

Résolution de la structure de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN trimérique des virus influenza : son impact sur notre compréhension des interactions de la polymérase avec les facteurs viraux et cellulaires.

Elise Biquand and Caroline Demeret

Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, CNRS, UMR 3569, Paris, France;  
Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut Pasteur, 28, Rue du Dr. Roux,  
75724 Paris cedex 15, France

1 **RESUME**

2 Les virus influenza sont des virus segmentés à ARN négatif codant pour leur propre ARN  
3 polymérase ARN-dépendante (RpRd), dont les multiples activités sont essentielles pour  
4 le cycle viral. La RpRd comporte trois sous-unités, PB1, PB2 et PA. Elle se fixe aux  
5 extrémités des segments d'ARN viraux (vARN) associés à de multiples copies de la  
6 Nucléoprotéine virale NP, le tout constituant une RibonucléoProtéine Virale (vRNP).  
7 L'ARN polymérase virale catalyse la transcription et la réplication des vARNs dans le  
8 noyau des cellules infectées. La régulation temporelle des activités de l'ARN polymérase  
9 virale est essentielle pour le déroulement normal du cycle viral, mais sa compréhension  
10 a été limitée jusqu'à présent par l'absence d'information concernant la structure du  
11 complexe constituant cette polymérase virale.

12 La résolution atomique de la structure de la RpRd des virus influenza de type A, B et C a  
13 été publiée au cours des deux dernières années. Nous avons compilé dans cette revue les  
14 principales données ressortant de la résolution quasi concomitante des structures  
15 cristallographiques de plusieurs polymérases de virus influenza. Nous tenterons de  
16 mettre en évidence comment les informations de structures peuvent contribuer à notre  
17 compréhension des interactions entre la RpRd virale et les facteurs viraux et cellulaires.

18  
19 Les virus influenza sont des virus segmentés à ARN négatifs source d'importants  
20 problèmes de santé publique malgré la vaccination et l'utilisation d'agents antiviraux.  
21 Une difficulté particulière pour combattre durablement l'infection par les virus influenza  
22 réside dans la grande variabilité génétique de ces virus. La conséquence en est  
23 l'apparition continue de variants qui résistent aux médicaments antiviraux ou  
24 échappent à l'immunité anti grippale induite par la vaccination. La faible fidélité de la  
25 RpRd est responsable d'une telle variabilité génétique. La RpRd est un hétéro trimère  
26 constitué de la protéine basique 1 (PB1), de la protéine basique 2 (PB2) et de protéine  
27 acide A (PA). La RpRd catalyse à la fois la transcription et la réplication des segments  
28 d'ARN viral dans le noyau des cellules infectées. Elle est ainsi capable de réaliser des  
29 activités distinctes sur les matrices d'ARN viral. Le complexe polymérase se fixe à des  
30 séquences conservées dans les régions non-codantes (RNC) situées à l'extrémité de  
31 chaque segment d'ARN viral. L'ARN viral est de plus enroulé sur toute sa longueur  
32 autour d'oligomères de la protéine NP, formant des structures appelées  
33 Ribonucléoprotéines virales (vRNP). La RpRd ne fonctionne que dans le contexte des  
34 vRNPs, qui sont les réelles unités fonctionnelles pour la transcription et la réplication  
35 catalysées par cette enzyme [1-3] pour revues).

36 Après leur entrée dans le noyau, un premier cycle de réplication des ARN viraux  
37 se met en place, au cours duquel la polymérase catalyse la transcription des ARN  
38 messagers viraux (vARNm) [1]. Les extrémités non codantes 5' et 3' (5' et 3' RNC)  
39 constituent le promoteur de la transcription de chaque segment viral. La RpRd utilise  
40 des oligonucléotides coiffés issus de la cellule hôte pour amorcer la synthèse des

41 vARNm. Elle capture tout d'abord un ARN coiffé de l'hôte, ARN non-codant ou ARN pré-  
42 messager, associés avec l'ARN polymérase II cellulaire. Cette capture est réalisée par le  
43 domaine de fixation à la coiffe de la protéine PB2. Puis la protéine PA coupe l'ARN coiffé  
44 cellulaire à 8-10 nucléotides de la coiffe par son domaine endonucléase.  
45 L'oligonucléotide coiffé ainsi clivé sert d'amorce pour la synthèse des ARNm viraux. A  
46 l'extrémité 5' des brins matrices, l'ARN polymérase recopie de manière réitérative une  
47 séquence poly-U commune à tous les segments vARN, générant la poly-adénylation de  
48 extrémité 3' des ARNm et la terminaison de la transcription.

49 La réplication virale s'effectue en deux étapes. Les segments d'ARN des vRNPs sont dans  
50 une premier temps copiés en des brins d'ARN complémentaires (cARN) de polarité  
51 positive. L'association d'oligomères de NP le long des cARN produits, et la fixation d'un  
52 complexe polymérase à leurs extrémités forment les RiboNucleoprotéiques  
53 complémentaires (cRNP). Les cRNP servent de matrice pour la synthèse des ARN viraux  
54 de polarité négative, générant des vRNPs (voir [4, 5] pour revues).

55 D'une part, les vRNPs néo-synthétisées servent, de matrice à la transcription secondaire  
56 d'ARNm viraux pour la synthèse d'un taux élevé de protéines virales. D'autre part, elles  
57 sont exportées du noyau pour être incorporées dans de nouveaux virions, donnant lieu à  
58 la progénie virale. Pour la réplication, la néo-synthèse des brins d'ARN catalysée par la  
59 polymérase virale est indépendante d'amorces oligonucléotidiques. Ce processus  
60 nécessite la mise en jeu de protéines de réplication PB1, PB2, PA et NP nouvellement  
61 synthétisées à la suite de la transcription secondaire. La protéine PB1 présente les  
62 motifs fonctionnels caractéristiques d'une ARN polymérase dépendante d'ARN, et elle  
63 catalyse la polymérisation des brins d'ARN [6]. L'ARN polymérase des virus influenza est  
64 dépourvue d'activité de correction (activité exo-nucléase 3'-5'), d'où l'introduction d'un  
65 taux important de mutations dans les segments viraux répliqués et la variabilité  
66 génétique des virus influenza. L'ARN polymérase virale a d'autres activités importantes  
67 pour le cycle viral indépendantes de la réplication des segments d'ARN viraux, dont un  
68 rôle dans l'épissage des ARNm du segment NS1 [7] ou dans le transport des vRNPs à  
69 travers le cytoplasme ([3] pour revue).

