NPM1/Rev**, afin de caractériser les deux sites d'interaction de Rev au sein de NPM1. La connaissance de l'ensemble des interactions qui stabilisent ces complexes permettrait de répondre aux questions suivantes : (i) ces interactions NPM1-OD/Rev et NPM1-HBD/Rev représentent-elles deux états d'interactions des deux protéines ou coexistent-elles au sein d'un même complexe ? (ii) peut-on concevoir des mutations ponctuelles de NPM1 qui bloqueraient l'import de Rev et (iii) peut-on identifier des petites molécules qui inhiberaient de manière spécifique l'interaction de Rev avec NPM1 ?

Je souhaiterais aussi étudier (i) l'impact de la déstabilisation de l'oligomérisation de NPM1 sur son interaction avec Rev et (ii) l'implication de l'état oligomérique de NPM1 et le rôle des PTMs dans l'interaction et l'import nucléaire de Rev.

4.4.3- Caractérisation du complexe Rev/NPM1 par cryo-EM, cristallographie et RMN

Le point de départ de cette étude sera de travailler avec les domaines NPM1-OD (13 kDa) et NPM1-HBD (13 kDa), préalablement identifiés comme étant les principaux domaines impliqués dans l'interaction de NPM1 avec Rev⁷⁶. Nos premiers efforts se concentreront sur la résolution de la **structure du complexe Rev/NPM1-OD** par cryo-EM sur particules isolées et/ou cristallographie aux rayons X, en nous aidant des conditions identifiées pour résoudre la structure pentamérique de NPM1-OD^{112, 132}.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à **caractériser l'interaction Rev/NPM1-HBD** par RMN, puisque le domaine NPM1-HBD est prédit pour être intrinsèquement désordonné. Nous chercherons tout d'abord à déterminer les modifications structurales de NPM1-HBD en présence de Rev et à identifier les résidus de NPM1-HBD impliqués dans la liaison à Rev, et réciproquement. Pour cela, nous réaliserons la spectroscopie RMN de NPM1-HBD marqué ¹⁵N/¹³C pour attribuer les raies de résonance des résidus de NPM1-HBD et nous

utiliserons NPM1-HBD marqué ^{15}N pour les expériences d'interaction en présence de Rev non marqué. Pour identifier les résidus de Rev impliqués dans la liaison à NPM1-HBD, nous réaliserons les expériences inverses en utilisant la protéine Rev marquée ^{15}N et le domaine NPM1-HBD non marqué. Nous pourrions nous appuyer sur notre expérience dans le marquage au $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ et l'attribution des raies de résonance des résidus de Rev préalablement obtenue grâce à notre collaboration avec le groupe de Martin Blackledge à l'IBS ¹⁷.

Dans un troisième temps, en fonction des résultats obtenus, nous tenterons de **caractériser** par RMN **l'interaction de Rev avec NPM1 entière ou NPM1-OD-HBD**, afin de déterminer si les domaines de NPM1 interagissent entre eux ou se structurent différemment en présence de Rev. Nous chercherons aussi à identifier par RMN si la forme monomérique de NPM1 (NPM1m) a la capacité d'interagir avec Rev, et si oui si cette interaction modifie l'état non-structuré de NPM1m, laissant envisager un état structural intermédiaire, qui permettrait d'émettre des hypothèses sur la séquence des événements qui mènent à l'interaction/oligomérisation de NPM1/Rev.

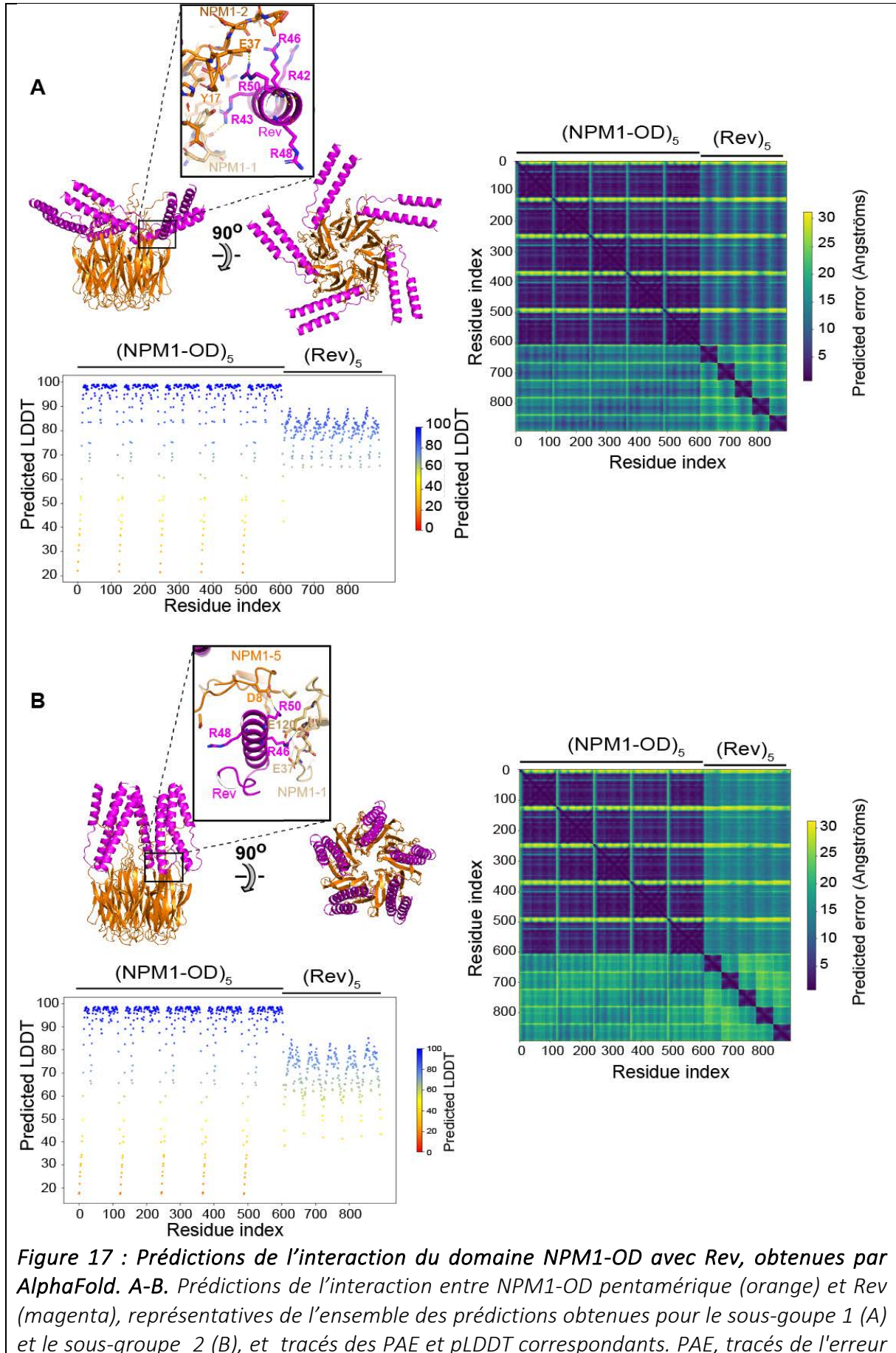
Toutes les études par cryo-ME seront effectuées en **collaboration** avec l'équipe de **Guy Schoehn**, et l'ensemble du travail de RMN sera réalisé en **collaboration** avec l'équipe de **Malene Ringkjøbing Jensen**, de l'IBS.

