

TITRE (Français)	FLEXIBILITE AU SEIN DE LA NUCLEOPROTEINE ET DE LA PHOSPHOPROTEINE DES PARAMYXOVIRUS: PREDICTION, CARACTERISATION EXPERIMENTALE ET REPLIEMENT INDUIT
TITRE (English)	FELXIBILITY WITHIN PARAMYXOVIRUS NUCLEOPROTEIN AND PHOSPHOPROTEIN: PREDICTION, EXPERIMENTAL ASSESSMENT AND FOLDING COUPLED TO BINDING
AUTEUR	Johnny Habchi
UNIVERSITE	Université d'Aix-Marseille
DATE	23 Mars 2012
LABORATOIRE	Architecture et fonctions des macromolecules biologiques
DIRECTION DE THESE	Dr Sonia Longhi
PARRAINAGE	-

Les virus Nipah (NiV) et Hendra (HeV) appartiennent au genre Henipavirus au sein de la famille des Paramyxoviridae. Cette famille comporte de nombreux pathogènes tel que le virus de la rougeole (MeV). Les paramyxovirus possèdent un génome de type ARN simple brin encapsidé par la nucléoprotéine (N) au sein d'une nucléocapside hélicoïdale. N interagit avec la phosphoprotéine (P) et cette dernière recrute la polymérase (L) qui assure la transcription et la réplication du génome viral. L'objectif de mon projet de thèse était de caractériser les protéines N et P ainsi que les interactions qui existent entre elles chez les trois virus, NiV, HeV et MeV. A la différence du MeV, qui a été intensivement étudié au cours des dernières années, les données moléculaires et structurales sur les Henipavirus étaient très limitées. A l'aide d'analyses computationnelles, nous avons pu déchiffrer l'organisation modulaire de N et de P, et nous avons montré que les régions, C-terminale de N (N_{TAIL}) et N-terminale de P (PNT), sont prédites comme intrinsèquement désordonnées (RIDs). Les RIDs sont des régions fonctionnelles dépourvues de structures secondaires et tertiaires stables dans des conditions physiologiques. En utilisant des approches biochimiques et biophysiques, nous avons confirmé que N_{TAIL} et PNT sont désordonnées. Elles conservent toutefois des structures secondaires transitoires qui pourraient correspondre à des éléments de reconnaissance moléculaire (ou MoREs) impliqués dans de transitions structurales en présence d'un partenaire. En accord avec cette observation, nous avons montré que les domaines C-terminaux des P (P_{XD}) interagissent avec les régions N_{TAIL} en induisant chez ces dernières un repliement de type hélical. Une grande partie de la thèse a été consacrée à l'étude des mécanismes moléculaires qui gouvernent l'interaction N_{TAIL} - P_{XD} et notamment à la structuration que l' α -MoRE (a.a. 473-493) de N_{TAIL} subit en présence de P_{XD} . Nous avons montré que les complexes N_{TAIL} - P_{XD} conservent une flexibilité résiduelle considérable, une propriété connue sous le nom de « fuzziness ». Nous avons également construit des modèles structuraux des complexes α -MoRE- P_{XD} des Henipavirus. Ces modèles nous ont fourni des indications sur le mécanisme probable d'avancement de la polymérase sur la nucléocapside. L'état désordonné de N_{TAIL} a été également confirmé dans le contexte de nucléocapsides intactes. Dans le cas du MeV, nous avons étudié l'impact structural de substitutions amino acidiques au sein de N_{TAIL} sur son repliement α -hélical induit par P_{XD} ainsi que sur son affinité envers ce dernier. L'impact fonctionnel de ces substitutions sur la processivité de la polymérase et sur l'infectiosité des virus a été étudié dans le contexte de cellules infectées. Les implications fonctionnelles du désordre structural sont discutées au vue de la capacité des RIDs d'établir un partenariat moléculaire complexe conduisant à des effets biologiques multiples.

The Paramyxoviridae family includes many important human and animal pathogens, such as measles virus (MeV), a morbillivirus, and the emerging Nipah (NiV) and Hendra (HeV) viruses, members of the Henipavirus genus. Paramyxoviruses possess a negative-strand RNA genome that is encapsidated by the nucleoprotein (N) into a helical nucleocapsid. N interacts with the phosphoprotein (P), and this latter recruits the polymerase that ensures genome replication and transcription. My PhD project has mainly focused on the characterization of the N and P proteins and on the interactions between these two proteins from the three cognate viruses, namely NiV, HeV and MeV. While MeV has been extensively studied through the past years, structural and molecular information on Henipavirus N and P proteins were rather scarce. Using computational analyses, we deciphered the modular organization of Henipavirus N and P. Intrinsically disordered regions (IDRs) were predicted within these proteins, notably at the C-terminus of N (referred to as N_{TAIL}), and at the N-terminus of P (referred to as PNT). IDRs are functional despite they lack of a well-defined 3-D structure under physiological conditions. Biochemical and biophysical approaches pointed out a mostly disordered state for both N_{TAIL} and PNT, although they were shown to contain short-order prone segments (i.e. molecular recognition elements, MoREs). These latter are involved in partner recognition and

in disorder-to order transitions. The C-terminal domains of the P proteins (referred to as P_{XD}) were found to bind to N_{TAIL} and to induce a helical transition thereof. We herein provide a detailed description of the molecular mechanisms governing the α -helical transition of the MoRE encompassing residues 473-493 within N_{TAIL} upon binding to P_{XD}. We also show that a significant flexibility persists within the N_{TAIL}-P_{XD} complexes, thus providing illustrative examples of ‘fuzziness’. We also built a structural model of Henipavirus α -MoRE-P_{XD} complexes. These models provided insights into the probable mechanism by which the polymerase progresses onto the nucleocapsid template. In addition, we also investigated the disordered state of N_{TAIL} in the context of the full-length N protein and showed that N_{TAIL} retains its flexibility also within nucleocapsids. In the case of MeV, the impact of amino acid substitutions within N_{TAIL} on P_{XD}-induced α -helical folding and on the P_{XD} binding affinity has been assessed, and the functional impact of these substitutions on polymerase processivity and virus infectivity was estimated in the context of infected cells. The functional implications of structural disorder are discussed in light of the ability of IDRs to establish a broad molecular partnership, thereby leading to multiple biological effects.