70 L'ARN polymérase des virus influenza apparait donc comme un complexe  
71 protéique polyvalent, qui assure des activités multiples vis-à-vis des ARN viraux, dont la  
72 coordination temporelle est essentielle au déroulement du cycle viral. Jusqu'à présent,  
73 les mécanismes à la base de ces différentes activités et de leur régulation étaient peu  
74 compris au niveau moléculaire. Les activités de transcription et de réplication de la  
75 polymérase virale sont supposées être dépendantes à la fois de ses caractéristiques  
76 intrinsèques et de ses interactions avec différents facteurs cellulaires et viraux. Cette  
77 notion n'est cependant soutenue que par un petit nombre de résultats expérimentaux,  
78 en raison notamment du manque d'information concernant la structure du complexe  
79 polymérase. En effet, on connaissait jusqu'à récemment uniquement la structure de  
80 sous-domaines de protéines virales : pour la protéine PA, les domaines N-terminal  
81 endonucléase (PA-ENDO) et le domaine C-terminal associé aux 16 acides aminés (aa) N-  
82 terminaux de la protéine PB1 [8, 9], et pour la protéine PB2, le domaine de fixation à la  
83 coiffe (PB2-CAP, [10]), les deux domaines C-terminaux, désignés domaine 627-K et  
84 domaine du signal de localisation nucléaire (PB2-NLS) [11, 12], et l'extrémité N-  
85 terminale en complexe avec l'extrémité C-terminale de PB1 [13]. Aucune information  
86 n'était disponible concernant la structure de PB1, en dehors de ses extrémités N et C-  
87 terminales en association respectivement avec des domaines de PA et de PB2. La  
88 résolution atomique de plusieurs structures cristallographiques du complexe  
89 polymérase de virus influenza été publiée dans un laps de temps remarquablement

90 court, concluant de nombreux essais infructueux dus à la difficulté de produire les unités  
91 purifiées de la polymérase virale en quantité suffisante pour être cristallisées [14-17].  
92 Deux articles, publiés dans le numéro du 18 décembre 2014 de « Nature », ont décrit la  
93 structure de la polymérase de virus influenza co-cristallisée avec des oligonucléotides  
94 synthétiques mimant le promoteur viral, représentant les extrémités 3' et 5' d'un  
95 segment d'ARN viral. L'une de ces polymérases était issue d'un virus influenza A de la  
96 chauve-souris [16], l'autre d'un virus influenza B humain [15]. La structure de l'ARN  
97 polymérase d'un virus influenza de type C humain a été publiée par la suite sans ARN  
98 viral associé (apo-polymérase flu C ou apo-fluC) [14]. Enfin, au début de l'année 2016, la  
99 publication de la structure d'une polymérase d'un virus influenza B humain associée à  
100 une extrémité 5' d'un cARN viral vint compléter ces données [17]. Ces études ont tout  
101 d'abord grandement implémenté nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans  
102 la capture de coiffe et dans la polymérisation de l'ARN, dépendante ou indépendante  
103 d'amorce. Ces aspects mécanistiques sont passés en revue dans le contexte plus large  
104 des ARN polymérases dépendantes de l'ARN des virus segmentés à ARN négatifs [18].  
105 Prises dans leur ensemble, ces études structurales ont également permis réaliser  
106 instantanément que le complexe polymérase peut adopter des conformations variées  
107 (figure 1-a). Nous décrirons dans cet article de revue les caractéristiques principales  
108 mises en évidence pour les différentes structures de l'ARN polymérase des virus  
109 influenza, puis nous présenterons ce que ces connaissances apportent à notre  
110 compréhension des interactions entre la polymérase virale et les facteurs cellulaires ou  
111 viraux.

112

### 113 **Le cœur invariant de la RpRd.**

114 La RpRd virale s'organise autour d'un cœur invariant, composé de la protéine  
115 PB1, de la partie N-terminale de PB2 (PB2-N) et C-terminale de PA (PA-C) (Figure 1-b).  
116 La partie centrale de la sous-unité PB1 adopte une conformation typique des ARN-  
117 polymérases-ARN-dépendantes (cœur RpRd), pouvant s'apparenter à la forme d'une  
118 main [19]: elle contient une paume portant les motifs fonctionnels de polymérisation de  
119 l'ARN, entourée de part et d'autre par les doigts et le pouce. La polymérisation des brins  
120 d'ARN s'effectue dans une large cavité interne, appelée chambre catalytique. Une boucle  
121 d'amorçage, impliquée dans l'initiation de la synthèse non amorcée des ARNs [20],  
122 émerge de la cavité centrale à partir du pouce de PB1 (Figure 2-a). Le cœur RpRd de la  
123 protéine PB1 est flanqué de chaque côté par PB2-N et PA-C (Figure 2-b), avec un  
124 entrelacement extensif des trois sous-unités de la polymérase. Les études  
125 cristallographiques antérieures appliquées à des sous-domaines des protéines de  
126 réplication [9, 13, 21] avaient amplement sous-estimé la surface enfouie des sous-unités  
127 constituant la RpRd. Cette dernière s'avère former une structure compacte, de laquelle  
128 émerge un feuillet  $\beta$  de PB1 contenant le signal de localisation nucléaire bipartite des  
129 protéines PB1 des virus influenza A et B (Figure 2-b).

130

### 131 **La fixation du promoteur viral au cœur de la polymérase.**

132 Les polymérases des virus influenza A de chauve-souris (fluA) et influenza B  
133 humain (fluB) ont été cristallisées associées à des extrémités 3' et 5' d'un vARN,  
134 fournissant une image de la fixation du promoteur viral à la polymérase. La région  
135 distale du promoteur est appariée en une molécule d'ARN double brin, et ne se lie pas à  
136 la polymérase, alors que les extrémités 3' et 5' sont simple-brin (figure 3-a) et se fixent à  
137 différentes interfaces du complexe polymérase.

138 La liaison du 3'vARN implique les trois sous-unités de la polymérase et de  
139 nombreuses interactions spécifiques ARN-protéine (figure 3-b). L'extrémité 3' du vARN  
140 adopte une forme d'arc, avec sa partie terminale 3' proche de la région distale double  
141 brin du promoteur (figure 3-c). Pour entrer dans le site catalytique, l'extrémité 3' de du  
142 vARN telle qu'elle a été cristallisée est supposée changer d'orientation, ce qui  
143 impliquerait une modification conformationnelle de l'ARN-polymérase au niveau des  
144 interfaces de liaison à l'ARN. L'extrémité 5' du vARN forme grâce à des appariements  
145 intra-brin une structure en épingle, conformément à ce qui avait été prédit dans des  
146 études précédentes [22]. Elle se lie à une poche formée par les sous-unités PB1 et PA via  
147 de nombreuses interactions entre acides-aminés et bases (figure 3-d). Les liaisons sont  
148 les mêmes qu'il s'agisse d'un 5'vARN ou 5c'ARN [17]. Il est à noter que la liaison des  
149 vARN au corps de la polymérase fait partie intégrante de sa structure.