Les données préliminaires

(1) Interaction entre Rev et NPM1-OD :

Les données préliminaires d'interaction obtenues par gel filtration et photométrie de masse avec la protéine Rev et le domaine NPM1-OD confirment que *in vitro* Rev s'associe à NPM1-OD dans son état oligomérique (pentamère et décimère) pour former un complexe de rapport 5:5 (**Figure 19A, B**) ⁷⁶.

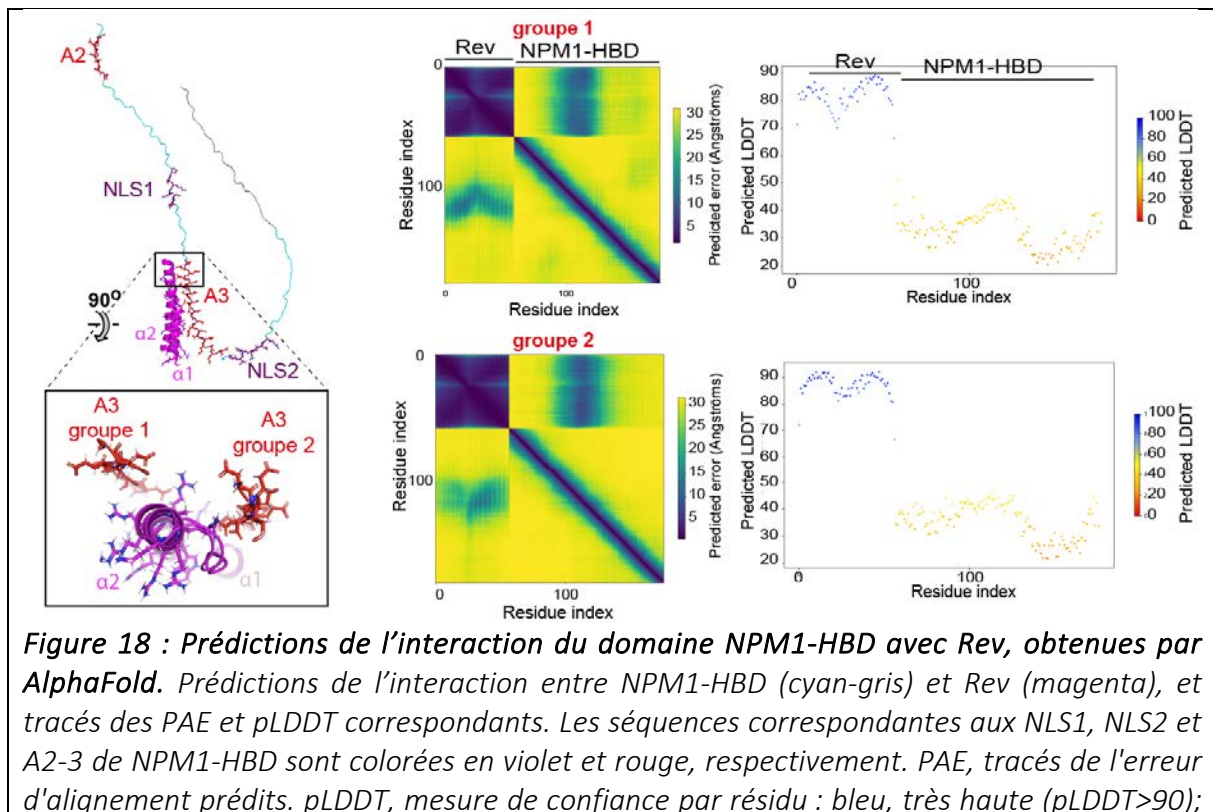
Les prédictions de structure obtenues par AlphaFold pour le complexe Rev/NPM1-OD pentamérique, orientent l'extrémité de l'épingle à cheveux de chaque monomère de Rev en direction de la boucle acide A1 de chaque monomère de NPM1-OD. Deux ensembles de prédictions distincts émergent, le sous-groupe 1 contenant les deux premières prédictions (**Figure 17A**), et le sous-groupe 2 contenant les 23 autres (**Figure 17B**), pouvant peut-être illustrer une certaine flexibilité de Rev à la surface de NPM1-OD et l'existence de plusieurs complexes NPM1/Rev. Bien que la mesure de confiance par résidu soit légèrement plus élevée pour le sous-groupe 1 par rapport au sous-groupe 2, nous pouvons noter que (1) l'orientation de Rev vis à vis de NPM1 contenue dans les modèles du premier sous-groupe semblerait compatible avec le modèle hypothétique de l'interaction Rev/Imp β que nous avons proposé (**Figure 11G**), puisque les résidus Rev R42, R46 qui stabiliseraient l'interaction avec Imp β ne seraient pas impliqués dans l'interaction Rev/NPM1 ¹⁷, alors que (2) l'orientation de Rev contenue dans le deuxième sous-groupe semblerait confirmer l'implication des résidus Rev R46, R48 et R50 essentiels à l'interaction de Rev avec NPM1 et à sa localisation nucléolaire ⁴² (**Figure 17B**).



d'alignement prédits. *pLDDT*, mesure de confiance par résidu : bleu, très haute ($pLDDT > 90$); cyan, haute ($90 > pLDDT > 70$); jaune, basse ($70 > pLDDT > 50$); orange, très basse ($pLDDT < 50$). Les prédictions d'AlphaFold présentées ont été obtenues sur le serveur Topaze du CCRT avec la version AF 2.3.1¹³³, et les fichiers *pLDDT* et *PAE* correspondants ont été régénérés en utilisant AlphaPickle¹³⁴.

(2) Interaction entre Rev et NPM1-HBD :

L'interaction de Rev avec NPM1-HBD, démontrée *in vitro*⁷⁶ et reproduite au laboratoire, a été prédite à l'aide d'AlphaFold. Malgré le caractère intrinsèquement désordonné du domaine NPM1-HBD, et par conséquent l'absence de confiance dans son organisation structurale, toutes les prédictions d'interaction obtenues identifient le domaine acide A3 de NPM1, situé entre le NLS1 et NLS2, comme étant la région qui pourrait interagir avec Rev. Deux ensembles, qui prédisent une interaction entre la région A3 et la partie N-terminale de l'hélice $\alpha 2$ qui contient le NLS/ARM de Rev, peuvent être identifiés. Le groupe 1 (qui comprend les 5 premières prédictions) impliquerait les résidus R41 et R48 de Rev, tandis que le groupe 2 (qui comprend 10 autres prédictions) impliquerait plutôt les résidus R43 et R44 de Rev (**Figure 18**). Il apparaît globalement que les prédictions du positionnement du domaine A3 de NPM1-HBD par rapport à Rev, obtenues en l'absence de Imp β , puissent être compatibles avec le modèle hypothétique de l'interaction Rev/Imp β que nous avons proposé¹⁷. Le positionnement du domaine A3 du groupe 1 est totalement conciliable avec notre modèle hypothétique, alors que celle du groupe 2 demanderait un léger ajustement. L'interaction entre Rev et NPM1-HBD, si elle était confirmée, pourrait permettre de renforcer l'interaction entre Rev et la surface interne de Imp β . Cette hypothèse devra bien évidemment être vérifiée.



cyan, haute ($90 > pLDDT > 70$); jaune, basse ($70 > pLDDT > 50$); orange, très basse ($pLDDT < 50$). Les prédictions d'AlphaFold présentées ont été obtenues sur le serveur Topaze du CCRT avec la version AF 2.3.1¹³³, et les fichiers pLDDT et PAE correspondants ont été régénérés en utilisant AlphaPickle¹³⁴.

4.5- Partie #3 : Régulation de l'import nucléaire de Rev par NPM1 et Imp β

4.5.1- Contexte

Les interactions directes de Rev avec NPM1 et Imp β et le lien entre NPM1 et la voie d'import régité par Imp β suggèrent l'existence d'interactions, stables ou transitoires, impliquant Rev, Imp β et NPM1, qui pourraient avoir un rôle régulateur au cours du cycle de réplication du VIH-1¹³⁵.

4.5.2- Objectifs

L'objectif de cette partie du projet est donc de mieux comprendre comment les interactions Rev/NPM1 et Rev/Imp β pourraient s'orchestrer dans la cellule. Pour cela je souhaiterais étudier **l'évolution des interactions** préalablement déterminées dans les deux premières parties du projet, **lorsque les trois protéines sont présentes dans un même environnement**. Ainsi, je désirerais **obtenir des données structurales à haute résolution des différents sous-complexes** qui impliquent ces protéines et **étudier la dynamique moléculaire de ces complexes** dans un contexte cellulaire.

La connaissance de l'ensemble des interactions qui stabilisent les différents sous-complexes impliquant Rev, NPM1 et Imp β permettrait d'apporter des réponses aux questions suivantes : (i) Comment l'interaction de Rev avec NPM1 permet-elle de stimuler l'import nucléaire de Rev par la voie d'import spécifique de Imp β ? Comment les protéines Imp β et NPM1 orchestrent-elles l'import nucléaire de Rev ? Existe-t-il une interaction transitoire ou stable entre ces trois protéines (directe ou indirecte via Imp α) ? (ii) Quelle est la fonction principale de NPM1 vis à vis de Rev dans le cytoplasme ? NPM1 participe-t-elle à la présentation de Rev auprès de Imp β ? NPM1 cytoplasmique contribue-t-elle à la dissociation de Rev de l'ARNm pour lui permettre d'interagir avec Imp β ? (iii) Peut-on concevoir des mutations ponctuelles de NPM1 qui réduiraient la solubilité et la mobilité de Rev sans inhiber les divers processus cellulaires dans lesquels NPM1 est par ailleurs impliquée ? (iv) Peut-on identifier des petites molécules qui inhiberaient de manière spécifique l'import nucléaire de Rev réalisé par NPM1 et/ou Imp β ?

4.5.3- Caractérisations structurales des différents sous-complexes impliquant Rev, NPM1 et Imp β : une approche intégrative combinant cryo-ME, cristallographie aux rayons X et RMN

Afin de tester les différentes hypothèses émises précédemment, différentes études seront effectuées pour explorer (i) l'impact de la présence de Imp β et/ou Imp α sur la stabilité du complexe Rev/NPM1, (ii) l'impact de la présence de NPM1 sur la stabilité du complexe Rev/Imp β et la capacité de Imp β à lier 2 molécules de Rev, et (iii) la capacité ou non de Imp β à interagir avec NPM1 en absence et en présence de Rev.

Dans un premier temps, nous chercherons à comparer et caractériser les interactions de Rev avec les domaines NPM1-OD et NPM1-HBD en absence et en présence de Imp α et/ou Imp β . Nous chercherons par la suite à identifier si Rev, NPM1 et Imp β peuvent former - de manière stable ou transitoire - un complexe trimérique, voir tétramérique en présence de Imp α .

Ces études seront réalisées en utilisant un ensemble de techniques biochimiques et biophysiques que nous maîtrisons : (i) l'expression recombinante des protéines cibles dans *E. coli* suivie de la co-purification à l'aide de résines spécifiques pour démontrer la formation de complexes, (ii) la chromatographie par exclusion de taille (SEC), la migration sur gel natif et la photométrie de masse pour étudier l'homogénéité des complexes, (iii) les tests de stabilité thermique des protéines pour identifier les conditions les plus favorables à la stabilité des interactions protéine-protéine (TSA, nano-DSF), (iv) la diffusion de lumière laser multi-angles couplée à la SEC (SEC-MALLS) et la spectrométrie de masse native (en **collaboration avec Elisabetta Boeri à l'IBS**) pour estimer la taille et la stœchiométrie des différents complexes, (v) la calorimétrie de titration isotherme (ITC) pour estimer les constantes de liaison, (vi) la réticulation chimique couplée à la spectrométrie de masse (XL-MS) pour identifier les résidus impliqués dans les interactions protéine-protéine qui peuvent être transitoires (en **collaboration avec Yohann Couté à l'IRIG-Grenoble ou Markus Hartl du laboratoire Max Perutz en Autriche**). Les instruments de SEC, TSA et nano-DSF sont disponibles en libre accès à l'IBS, et les analyses de SEC-MALLS, ITC et de photométrie de masse sont accessibles via la plateforme de biophysique de l'ISBG dirigée par Caroline Mas de l'IBS.

Nous tenterons alors d'obtenir des détails structuraux à haute résolution des différents complexes qui auront été préalablement identifiés par les différentes approches : cryo-ME, cristallographie aux rayons X et/ou RMN. Nous bénéficierons de l'activité des plateformes de microscopie électronique à l'IBS et celle de cristallisation à l'EMBL-Grenoble pour cribler et identifier respectivement les constructions favorables à l'obtention (i) de particules homogènes (appréciées par coloration négative) ou (ii) de cristaux convenant à des expériences de diffraction aux rayons X, afin de déterminer les surfaces d'interactions spécifiques et d'identifier tous les résidus impliqués dans la stabilité de ces complexes.

Les données préliminaires

(1) Impact de la présence de Imp β sur la stabilité du complexe Rev/NPM1 :