150

### 151 **Les différents agencements des domaines de la RpRd.**

152 Les deux derniers tiers de la protéine PB2 (PB2-C), et le domaine endonucléase  
153 N-terminal de PA (PA-ENDO) sont agencés de manière distincte selon la structure de la  
154 polymérase. Cela entraîne des différences dans la forme globale de l'ARN polymérase  
155 virale (figure 1-a), et souligne une plasticité notable autour du corps central de la  
156 polymérase. Ces domaines sont donc probablement des acteurs majeurs de la versatilité  
157 de la polymérase virale. Plusieurs sous-domaines sont identifiables dans PB2-C : sous-  
158 domaine central (milieu), liaison à la coiffe (CAP), la charnière cap-627, sous-domaine  
159 contenant l'acide aminé 627 (627) et le signal de localisation nucléaire (NLS) [17]. Bien  
160 que la structure des sous-domaines de PB2-C soit similaire dans les différentes  
161 configurations de la RpRd, ces derniers diffèrent dans leur positionnement relatif. Les  
162 sous-domaines central et cap-627 forment une structure rigide autour de laquelle  
163 s'articulent différemment les sous-domaines 627 et CAP (figure 4). Il apparaît donc que  
164 la sous-unité PB2 adopte des conformations distinctes selon les configurations de la  
165 polymérase. Notons qu'une conformation similaire de PB2 est observée dans la  
166 polymérase fixée à une extrémité 5'cARN, dans l'apo-polymérase, et dans le domaine  
167 PB2-C isolé (pdb 5FMM and pdb 5FML) [17], en dehors du domaine NLS non résolu dans  
168 ce dernier.

169

### 170 **La conformation compétente pour la transcription.**

171 La polymérase adopte une conformation en U lorsqu'elle est liée à un vARN 5'+3'  
172 mimant un promoteur viral (pdb 4WSB et pdb 4WSA)[15, 16], ou uniquement à un  
173 vARN 5' (pdb 5FMZ,[17]) (figure 1).

174 Dans cette conformation, les domaines PB2-CAP et PA-ENDO forment des  
175 protrusions qui se font face de part et d'autre d'un canal exposé aux solvants, dont  
176 l'entrée rejoint le centre catalytique au cœur de la polymérase (figure 5-a).

177 Deux positions alternatives peuvent être distinguées pour le domaine PB2-CAP.  
178 Dans la structure de la polymérase du virus influenza A de chauve-souris, le site de  
179 fixation à la coiffe au sein du domaine PB2-CAP pointe vers le domaine endonucléase de  
180 PA de l'autre côté du canal les séparant (Figure 5-a). Dans cette orientation, la fixation  
181 de la coiffe d'un ARN pré-messager au domaine PB2-CAP amène les nucléotides entre la  
182 10<sup>ième</sup> et 15<sup>ième</sup> position en face du site catalytique du domaine endonucléase de PA, ce  
183 qui est compatible avec un clivage entre ces positions. Ceci est en accord avec les  
184 longueurs observées pour les oligonucléotides libérés après clivage par PA.

185 Dans la structure de la polymérase du virus influenza B fixé au promoteur viral, le  
186 domaine CAP de PB2 est dévié de 70 Å par rapport à sa position dans la polymérase

187 influenza A de chauve-souris, de telle manière que le site de fixation à la coiffe de PB2  
188 soit dirigé vers le site catalytique de la polymérase, détourné du domaine endonucléase  
189 de PA (figure 5-a et 5-b). Cette configuration est compatible avec l'entrée de l'extrémité  
190 3' de l'oligonucléotide coiffé dans le centre catalytique de la polymérase. Elle est ainsi  
191 supposée correspondre à la polymérase virale compétente pour l'initiation de la  
192 synthèse dépendante de coiffe des ARNm viraux [15]. Les différences de structure entre  
193 les deux polymérase liées au promoteur viral suggère qu'un changement  
194 conformationnel intervient au cours de la transcription des ARNm viraux [15].

195 La position d'un produit d'élongation de la transcription, un duplex ARN  
196 matrice/transcrit, a pu être modélisé dans la polymérase influenza d'après celle de la  
197 polymérase du virus la polio [23]. On peut observer alors que la sortie du brin matrice  
198 de vARN serait bloquée par des hélices  $\alpha$  de PB2-N, désignées comme le « couvercle  
199 hélical ». Ce couvercle hélical interviendrait dans la séparation des brins  
200 matrice/transcrit, qui sortiraient de la polymérase par des canaux différents [23]. Le  
201 brin d'ARN transcrit sortirait du cœur catalytique de la polymérase entre les domaines  
202 PB2-CAP et PB2-627 [15] (figure 5-c). A la fin du processus d'élongation, la progression  
203 du brin matrice dans le site catalytique serait bloquée par la fixation de son extrémité 5'  
204 à la polymérase. La séquence poly-U située 17 à 22 nt en amont de l'extrémité 5' serait  
205 alors retenue dans le site catalytique, ce qui générerait l'addition de poly A à l'ARNm  
206 viral [24].

207

### 208 **Les conformations liées au 5'cARN et apo-polymérase.**

209 L'agencement de la protéine PB2 est totalement différent dans la polymérase  
210 virale fixée à l'extrémité 5' d'un cARN viral [17]. On remarque en particulier un  
211 déplacement important des domaines PB2-627 et PB2-NLS par rapport à la polymérase  
212 compétente pour la transcription (figure 6-a). Dans cette configuration, le domaine PB2-  
213 CAP est en contact avec la protéine PB1 et avec la charnière cap-627 de PB2.

214 Le site de fixation à la coiffe est ainsi positionné contre la charnière cap-627, et  
215 n'est pas accessible (figure 6-b). Une organisation similaire de la protéine PB2 est  
216 observée pour l'apo-polymérase du virus influenza de type C (figure 6-a) [14].  
217 L'obstruction du site de fixation à la coiffe de PB2 suggère une activité de capture de  
218 coiffe entravée, ce qui a été vérifié expérimentalement [14, 17]. Cela interdit donc la  
219 synthèse dépendante d'amorce des ARNm viraux. Au contraire, dans sa configuration  
220 liée à un 5' cARN, la polymérase catalyserait la synthèse d'un vARN à partir d'un cARN  
221 pour la réplication [17]. En l'absence d'ARN, l'apo-polymérase adopterait une  
222 conformation « fermée » [14]. Elle pourrait néanmoins catalyser la réplication après  
223 stabilisation de la boucle d'amorçage, apparue non-structurée dans le cristal obtenu  
224 [14].

225 Dans la polymérase associée au 5' cARN, le domaine NLS de PB2 est apposé à PA-  
226 ENDO, via une large interface d'interaction. Un tel agencement implique la rotation de  
227 PA-ENDO par rapport à la polymérase associée au promoteur. Dans cette configuration,  
228 domaine NLS de PB2 est éloigné du domaine PB2-627. Dans l'apo-polymérase fluC, des  
229 interactions similaires existent entre PB2-NLS et PA-ENDO (P3 dans fluC), suivant une  
230 orientation telle que le PB2-NLS est proche de PB2-627 (figure 6-a).

231

### 232 **La remarquable flexibilité de la polymérase des virus influenza.**

233 La résolution de plusieurs structures cristallographiques distinctes pour la  
234 polymérase des virus influenza souligne en premier lieu une organisation différente de  
235 la polymérase virale associée au promoteur, associée au 5' cARN, ou sans ARN. Le

236 comportement en solution de différents complexes polymérase a de plus mis en  
237 évidence des degrés variables de compaction [17]. L'apo-polymérase, et un complexe  
238 polymérase associé uniquement à l'extrémité 3' du vARN présentent une conformation  
239 étendue. Toutes deux semblent être flexibles, d'après l'hétérogénéité conformationnelle  
240 qu'elles présentent en solution. Les formes de la polymérase associées à une extrémité  
241 5'RNA sont plus compactes en solution. La liaison à haute affinité d'une extrémité  
242 5'vARN (de l'ordre de 2nM [25]) ou 5'cARN induirait donc une compaction de la  
243 polymérase en une structure plus rigide, dont la conformation serait déterminée par le  
244 type d'extrémité 5' (5'vARN ou 5'cARN) fixée [17]. Une gamme plus importante de  
245 conformations alternatives a été mise en évidence par des expériences de réticulation  
246 chimique (« cross-linking »). Les modules structuraux de PB2-C (central, CAP, charnière  
247 cap-627, 627 et NLS) semblent adopter des agencements variés, et au niveau  
248 intramoléculaire, et par rapport aux autres sous unités du complexe polymérase PB1  
249 [17].

250

### 251 **La formation potentielle d'oligomères de RpRd.**

252 Un niveau supplémentaire de complexité provient de la formation potentielle d'homo-  
253 oligomères par les trimères constituant la RpRd.

254 En effet, à l'examen cryomicroscopie électronique, un complexe polymérase dépourvu  
255 du domaine C-terminal de PB2 (contenant PB2 N 1-130), désigné sous-complexe I,  
256 s'assemble en dimères en solution, et forme des tétramères après fixation des  
257 extrémités 5'vARN ou 5'cARN [26]. D'après ces résultats, la fixation du promoteur à la  
258 polymérase régulerait le degré d'oligomérisation du complexe polymérase. Le niveau de  
259 résolution obtenu dans ces études a permis de déterminer les interfaces  
260 d'oligomérisation, sans pouvoir cependant préciser la localisation des acides aminés  
261 (aa) impliqués n'a pas été possible. L'interface de dimérisation implique des hélices  $\alpha$   
262 issues des domaines PA-C (aa 292/291 à 355/352, coordonnées pour les virus humains  
263 fluA H5N1 et fluB respectivement) et PB2-N (hélices attribuées aux aa 86/88-130/132  
264 pour H5N flu A et flu B humains, respectivement [26]). Ces hélices sont adjacentes dans  
265 les structures dérivées de la cryomicroscopie électronique (figure 7-a) [26]. La  
266 formation de tétramères serait due à une interaction plus faible, impliquant  
267 principalement les doigt  $\alpha$  hélicaux de PB1-N. L'interface de cette interaction n'est pas  
268 précisément caractérisée, en dehors de la participation des aa 180-205 et 355-375 de  
269 PB1.

270 L'oligomérisation du complexe polymérase est compatible avec le modèle de trans-  
271 répliation. Ce dernier propose qu'un complexe apo-polymérase, recruté à l'extrémité  
272 5'cARN d'une RNP par l'intermédiaire d'interactions avec le complexe polymérase  
273 associé à cette RNP, appelée polymérase « résidente », catalyse la répliation du brin  
274 ARN matrice [27]. Au contraire, la synthèse de l'ARNm viral serait effectuée par la  
275 polymérase résidente (conformation *cis*) [4, 27]. Des transitions dans l'état  
276 d'oligomérisation pourraient participer à la régulation entre activités de transcription et  
277 de répliation de la polymérase. La conformation compatible avec la formation de  
278 dimères et tétramères devrait donc correspondre à l'état actif pour la répliation [26],  
279 soit potentiellement la polymérase associée au 5'cARN et l'apo-polymérase. Cependant  
280 dans ces deux conformations, les hélices  $\alpha$  de PB2 et de PA prenant part à  
281 l'oligomérisation ne sont pas contiguës. De plus, les hélices  $\alpha$  de PB2 sont partiellement  
282 recouvertes et ne sont donc pas entièrement accessibles à la surface de la polymérase  
283 (figure 7-b). Les structures cristallographiques obtenues jusqu'à présent ne sont donc  
284 pas conciliables avec le modèle de cryomicroscopie électronique pour la formation de

285 dimères y compris la conformation de la polymérase associée au promoteur viral. On  
286 peut néanmoins supposer l'existence de conformations compatibles avec la formation  
287 de dimères, et, éventuellement, de tétramères, mais elles n'ont pas encore été  
288 objectivées dans un cristal à cause de la flexibilité de la polymérase.  
289

### 290 **La polymérase dans le contexte de la RNP.**

291 L'entité fonctionnelle des virus influenza pour la transcription/réplication est la  
292 RNP. L'assemblage des segments d'ARN viraux en RNP est essentiel au processus de  
293 réplication, qui requiert la fixation de la protéine NP aux brins vARN et cARN néo-  
294 synthétisés. Au contraire, les ARNm viraux naissant ne sont pas associés à NP au cours  
295 du processus de transcription. Que ce soit pour la réplication ou la transcription, on  
296 pense que les protéines NP sont localement dissociées de l'ARN matrice pour permettre  
297 son entrée dans le site catalytique de la polymérase, et y sont réassociées dès sa sortie. Il  
298 a également été proposé que les NP soient impliquées dans la régulation de la transition  
299 entre activités de transcription et de réplication de la polymérase [28].