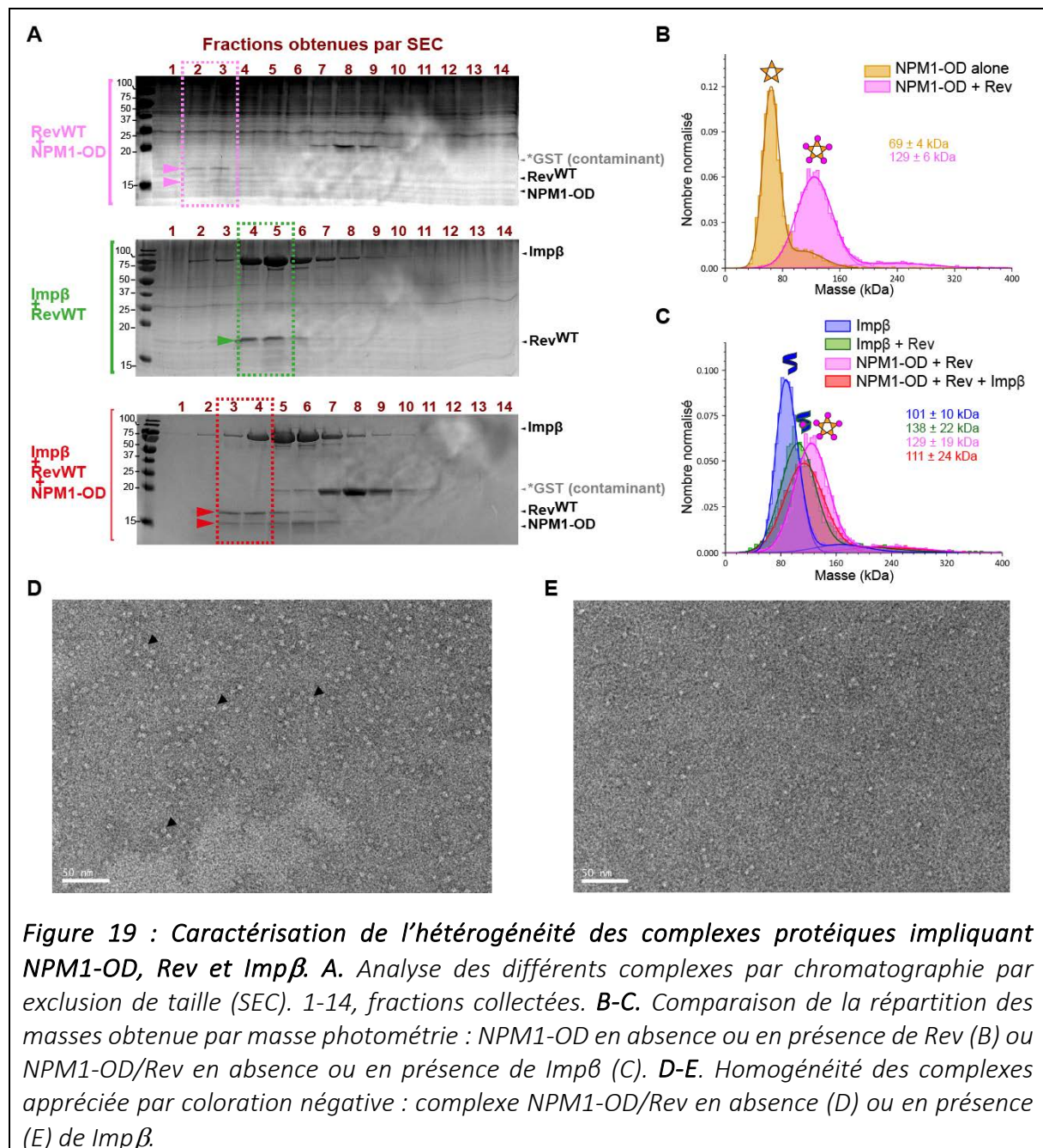
L'ajout de Imp β au complexe Rev/NPM1-OD, testé *in vitro* par gel filtration, photométrie de masse ou microscopie électronique (coloration négative), semble indiquer que la présence de Imp β modifie l'état oligomérique de Rev/NPM1-OD (**Figure 19**).

- **Gel filtration** : La comparaison des profils d'élution obtenus par gel filtration des échantillons protéiques contenant (i) Imp β et Rev, (ii) NPM1 et Rev et (iii) NPM1, Rev et Imp β , révèle que le volume permettant de co-éluer NPM1 et Rev est plus grand en présence qu'en absence de Imp β , ce qui correspondrait à un complexe protéique plus compact ou de poids moléculaire plus faible (**Figure 19A**).

- **Photométrie de masse** : La comparaison des distributions de masses obtenues par masse photométrie avec les mêmes échantillons que ceux précédemment cités, semble confirmer qu'après l'ajout de Imp β la masse moléculaire du complexe Rev/NPM1-OD est inférieure à celle obtenue en l'absence de Imp β (**Figure 19B, C**). Cependant, l'imprécision sur la masse inhérente à cette technique (5-10%) ne nous permet pas de déterminer la composition exacte du

complexe obtenu en présence de Rev, NPM1-OD et Imp β , bien qu'il ne puisse pas totalement être exclu que la courbe observée avec Rev/NPM1-OD/Imp β soit la résultante des courbes obtenues avec Rev/NPM1-OD + Rev/Imp β (Figure 19C).

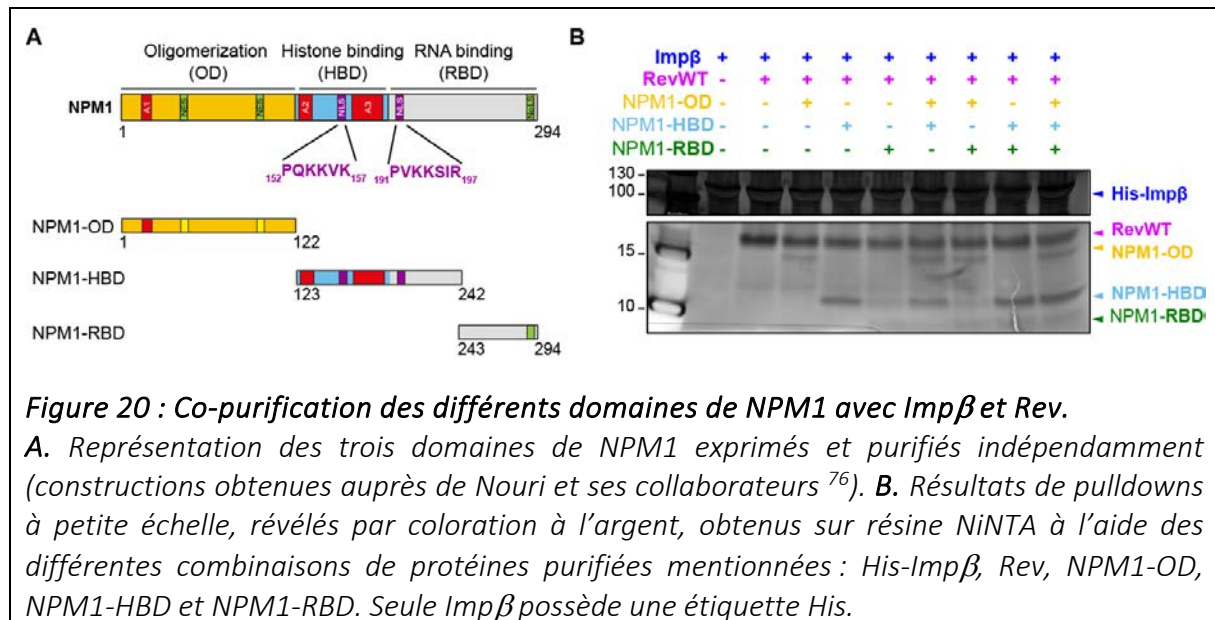
- **Microscopie électronique par coloration négative** : la comparaison par microscopie électronique des échantillons Rev/NPM1-OD en absence ou en présence de Imp β semble indiquer que les petites particules, assez homogènes de 6 nm de diamètre, obtenues avec Rev/NPM1-OD (Figure 19D) deviennent de plus petites tailles et plus hétérogènes en présence de Imp β (Figure 19E)



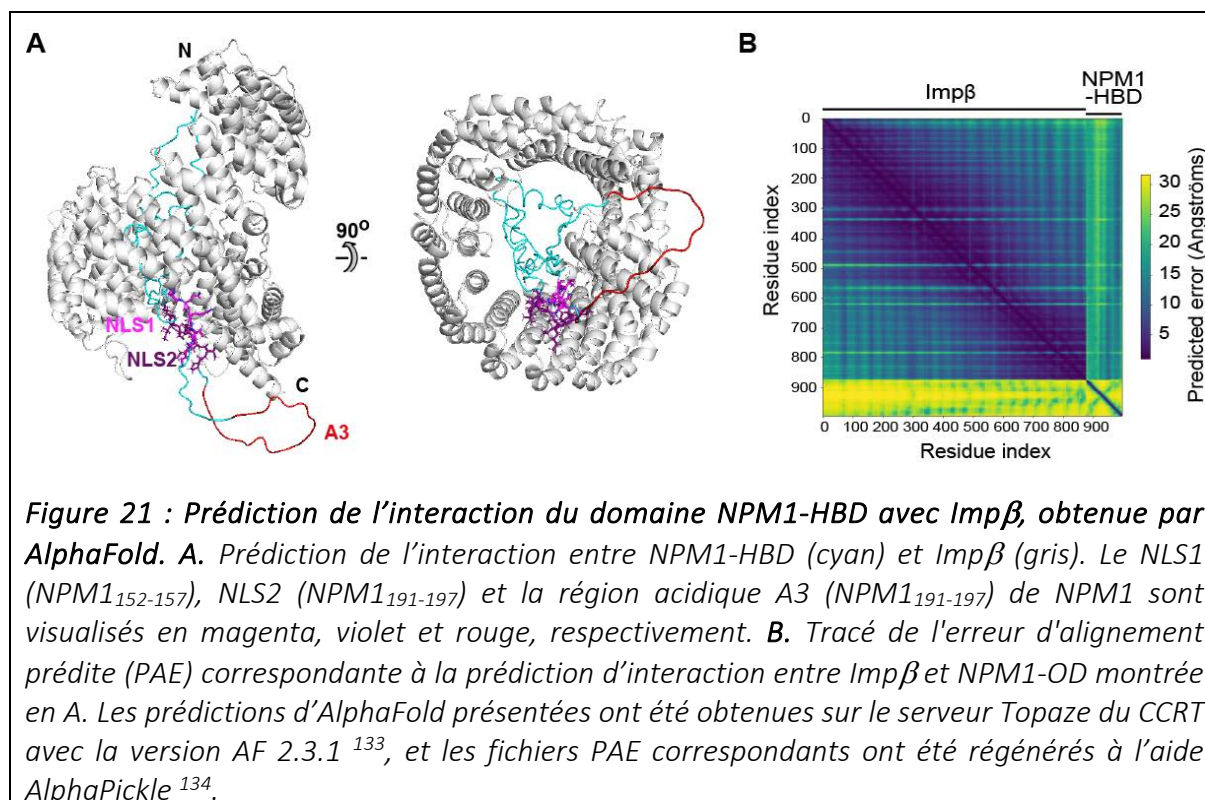
(2) Capacité de Impβ à interagir avec NPM1 en présence et en absence de Rev :

La possibilité que les NLS de NPM1 soient reconnus directement par Impβ, a dans un premier temps été testée par des expériences de co-purification et prédit par AlphaFold.

- **Co-purification sur colonne NiNTA :** Des expériences préliminaires de co-purification à petite échelle ont été réalisées avec les protéines His-Impβ, Rev et les domaines NPM1-OD et NPM1-HBD (**Figure 20A**), en effectuant différentes combinaisons de protéines (**Figure 20B**). Les premiers résultats obtenus illustreraient la capacité de Impβ à lier à la fois Rev et NPM1-HBD, résultant d'une liaison directe ou indirecte (par l'intermédiaire de Rev) de Impβ avec NPM1-HBD. Dans les deux cas, ce résultat suggérerait que (i) les sites de liaison de Rev à Impβ et à NPM1-HBD ne sont pas chevauchants, (ii) ce qui serait compatible avec les prédictions de l'interaction entre Rev et NPM1-HBD obtenues par AlphaFold et décrites précédemment (**Figure 18**).



- **Prédictions AlphaFold :** Malgré le caractère intrinsèquement désordonné du domaine NPM1-HBD et par conséquent le manque de confiance dans la prédiction de son organisation structurale, les prédictions d'interaction entre NPM1-HBD et Impβ, obtenues par AlphaFold, modélisent une interaction du NLS1 mais aussi du NLS2 de NPM1 avec la face concave de la partie C-terminale de Impβ (**Figure 21 A, B**).



4.5.4- Étude de la dynamique des interactions moléculaires dans un contexte cellulaire

Afin d'apprécier la spécificité des interactions qui auront pu être identifiées à l'aide des structures des différents complexes, des expériences de mutagenèse dirigée couplées à des tests d'import nucléaire *in vitro* pourraient être réalisés. L'inhibition de l'import nucléaire de Rev par ces mutations permettrait la **validation de cibles thérapeutiques potentielles**.

L'étude *in vivo* des interactions entre les protéines Rev, NPM1 et/ou Imp β , permettrait de valider l'existence des complexes identifiés *in vitro* et d'améliorer notre compréhension et nos connaissances sur l'import nucléaire de Rev. De manière globale, pour apprécier de telles interactions au sein des différents compartiments cellulaires, plusieurs approches pourraient être envisagées à l'aide d'anticorps primaires spécifiques et/ou de protéines fluorescentes. Les stratégies à mettre en place devront être adaptées en fonction des résultats et de la stœchiométrie des complexes obtenus. Nous pouvons, entre autres, imaginer d'utiliser des anticorps spécifiques couplés à des fluorophores ou d'introduire des gènes codant pour des protéines fluorescentes en amont ou en aval des gènes codant pour les protéines Rev, NPM1 et Imp β , afin de suivre la localisation des protéines dans des cellules transfectées. Les interactions des protéines deux à deux pourront être étudiées par FRET, ou à l'aide d'approches de type Dualink[®] qui produisent un signal fluorescent lors d'évènements d'interactions – stables ou transitoires – qui peut être visualisé par microscopie (confocale ou super-résolution) ou cytométrie en flux. Pour démontrer l'existence de complexes moléculaires impliquant trois protéines, nous pourrions envisager de réaliser des expériences (i) d'imagerie *in cellulo*, grâce à des protocoles de complémentation bimoléculaire de fluorescence associé au transfert d'énergie par résonance de fluorescence (BiFC-FRET), développés pour visualiser les complexes

ternaires dans les cellules vivantes ¹³⁶ ou (ii) de réticulation *in vivo*, à l'aide d'analogues d'acides aminés photo-réactifs, combiné à des études de pulldowns à l'aide d'anticorps spécifiques.

L'ensemble du travail de culture cellulaire et de microscopie pourra être réalisé en **collaboration avec** les membres de notre équipe **Dimitrios Skoufias et Rose-Laure Indorato**, et **Jean-Philippe Kleman**, du groupe I2SR, qui dirige la **PF d'imagerie cellulaire M4D** de l'institut.