300 La reconstitution tridimensionnelle d'une mini-RNP comprenant des  
301 segments vARN raccourcis à partir d'images de cryomicroscopie électronique montre  
302 des contacts protéiques entre les monomères de NP adjacents au promoteur et le  
303 complexe polymérase, sans identifier précisément les interfaces d'interaction au niveau  
304 moléculaire [29,30]. Néanmoins, la structure suggère des interactions entre les sous  
305 unités PB1 et PB2 et les deux molécules de NP adjacentes au complexe polymérase fixé  
306 au promoteur. Ces données sont en accord avec des études précédentes, qui avaient  
307 montré des interactions entre NP et PB1, PB2 mais pas avec PA [31,32]. En modélisant la  
308 structure de la polymérase dans le modèle de mini-RNP, l'interface d'interaction entre  
309 PB1 et NP a pu être située au niveau du ruban  $\beta$  flexible de PB1 dépassant du cœur de la  
310 polymérase, qui contient le signal de localisation nucléaire de PB1, au moins chez les  
311 virus influenza A et B, et participe à l'interface de liaison de la polymérase avec les  
312 extrémités 3' des vARN [15]. Dans les conformations liées au promoteur viral, ce ruban  $\beta$   
313 se projette à distance du cœur de la polymérase (figure 8-a), et pourrait se localiser à  
314 proximité de la NP adjacente au promoteur. En l'absence du 3' d'un vARN, il est replié  
315 contre le cœur de la polymérase [15,17].

316 La sous-unité PB2 manque de densité électronique dans la structure pseudo-  
317 atomique de mini-RNP, et seules les premières hélices  $\alpha$  (aa 1-24) peuvent être ajustées  
318 sur la structure mini-RNP, ce qui indique qu'elles sont proches d'un monomère de NP  
319 [15]. Ces hélices  $\alpha$  N-terminales de PB2 sont systématiquement à la surface de la  
320 polymérase, proches du ruban  $\beta$  de PB1 qui lie l'autre monomère de NP (figure 8-a).  
321 Elles correspondent également à l'interface d'interaction PB2-N/PB1-C résolue à partir  
322 de domaines isolés [13], ce qui pourrait expliquer qu'un recouvrement ait été détecté  
323 entre les domaines d'interactions avec PB1 et avec NP dans la protéine PB2 [33]. Les  
324 hélices  $\alpha$  N-terminales de PB2 sont proches du site de sortie des ARN matrices (figure 8-  
325 b), ce qui suggère qu'elles constituent des interfaces de liaison à NP potentiellement  
326 importantes pour la liaison de NP sur l'ARN matrice sortant (figure 8-b). D'autres  
327 surfaces d'interactions entre PB2 et NP ont été observées sur la structure mini-RNP  
328 mais n'ont pu être cartographiées [29,30].

329 Une interface d'interaction avec NP a de plus été détectée à l'opposé de la  
330 polymérase, au niveau du domaine 627K de PB2 [32,33]. Les acides aminés 627  
331 (généralement K dans les polymérases adaptées à l'homme, E dans les polymérases  
332 d'origine aviaire) et 630 de PB2 qui sont importants pour l'adaptation à l'hôte  
333 moduleraient la liaison de PB2 avec NP et affecteraient les activités de la RNP selon un

334 travail [32], mais non confirmé par d'autres auteurs [34]. Dans la configuration de la  
335 polymérase liée au 5'cARN, le domaine 627K est très accessible, formant une  
336 protubérance avec les aa 627 et 630 bien exposés. En considérant cette configuration  
337 active pour la synthèse des cARN en vARN, on peut supposer que la liaison de NP au  
338 domaine 627K de PB2 est impliquée dans la fixation des protéines NP sur les brins  
339 répliqués de vARN. Ceci impliquerait que la sortie des brins de vARN naissants soit  
340 proche du domaine 627K de PB2. On peut alors postuler que les brins répliqués de vARN  
341 empruntent le tunnel délimité d'un côté par les domaines PB2-NLS/PA-ENDO, de l'autre  
342 côté par les sous-domaines milieu, et charnière coiffe-627K de PB2-C (figure 8-b). Le  
343 domaine 627K est plus accolé au cœur de la polymérase dans d'autres conformations de  
344 la polymérase, ce qui suggère une flexibilité et une surface d'interaction avec NP  
345 réduites (figure 8-b).

346

### 347 **Les acides aminés impliqués dans l'adaptation à l'hôte.**

348 L'adaptation des virus influenza A aux mammifères est un domaine de recherche  
349 en pleine expansion, et il a été montré que de nombreux aa sont impliqués dans les  
350 processus d'adaptation à l'hôte. Un certain nombre d'aa de la polymérase ont été  
351 identifiés comme étant soumis à des pressions d'adaptation : 24 dans PB2, 6 dans PB1 et  
352 3 dans PA [35,36]. On pense que ces aa, que nous appellerons aa d'adaptation,  
353 optimisent les interactions du complexe polymérase avec les facteurs du nouvel hôte.  
354 Bien que les questions de spécificité d'hôte soient plus pertinentes pour les virus  
355 influenza A, la position des aa d'adaptation sera présentée pour les structures de la  
356 polymérase du virus influenza B car elles sont les seules qui permettent de comparer les  
357 conformations compétentes pour la transcription et celles liées à une extrémité 5' d'un  
358 cARN. Etant donné leur grande similarité, on admettra que les aa d'adaptation ont des  
359 positions similaires dans les structures des polymérases des virus influenza A et B.

360 Dans PA, deux aa qui jouent un rôle dans l'adaptation à l'hôte (M352 et G548  
361 pour fluB, R356 et T552 pour fluA) sont localisés à la surface du cœur de la polymérase,  
362 un troisième est exposé à la surface du domaine endonucléase (fluB E98, fluA T97)  
363 (figure 9). Pour PB1, six aa d'adaptation ont été décrits, deux sont exposés à la surface  
364 de la polymérase (fluB 52K, 583K; fluA 52K, 584K), alors que les autres sont à l'intérieur  
365 (105A et 516V pour fluB, 105N et 517V pour fluA). Par ailleurs l'aa 13P (pour fluA et  
366 fluB) est caché dans la conformation transcription mais bien exposé dans la  
367 conformation associée au 5'cARN, alors que l'inverse s'applique à un autre aa (D677  
368 fluB, S678 (fluA) (figure 9-a). Ces aa pourraient être accessibles pour des interactions  
369 avec les facteurs de l'hôte contribuant respectivement à la réplication et à la  
370 transcription des segments vARN dans les cellules humaines. La plupart des mutations  
371 d'adaptation concernent la sous-unité PB2. Dans sa partie N-terminale, dans le cœur de  
372 la polymérase, plusieurs aa impliqués dans le processus d'adaptation tapissent  
373 l'interface d'interaction avec PB1 (figure 9-b). Ces aa pourraient être impliqués dans des  
374 interactions de la sous-unité PB2 isolée avec les facteurs de l'hôte, ou être nécessaires  
375 pour la formation efficace d'un complexe polymérase via des interactions optimisées  
376 avec une sous-unité PB1 adaptée aux mammifères. De telles mutations ne sont  
377 cependant pas observées au niveau des interfaces d'interaction entre sous-unités sur les  
378 protéines PB1 et PA. Les mutations d'adaptation localisées dans la partie C-terminale de  
379 PB2, domaines 627K et NLS, *i.e.* E570/T569, M589/T588, Q592/R591, K627/K627,  
380 Q664/M661, R686/G682, D705/D701, P706/K702 (coordonnées pour fluB/fluA), sont  
381 majoritairement à la surface. Leur exposition pourrait cependant varier en fonction de la  
382 conformation de la polymérase. Dans la conformation compétente pour la transcription