4.5.5- Identification de petites molécules inhibitrices de l'import nucléaire de Rev

A plus long terme, j'espère que les structures des différents complexes identifiés, nécessaires à l'import nucléaire de Rev et donc à la réplication du VIH-1, pourront constituer de nouvelles cibles thérapeutiques et faciliter le criblage de petites molécules et le développement d'inhibiteurs spécifiques qui pourraient constituer de nouvelles stratégies antivirales. Une telle étude nécessitera d'établir de nouvelles collaborations, qui n'ont pas encore été identifiées à ce jour.

5- BIBLIOGRAPHIE

Les publications dans lesquelles je suis impliquée sont indiquées en bleu.

1. Noirclerc-Savoie, M., Morlot, C., Gerard, P., Vernet, T. & Zapun, A. Expression and purification of FtsW and RodA from *Streptococcus pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively. *Protein expression and purification* **30**, 18-25 (2003).
2. Noirclerc-Savoie, M. et al. In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **55**, 413-424 (2005).
3. Noirclerc-Savoie, M. et al. Reconstitution of membrane protein complexes involved in pneumococcal septal cell wall assembly. *PloS one* **8**, e75522 (2013).
4. Noirclerc-Savoie, M., Gallet, B., Bernaudat, F. & Vernet, T. Large scale purification of linear plasmid DNA for efficient high throughput cloning. *Biotechnol J* **5**, 978-985 (2010).
5. Lundqvist, J., Gallet, B., Noirclerc-Savoie, M. & Vernet, T. Automation of high-throughput expression screening on His MultiTrap HP with vacuum elution using a Hamilton Liquid Handling Workstation. *Discovery Matters*, 14-15 (2008).
6. Lantez, V., Nikolaidis, I., Rechenmann, M., Vernet, T. & Noirclerc-Savoie, M. Rapid automated detergent screening for the solubilization and purification of membrane proteins and complexes. *Engineering in Life Sciences* **15**, 39-50 (2015).
7. Amero, C. et al. A systematic mutagenesis-driven strategy for site-resolved NMR studies of supramolecular assemblies. *J Biomol NMR* **50**, 229-236 (2011).
8. Rasia, R.M. et al. Parallel screening and optimization of protein constructs for structural studies. *Protein science : a publication of the Protein Society* **18**, 434-439 (2009).
9. Goedhart, J. et al. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun* **3**, 751 (2012).
10. Arnold, M., Nath, A., Hauber, J. & Kehlenbach, R.H. Multiple importins function as nuclear transport receptors for the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 20883-20890 (2006).
11. Gu, L. et al. Intermolecular masking of the HIV-1 Rev NLS by the cellular protein HIC: novel insights into the regulation of Rev nuclear import. *Retrovirology* **8**, 17 (2011).
12. Henderson, B.R. & Percipalle, P. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *Journal of molecular biology* **274**, 693-707 (1997).
13. Truant, R. & Cullen, B.R. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Molecular and cellular biology* **19**, 1210-1217 (1999).
14. Oka, M. & Yoneda, Y. Importin alpha: functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **94**, 259-274 (2018).
15. Wing, C.E., Fung, H.Y.J. & Chook, Y.M. Karyopherin-mediated nucleocytoplasmic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 307-328 (2022).
16. Truman, C.T., Jarvelin, A., Davis, I. & Castello, A. HIV Rev-visited. *Open Biol* **10**, 200320 (2020).

17. Spittler, D. et al. Binding stoichiometry and structural model of the HIV-1 Rev/importin β complex. *Life Sci Alliance* **5** (2022).
18. Cochrane, A., Kramer, R., Ruben, S., Levine, J. & Rosen, C.A. The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology* **171**, 264-266 (1989).
19. Hauber, J., Bouvier, M., Malim, M.H. & Cullen, B.R. Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* **62**, 4801-4804 (1988).
20. Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V. & Cullen, B.R. The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254-257 (1989).
21. Nishi, H., Hashimoto, K. & Panchenko, A.R. Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure* **19**, 1807-1815 (2011).
22. Cochrane, A.W., Golub, E., Volsky, D., Ruben, S. & Rosen, C.A. Functional significance of phosphorylation to the human immunodeficiency virus Rev protein. *Journal of virology* **63**, 4438-4440 (1989).
23. Fouts, D.E., True, H.L., Cengel, K.A. & Celander, D.W. Site-specific phosphorylation of the human immunodeficiency virus type-1 Rev protein accelerates formation of an efficient RNA-binding conformation. *Biochemistry* **36**, 13256-13262 (1997).
24. Marin, O. et al. Unique features of HIV-1 Rev protein phosphorylation by protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS letters* **481**, 63-67 (2000).
25. Meggio, F., Marin, O., Boschetti, M., Sarno, S. & Pinna, L.A. HIV-1 Rev transactivator: a beta-subunit directed substrate and effector of protein kinase CK2. *Molecular and cellular biochemistry* **227**, 145-151 (2001).
26. Daugherty, M.D., Liu, B. & Frankel, A.D. Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nature structural & molecular biology* **17**, 1337-1342 (2010).
27. Ben Fadhel, N., Signor, L., Petosa, C. & Noirclerc-Savoie, M. Phosphomimetic mutations modulate the ability of HIV-1 Rev to bind human Importin β in vitro. *Matters (ISSN: 2297-8240)*, (<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/view/index/docid/3605154>) (2019).
28. Feinberg, M.B., Jarrett, R.F., Aldovini, A., Gallo, R.C. & Wong-Staal, F. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* **46**, 807-817 (1986).
29. Sodroski, J. et al. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* **321**, 412-417 (1986).
30. Pollard, V.W. & Malim, M.H. The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology* **52**, 491-532 (1998).
31. Katahira, J. Nuclear export of messenger RNA. *Genes (Basel)* **6**, 163-184 (2015).
32. Purcell, D.F. & Martin, M.A. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of virology* **67**, 6365-6378 (1993).
33. Cochrane, A.W., Chen, C.H. & Rosen, C.A. Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 1198-1202 (1990).

34. Stauber, R.H., Afonina, E., Gulnik, S., Erickson, J. & Pavlakis, G.N. Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells. *Virology* **251**, 38-48 (1998).
35. Daelemans, D. et al. In vivo HIV-1 Rev multimerization in the nucleolus and cytoplasm identified by fluorescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* **279**, 50167-50175 (2004).
36. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I.W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-1060 (1997).
37. Fukuda, M. et al. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**, 308-311 (1997).
38. Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L.I. & Rosbash, M. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Current biology : CB* **7**, 767-775 (1997).
39. McLaren, M., Marsh, K. & Cochrane, A. Modulating HIV-1 RNA processing and utilization. *Front Biosci* **13**, 5693-5707 (2008).
40. Askjaer, P., Jensen, T.H., Nilsson, J., Englmeier, L. & Kjems, J. The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *The Journal of biological chemistry* **273**, 33414-33422 (1998).
41. Cochrane, A.W., Perkins, A. & Rosen, C.A. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *Journal of virology* **64**, 881-885 (1990).
42. Arizala, J.A.C. et al. Nucleolar Localization of HIV-1 Rev Is Required, Yet Insufficient for Production of Infectious Viral Particles. *AIDS research and human retroviruses* **34**, 961-981 (2018).
43. Malim, M.H. & Cullen, B.R. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**, 241-248 (1991).
44. Mann, D.A. et al. A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *Journal of molecular biology* **241**, 193-207 (1994).
45. Jain, C. & Belasco, J.G. Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. *Molecular cell* **7**, 603-614 (2001).
46. Guttler, T. et al. NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. *Nature structural & molecular biology* **17**, 1367-1376 (2010).
47. Booth, D.S., Cheng, Y. & Frankel, A.D. The export receptor Crm1 forms a dimer to promote nuclear export of HIV RNA. *eLife* **3**, e04121 (2014).
48. DiMattia, M.A. et al. The Structure of HIV-1 Rev Filaments Suggests a Bilateral Model for Rev-RRE Assembly. *Structure* **24**, 1068-1080 (2016).
49. Watts, N.R. et al. Three-dimensional structure of HIV-1 Rev protein filaments. *Journal of structural biology* **121**, 41-52 (1998).
50. Jayaraman, B. et al. RNA-directed remodeling of the HIV-1 Rev protein orchestrates assembly of the Rev-Rev response element complex. *eLife* **3** (2014).
51. DiMattia, M.A. et al. Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5810-5814 (2010).

52. Jayaraman, B., Fernandes, J.D., Yang, S., Smith, C. & Frankel, A.D. Highly Mutable Linker Regions Regulate HIV-1 Rev Function and Stability. *Scientific reports* **9**, 5139 (2019).
53. Faust, O., Grunhaus, D., Shimshon, O., Yavin, E. & Friedler, A. Protein Regulation by Intrinsically Disordered Regions: A Role for Subdomains in the IDR of the HIV-1 Rev Protein. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **19**, 1618-1624 (2018).
54. Bhardwaj, A. & Cingolani, G. Conformational selection in the recognition of the snurportin importin beta binding domain by importin beta. *Biochemistry* **49**, 5042-5047 (2010).
55. Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. & Muller, C.W. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* **399**, 221-229 (1999).
56. Choi, S. et al. Structural basis for the selective nuclear import of the C2H2 zinc-finger protein Snail by importin beta. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **70**, 1050-1060 (2014).
57. Conti, E. & Kuriyan, J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure* **8**, 329-338 (2000).
58. Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. & Kuriyan, J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**, 193-204 (1998).
59. Bayliss, R., Littlewood, T. & Stewart, M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* **102**, 99-108 (2000).
60. Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L.A., Wentz, S.R. & Stewart, M. GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. *The Journal of biological chemistry* **277**, 50597-50606 (2002).
61. Liu, S.M. & Stewart, M. Structural basis for the high-affinity binding of nucleoporin Nup1p to the *Saccharomyces cerevisiae* importin-beta homologue, Kap95p. *Journal of molecular biology* **349**, 515-525 (2005).
62. Forwood, J.K. et al. Quantitative structural analysis of importin-beta flexibility: paradigm for solenoid protein structures. *Structure* **18**, 1171-1183 (2010).
63. Tauchert, M.J. et al. Impact of the crystallization condition on importin-beta conformation. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **72**, 705-717 (2016).
64. Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D. & Wittinghofer, A. Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97**, 635-646 (1999).
65. Lee, S.J., Matsuura, Y., Liu, S.M. & Stewart, M. Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* **435**, 693-696 (2005).
66. Forwood, J.K. et al. Kap95p binding induces the switch loops of RanGDP to adopt the GTP-bound conformation: implications for nuclear import complex assembly dynamics. *Journal of molecular biology* **383**, 772-782 (2008).
67. Ivic, N. et al. Fuzzy Interactions Form and Shape the Histone Transport Complex. *Molecular cell* **73**, 1191-1203 e1196 (2019).
68. Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M.T. & Gerace, L. Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Molecular cell* **10**, 1345-1353 (2002).
69. Lee, S.J. et al. The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* **302**, 1571-1575 (2003).

70. Wohlwend, D., Strasser, A., Dickmanns, A. & Ficner, R. Structural basis for RanGTP independent entry of spliceosomal U snRNPs into the nucleus. *Journal of molecular biology* **374**, 1129-1138 (2007).
71. Mitrousis, G., Olia, A.S., Walker-Kopp, N. & Cingolani, G. Molecular basis for the recognition of snurportin 1 by importin beta. *The Journal of biological chemistry* **283**, 7877-7884 (2008).
72. Conti, E., Muller, C.W. & Stewart, M. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 237-244 (2006).
73. Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P. & Laemmli, U.K. Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Molecular and cellular biology* **11**, 2567-2575 (1991).
74. Miyazaki, Y. et al. The cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 1 Rev: implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Experimental cell research* **219**, 93-101 (1995).
75. Miyazaki, Y., Nosaka, T. & Hatanaka, M. The post-transcriptional regulator Rev of HIV: implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Biochimie* **78**, 1081-1086 (1996).
76. Nouri, K. et al. Biophysical Characterization of Nucleophosmin Interactions with Human Immunodeficiency Virus Rev and Herpes Simplex Virus US11. *PloS one* **10**, e0143634 (2015).
77. Szebeni, A., Herrera, J.E. & Olson, M.O. Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* **34**, 8037-8042 (1995).
78. Chan, H.J., Weng, J.J. & Yung, B.Y. Nucleophosmin/B23-binding peptide inhibits tumor growth and up-regulates transcriptional activity of p53. *Biochemical and biophysical research communications* **333**, 396-403 (2005).
79. Naji, S. et al. Host cell interactome of HIV-1 Rev includes RNA helicases involved in multiple facets of virus production. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, M111 015313 (2012).
80. Passos-Castilho, A.M., Marchand, C. & Archambault, D. B23/nucleophosmin interacts with bovine immunodeficiency virus Rev protein and facilitates viral replication. *Virology* **515**, 158-164 (2018).
81. Szebeni, A. & Olson, M.O. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein science : a publication of the Protein Society* **8**, 905-912 (1999).
82. Wingfield, P.T. et al. HIV-1 Rev expressed in recombinant Escherichia coli: purification, polymerization, and conformational properties. *Biochemistry* **30**, 7527-7534 (1991).
83. Szebeni, A. et al. Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry* **36**, 3941-3949 (1997).
84. Frottin, F. et al. The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment. *Science* **365**, 342-347 (2019).
85. Zhao, X., Ji, J., Yu, L.R., Veenstra, T. & Wang, X.W. Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleophosmin and its potential regulation by peptidyl-prolyl cis/trans isomerase. *J Mol Biochem* **4**, 95-103 (2015).
86. Lin, X. et al. HIV-1 Transcription Inhibitor 1E7-03 Decreases Nucleophosmin Phosphorylation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **22**, 100488 (2023).
87. Olsen, J.V. et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling* **3**, ra3 (2010).