383 (figure 9-c, gauche), seul l'aa E570 est facilement accessible car tourné vers l'extérieur  
384 de la structure de la polymérase, alors que les aa M589/Q592/K627 forment un groupe  
385 relativement enfoncé dans le tunnel de sortie des ARNm, et R686 est proche de la sous-  
386 unité PA (figure 9-c). L'aa D705 (fluB) D701 (fluA) est bien exposé sur le domaine NLS  
387 de PB2 uniquement dans la forme de la polymérase compétente pour la transcription,  
388 où il forme un groupe en surface avec P706 (fluB) dans le voisinage de la sous-unité PA  
389 (figure 9-c). Un aa sous pression de sélection, Leu476, se situe dans le domaine PB2-  
390 CAP, ce qui suggère que des mécanismes spécifiques de l'hôte pourraient être mis en jeu  
391 dans la reconnaissance des ARNm coiffés. L'accessibilité des aa d'adaptation est plus  
392 évidente dans la conformation de la polymérase compétente pour la réplication. En effet,  
393 le domaine PB2-627K y a un positionnement externe, avec le groupe d'aa  
394 M589/Q592/K627, les aa Q664, E570 et E718 tournés vers l'extérieur (figure 9-c). Dans  
395 cette même conformation, deux aa d'adaptation dans PB2-C, E718 et V762, sont exposés  
396 à la surface du NLS et apposés contre le domaine endonucléase de PA. Le peptide NLS  
397 n'est pas résolu dans la conformation compétente pour la transcription, ce qui reflète  
398 probablement une conformation étendue (figure 9-c). La grande accessibilité des aa  
399 d'adaptation du domaine PB2-627K dans la conformation compétente pour la  
400 réplication soutient l'hypothèse de leur implication dans des interactions  
401 majoritairement impliquées dans le processus de réplication.  
402

#### 403 **Les acides aminés importants pour la fixation à des facteurs de l'hôte.**

404 La polymérase des virus influenza est supposée exploiter de manière régulée les  
405 facteurs de la cellule hôte lors de la transcription et de la réplication des vARN. De  
406 nombreux facteurs cellulaires impliqués dans le cycle viral ont été identifiés par des  
407 études à haut débit de suppressions ciblées par ARN interférants (siARN ou shARN) [37-  
408 40]. Par ailleurs, l'établissement d'interactomes ont permis d'identifier des facteurs de  
409 l'hôte comme partenaires potentiels de la polymérase [41-44]. Le recouvrement entre  
410 partenaires putatifs identifiés par ARNi et ceux identifiés par criblage de liaison est  
411 cependant limité. Or, seulement un petit nombre d'interactions a été précisément étudié,  
412 et, dans la plupart des cas, sans même savoir quelle(s) sous-unité(s) de la polymérase  
413 est (sont) impliquée(s). La structure de la polymérase fournit aujourd'hui des éléments  
414 de compréhension des interactions entre polymérase virale et facteurs de l'hôte.  
415

#### 416 **Interaction avec les importines.**

417 Après leur synthèse dans le cytoplasme, la sous-unité PB2 d'un côté, le dimère PB1-PA  
418 de l'autre, sont dirigés vers le noyau [11,45]. L'import nucléaire du dimère PB1-PA  
419 repose sur la liaison de PB1 à RanBP5. Cette interaction implique une interface de PB1  
420 localisée dans le ruban  $\beta$  flexible qui sort du complexe polymérase et contient le NLS  
421 bipartite de la protéine [46]. Dans le contexte de la RNP, le même ruban  $\beta$  semble  
422 engagé dans une interaction avec une des protéines NP proche du promoteur. On peut  
423 donc supposer que ce ruban  $\beta$  est impliqué dans l'import nucléaire de PB1 par  
424 recrutement de RanBP5 uniquement dans le contexte du dimère PB1-PA.

425 Cinq aa ont été décrits pour leur implication dans l'interaction entre le domaine C-  
426 terminal de PB2 et les importines  $\alpha$  [47] : 701D 737R, 738K, 752K et 755R (fluA) ou  
427 705D, 740R, 741K, 756K et 759R (fluB). De plus, la liaison de PB2 aux importines  $\alpha$   
428 serait impliquée dans l'efficacité de l'activité des polymérases 627K adaptées à l'homme,  
429 indépendamment de son rôle dans l'import nucléaire de PB2 [48].

430 Dans la forme compétente pour la réplication du complexe polymérase, le peptide C-  
431 terminal de PB2 contenant le NLS forme une grande hélice  $\alpha$  apposée au domaine

432 endonucléase de PA, et tous les aa interagissant avec les importines  $\alpha$  sont accessibles  
433 hormis D705 (figure 10-a). Cependant, il a été montré que ce peptide ne doit pas être  
434 structuré pour se fixer efficacement aux importines  $\alpha$  [11]. Par conséquent, l'interaction  
435 entre PB2 et importines  $\alpha$  doit être interdite dans la conformation du complexe  
436 polymérase associé au 5'cARN. Au contraire, la liaison aux importines  $\alpha$  peut  
437 probablement avoir lieu dans le complexe polymérase compétent pour la transcription,  
438 où, d'après son manque de densité en électrons, le peptide NLS de PB2 doit être dans un  
439 état étendu et flexible. Ceci suggère que les importines  $\alpha$  pourraient avoir un impact sur  
440 le processus de transcription catalysé par la polymérase 627K adaptée à l'homme, plutôt  
441 que sur celui de la réplication. L'interaction PB2/importines dans la polymérase  
442 compétente pour la transcription prendrait également part à l'import nucléaire des  
443 vRNA entrantes, en complément cependant du rôle principal exercée par la protéine NP  
444 [3]. Les isoformes des importines  $\alpha$  sont différemment fixées par PB2 selon l'adaptation  
445 humaine ou aviaire des virus influenza : donc l'interaction entre PB2 et les importines  $\alpha$   
446 pourrait prendre part au mécanisme d'adaptation à l'hôte [49]. Cette interaction  
447 influence probablement l'efficacité de l'entrée de la protéine PB2 isolée dans le noyau.  
448