88. Chan, P.K. & Chan, F.Y. Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. *Biochimica et biophysica acta* **1262**, 37-42 (1995).
89. Feric, M. et al. Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* **165**, 1686-1697 (2016).
90. Mitrea, D.M. et al. Self-interaction of NPM1 modulates multiple mechanisms of liquid-liquid phase separation. *Nat Commun* **9**, 842 (2018).
91. Abraham, K.J. et al. Nucleolar RNA polymerase II drives ribosome biogenesis. *Nature* **585**, 298-302 (2020).
92. Brunetti, L., Gundry, M.C. & Goodell, M.A. New insights into the biology of acute myeloid leukemia with mutated NPM1. *Int J Hematol* **110**, 150-160 (2019).
93. Lindstrom, M.S. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem Res Int* **2011**, 195209 (2011).
94. Cela, I., Di Matteo, A. & Federici, L. Nucleophosmin in Its Interaction with Ligands. *Int J Mol Sci* **21** (2020).
95. Samad, M.A., Okuwaki, M., Haruki, H. & Nagata, K. Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins. *FEBS letters* **581**, 3283-3288 (2007).
96. Mai, R.T. et al. Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression. *Oncogene* **25**, 448-462 (2006).
97. Ahuja, R., Kapoor, N.R. & Kumar, V. The HBx oncoprotein of hepatitis B virus engages nucleophosmin to promote rDNA transcription and cellular proliferation. *Biochimica et biophysica acta* **1853**, 1783-1795 (2015).
98. Gadad, S.S. et al. The multifunctional protein nucleophosmin (NPM1) is a human linker histone H1 chaperone. *Biochemistry* **50**, 2780-2789 (2011).
99. Marasco, D. et al. Role of mutual interactions in the chemical and thermal stability of nucleophosmin NPM1 domains. *Biochemical and biophysical research communications* **430**, 523-528 (2013).
100. Li, Y.P. Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat. *Journal of virology* **71**, 4098-4102 (1997).
101. Santolini, E., Migliaccio, G. & La Monica, N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of virology* **68**, 3631-3641 (1994).
102. Lee, S.J., Shim, H.Y., Hsieh, A., Min, J.Y. & Jung, G. Hepatitis B virus core interacts with the host cell nucleolar protein, nucleophosmin 1. *J Microbiol* **47**, 746-752 (2009).
103. Huang, W.H., Yung, B.Y., Syu, W.J. & Lee, Y.H. The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication. *The Journal of biological chemistry* **276**, 25166-25175 (2001).
104. Abraham, R., Mudaliar, P., Jaleel, A., Srikanth, J. & Sreekumar, E. High throughput proteomic analysis and a comparative review identify the nuclear chaperone, Nucleophosmin among the common set of proteins modulated in Chikungunya virus infection. *J Proteomics* **120**, 126-141 (2015).
105. Zhou, J. et al. Nucleolar protein NPM1 is essential for circovirus replication by binding to viral capsid. *Virulence* **11**, 1379-1393 (2020).
106. Gadad, S.S. et al. HIV-1 infection induces acetylation of NPM1 that facilitates Tat localization and enhances viral transactivation. *Journal of molecular biology* **410**, 997-1007 (2011).

107. Lobaina, Y. & Perera, Y. Implication of B23/NPM1 in Viral Infections, Potential Uses of B23/NPM1 Inhibitors as Antiviral Therapy. *Infect Disord Drug Targets* **19**, 2-16 (2019).
108. Yu, Y. et al. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Molecular and cellular biology* **26**, 3798-3809 (2006).
109. Wang, W., Budhu, A., Forgues, M. & Wang, X.W. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol* **7**, 823-830 (2005).
110. Arregi, I. et al. Leukemia-Associated Mutations in Nucleophosmin Alter Recognition by CRM1: Molecular Basis of Aberrant Transport. *PLoS one* **10**, e0130610 (2015).
111. Mitrea, D.M. & Kriwacki, R.W. Cryptic disorder: an order-disorder transformation regulates the function of nucleophosmin. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, 152-163 (2012).
112. Mitrea, D.M. et al. Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 4466-4471 (2014).
113. Lee, H.H. et al. Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer-pentamer interface. *Proteins* **69**, 672-678 (2007).
114. Namboodiri, V.M., Schmidt-Zachmann, M.S., Head, J.F. & Akey, C.W. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the N-terminal domain of NO38, a nucleolar protein from *Xenopus laevis*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**, 2325-2327 (2004).
115. Wang, D., Baumann, A., Szebeni, A. & Olson, M.O. The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *The Journal of biological chemistry* **269**, 30994-30998 (1994).
116. Grummitt, C.G., Townsley, F.M., Johnson, C.M., Warren, A.J. & Bycroft, M. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *The Journal of biological chemistry* **283**, 23326-23332 (2008).
117. Maggi, L.B., Jr. et al. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Molecular and cellular biology* **28**, 7050-7065 (2008).
118. Swaminathan, V., Kishore, A.H., Febitha, K.K. & Kundu, T.K. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Molecular and cellular biology* **25**, 7534-7545 (2005).
119. Okuwaki, M. The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem* **143**, 441-448 (2008).
120. Yun, J.P. et al. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem* **90**, 1140-1148 (2003).
121. Adachi, Y., Copeland, T.D., Hatanaka, M. & Oroszlan, S. Nucleolar targeting signal of Rex protein of human T-cell leukemia virus type I specifically binds to nucleolar shuttle protein B-23. *The Journal of biological chemistry* **268**, 13930-13934 (1993).
122. Hingorani, K., Szebeni, A. & Olson, M.O. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *The Journal of biological chemistry* **275**, 24451-24457 (2000).
123. Banerjee, P.R., Mitrea, D.M., Kriwacki, R.W. & Deniz, A.A. Asymmetric Modulation of Protein Order-Disorder Transitions by Phosphorylation and Partner Binding. *Angew Chem Int Ed Engl* **55**, 1675-1679 (2016).
124. Cressey, D. & Callaway, E. Cryo-electron microscopy wins chemistry Nobel. *Nature* **550**, 167 (2017).

125. Palamini, M., Canciani, A. & Forneris, F. Identifying and Visualizing Macromolecular Flexibility in Structural Biology. *Front Mol Biosci* **3**, 47 (2016).
126. Nwanochie, E. & Uversky, V.N. Structure Determination by Single-Particle Cryo-Electron Microscopy: Only the Sky (and Intrinsic Disorder) is the Limit. *Int J Mol Sci* **20** (2019).
127. Jonic, S. Cryo-electron Microscopy Analysis of Structurally Heterogeneous Macromolecular Complexes. *Comput Struct Biotechnol J* **14**, 385-390 (2016).
128. Sundaramoorthy, R., Fyfe, P.K. & Hunter, W.N. Structure of Staphylococcus aureus EsxA suggests a contribution to virulence by action as a transport chaperone and/or adaptor protein. *Journal of molecular biology* **383**, 603-614 (2008).
129. Dundr, M. et al. The roles of nucleolar structure and function in the subcellular location of the HIV-1 Rev protein. *Journal of cell science* **108 (Pt 8)**, 2811-2823 (1995).
130. Emmott, E. et al. Viral nucleolar localisation signals determine dynamic trafficking within the nucleolus. *Virology* **380**, 191-202 (2008).
131. Umekawa, H. et al. Nucleolar protein B23: bacterial expression, purification, oligomerization and secondary structures of two isoforms. *Cell Mol Biol Res* **39**, 635-645 (1993).
132. Saluri, M. et al. A "grappling hook" interaction connects self-assembly and chaperone activity of Nucleophosmin 1. *PNAS Nexus* **2**, pgac303 (2023).
133. Jumper, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583-589 (2021).
134. Arnold, M.J. AlphaPickle. (2021).
135. Li, L., Li, H.S., Pauza, C.D., Bukrinsky, M. & Zhao, R.Y. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res* **15**, 923-934 (2005).
136. Shyu, Y.J., Suarez, C.D. & Hu, C.D. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay. *Nature protocols* **3**, 1693-1702 (2008).