#### 449 Interaction avec l'ARN polymérase II cellulaire et avec le facteur modulateur de la 450 transcription hCLE.

451 Le complexe polymérase des virus influenza interagit avec le domaine C-terminal de  
452 l'ARN polymérase II (polII) active transcriptionnellement [50]. Dans le contexte de la  
453 vRNP, cette interaction est supposée permettre la liaison de la polymérase virale aux  
454 ARN coiffés de l'hôte, nécessaire au processus de capture de coiffe. Une interaction  
455 directe avec l'ARN polII a été détectée récemment, mais l'interface d'interaction sur le  
456 complexe polymérase des virus influenza n'a pas été caractérisée [50]. Il a été proposé  
457 que l'association de la polymérase virale avec l'ARN polII soit mise en place par  
458 l'intermédiaire du facteur humain modulateur de la transcription, hCLE [51]. Deux  
459 régions de PA ont été identifiées comme domaines d'interaction avec hCLE [52]. Au sein  
460 du complexe de la polymérase virale, ces deux domaines sont positionnés dans une  
461 poche proche du site de fixation au vARN, et ne sont donc pas accessibles (figure 10-b).  
462 Leur rôle potentiel dans le recrutement de l'ARN polII pour permettre la capture de  
463 coiffe, qui avait été initialement proposé, n'est donc pas corroboré par les données  
464 cristallographiques. La localisation de l'interface d'interaction de PA avec hCLE suggère  
465 plutôt un rôle dans des processus impliqués à la fois dans la transcription et dans la  
466 réplication.

467 La dégradation de l'ARN polII au cours de l'infection virale est un déterminant de la  
468 pathogénicité, et les aa 504 de PB2 et 550 de PA (coordonnées pour FluA) semblent  
469 impliqués dans la capacité du virus d'induire une telle dégradation [53]. L'aa 550 de PA  
470 est localisé à côté de l'interface d'interaction avec hCLE, et est bien exposé (figure 10-b),  
471 suggérant un lien fonctionnel entre la fixation de hCLE et l'induction de la dégradation  
472 de l'ARN polII. L'aa 504 de PB2 est positionné sur la face opposée de la polymérase, au  
473 niveau de la charnière cap-627 proche du site de fixation à la coiffe (figure 10-b). Etant  
474 donnée la distance entre ces deux aa, un facteur supplémentaire pourrait être recruté  
475 par la polymérase virale pour induire la dégradation de l'ARN polII. Une telle  
476 dégradation est associée avec l'augmentation de l'ubiquitination de l'ARN polII,  
477 suggérant une interaction avec un facteur de recrutement du système ubiquitine-  
478 protéasome [54]. L'aa 504 de PB2 semble plus accessible dans la polymérase FluB  
479 compétente pour la transcription que dans sa forme associée à un 5'cARN, où il est situé  
480 dans une poche de PB2, caché dans l'apo-polymérase.

481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529

### L'identification par des études haut-débit de facteurs de l'hôte associés à la RpRd.

Des facteurs de l'hôte ont été déterminés, par des études bas-débit, comme ayant un rôle dans le cycle viral en interagissant avec la polymérase virale [3]. Plus récemment, la cartographie à haut-débit d'interactions virus-hôte a conduit à l'identification d'un grand nombre de facteurs cellulaires interagissant soit avec la RNP en contexte infectieux [41, 43], soit avec des sous-unités isolées de la polymérase [38, 42, 44]. Le recouvrement entre les facteurs cellulaires identifiés dans ces différentes études est faible. Cependant, certaines fonctions cellulaires sont plus fréquemment retrouvées comme étant ciblées par la polymérase virale, dont les chaperons moléculaires, le métabolisme de l'ARN et le transport nucléo-cytoplasmique. La plupart des liens fonctionnels de ces partenaires-candidats avec les activités de la polymérase ou de ses sous-unités isolées ne sont cependant pas connus.

Des études structurales récentes, on peut déduire les interfaces de liaison exposées de façon distincte selon la conformation de la polymérase. Dans la polymérase associée au promoteur viral 5'+3', une face du domaine PB2-CAP et des aa du sous-domaine « milieu » de PB2 forment des surfaces exposées (figure 11). Ces surfaces ne sont pas accessibles dans la conformation liée au 5'cARN ou dans l'apo-polymérase (figure 11). Elles pourraient donc être impliquées dans des interactions engagées par la polymérase associée aux extrémités 3'+5' de l'ARN. Ceci pourrait s'appliquer à l'interaction entre la vRNP et rab11, qui passe par la protéine PB2 [55]. L'interaction entre vRNP et rab11 est nécessaire à la sortie des vRNP produites dans le cytoplasme, elle doit donc se mettre en place avec les polymérases associées à au vARN 5'+3'. De manière similaire, l'hélice  $\alpha$  6 du domaine PA-ENDO fournit une surface bien exposée dans la polymérase associée aux extrémités 5'+3' ARN, et dissimulée contre le domaine NLS de PB2 dans la configuration associée au 5'cARN (figure-11).

Le domaine PB2-627 est bien séparé du reste de la polymérase et est ainsi très accessible uniquement dans la polymérase associée au 5'cARN, alors que dans la polymérase compétente pour la transcription il est contraint par des contacts avec PB1 et PA dans une position encaissée le long du tunnel de sortie des ARNm viraux (figure 11). Le domaine PB2-627 pourrait donc engager des interactions avec des facteurs cellulaires nécessaires à l'activité de réplication de la polymérase. Par exemple, l'activité de réplication de la polymérase en cellules humaines dépend de la présence d'une lysine (K) en position 627 de PB2, ce qui met en jeu le facteur cellulaire ANP32 [56]. On peut supposer que le facteur ANP32 interagit avec le domaine PB2-627K dans la conformation associée au 5'cARN. La quatrième hélice de PA est exposée spécifiquement dans la conformation associée au 5'cARN, située au-dessous du peptide C-terminal contenant le NLS de PB2, et pourrait représenter une interface de liaison pour des facteurs cellulaires importants dans l'activité de réplication de la polymérase virale (figure 11). Une telle interaction a été décrite entre PA et des sous-unités du complexe humain de maintenance de mini chromosome (MCM) [57].

Plusieurs aa sont exposés dans toutes les configurations de la polymérase déterminées jusqu'à maintenant, mais en occupant des positions variables à cause des différences dans la disposition des domaines PB2-C et PA-ENDO. On peut donc supposer que des interactions sous-tendant spécifiquement une des activités de la polymérase impliquent des patrons spécifiques d'aa exposés. Au contraire, les surfaces exposées sur le cœur de la polymérase ne varient pas ou peu selon les conformations, et engageraient donc des interactions potentiellement impliquées dans l'ensemble des activités de la polymérase.

530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572

### **Conclusion**

Plusieurs points clefs concernant la polymérase virale des virus influenza ont été révélés grâce à la caractérisation récente de plusieurs structures.

D'un point de vue général, ces structures ont permis de caractériser le cœur catalytique de la polymérase virale, dont la géométrie est partagée par d'autres ARN polymérases dépendant de l'ARN, enrichissant ainsi notre connaissance de ces cœurs catalytiques [18].

Une originalité de la polymérase des virus influenza réside dans le fait suivant : les domaines PB2-C et PA-ENDO peuvent présenter, selon le type d'extrémités des segments vARN associées à la polymérase, des organisations stables mais distinctes par rapport à un cœur dont la conformation est relativement constante.

Les conformations issues des différentes études cristallographiques correspondent probablement à des états fonctionnels distincts de la polymérase.

Le complexe polymérase présente une très grande flexibilité, dont les principaux moteurs semblent être les domaines PB2-C et PA-ENDO. Les études structurales suggèrent que des changements conformationnels sous-tendent la compétence multifonctionnelle de la polymérase des virus influenza, dont les règles restent à définir. La fixation des extrémités des ARN viraux à la polymérase semble prendre une part active dans la détermination de sa conformation. Potentiellement, elle engendrerait des modifications de la structure de la polymérase pouvant se transmettre aux domaines flexibles PB2-C et PA-ENDO.

D'après les différents patrons de motifs d'interaction exposés selon le type d'ARN associé à la polymérase, l'association de facteurs de la cellule hôte pourrait participer à un tel remodelage conformationnel. Elle contribuerait également à la stabilisation de différentes formes fonctionnelles de la polymérase. C'est probablement la contribution simultanée de la fixation des vARN et de facteurs de l'hôte qui détermine chaque conformation adoptée par le complexe polymérase, et ainsi une(ou plusieurs) de ses activités. Les études des interactions polymérase-hôte ont révélé un panel diversifié des facteurs s'associant à la polymérase, dont un petit nombre semble avoir un rôle restreint à l'une de ses activités. Les avancées réalisées dans la connaissance de la structure du complexe polymérase des virus influenza représentent une source de grande valeur pour l'identification des spécificités d'interaction associées à chacune des activités de la polymérase virale.

### ***REMERCIEMENTS***

Nous remercions Nadia Naffakh pour sa lecture critique de cette revue, pour ses commentaires et suggestions.

## 573 REFERENCES

- 574 1. Fodor E. The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral  
575 transcription and replication. *Acta virologica*2013;57(2):113-22.
- 576 2. Martin-Benito J, Ortin J. Influenza virus transcription and replication. *Advances in*  
577 *virus research*2013;87:113-37.
- 578 3. Einfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. At the centre: influenza A virus  
579 ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol*2015 Jan;13(1):28-41.
- 580 4. York A, Fodor E. Biogenesis, assembly, and export of viral messenger  
581 ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. *RNA Biol*2013 Aug;10(8):1274-  
582 82.
- 583 5. Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J. The influenza virus RNA synthesis  
584 machine: advances in its structure and function. *RNA Biol*2011 Mar-Apr;8(2):207-15.
- 585 6. Biswas SK, Nayak DP. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A  
586 virus polymerase basic protein 1. *J Virol*1994 Mar;68(3):1819-26.
- 587 7. Fournier G, Chiang C, Munier S, Tomoiu A, Demeret C, Vidalain PO *et al.*  
588 Recruitment of RED-SMU1 complex by Influenza A Virus RNA polymerase to control  
589 Viral mRNA splicing. *PLoS Pathog*2014 Jun;10(6):e1004164.
- 590 8. Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F *et al.* The cap-  
591 snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit.  
592 *Nature*2009 Apr 16;458(7240):914-8.
- 593 9. He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z *et al.* Crystal structure of the  
594 polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature*2008  
595 Aug 28;454(7208):1123-6.
- 596 10. Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P *et al.* The  
597 structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct*  
598 *Mol Biol*2008 May;15(5):500-6.
- 599 11. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S *et al.* Structure  
600 and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2  
601 subunit. *Nat Struct Mol Biol*2007 Mar;14(3):229-33.
- 602 12. Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S, Hart DJ. Host  
603 determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of  
604 influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog*2008;4(8):e1000136.
- 605 13. Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame JR, Nagata K *et al.*  
606 Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA  
607 polymerase. *EMBO J*2009 Jun 17;28(12):1803-11.
- 608 14. Hengrung N, El Omari K, Serna Martin I, Vreede FT, Cusack S, Rambo RP *et al.*  
609 Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from influenza C virus.  
610 *Nature*2015 Nov 5;527(7576):114-7.
- 611 15. Reich S, Guilligay D, Pflug A, Malet H, Berger I, Crepin T *et al.* Structural insight  
612 into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature*2014 Dec  
613 18;516(7531):361-6.
- 614 16. Pflug A, Guilligay D, Reich S, Cusack S. Structure of influenza A polymerase bound  
615 to the viral RNA promoter. *Nature*2014 Dec 18;516(7531):355-60.
- 616 17. Thierry E, Guilligay D, Kosinski J, Bock T, Gaudon S, Round A *et al.* Influenza  
617 Polymerase Can Adopt an Alternative Configuration Involving a Radical Repacking of  
618 PB2 Domains. *Mol Cell*2016 Jan 7;61(1):125-37.
- 619 18. Reguera J, Gerlach P, Cusack S. Towards a structural understanding of RNA  
620 synthesis by negative strand RNA viral polymerases. *Curr Opin Struct Biol*2016 Jan  
621 27;36:75-84.

- 622 19. O'Reilly EK, Kao CC. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and  
623 function as guided by known polymerase structures and computer predictions of  
624 secondary structure. *Virology*1998 Dec 20;252(2):287-303.
- 625 20. Te Velthuis AJ, Robb NC, Kapanidis AN, Fodor E. The role of the priming loop in  
626 Influenza A virus RNA synthesis. *Nature microbiology*2016 May;1(5).
- 627 21. Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K *et al.* The  
628 structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase.  
629 *Nature*2008 Aug 28;454(7208):1127-31.
- 630 22. Pritlove DC, Poon LL, Devenish LJ, Leahy MB, Brownlee GG. A hairpin loop at the  
631 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)<sup>+</sup> mRNA in  
632 vitro. *J Virol*1999 Mar;73(3):2109-14.
- 633 23. Gong P, Peersen OB. Structural basis for active site closure by the poliovirus RNA-  
634 dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*2010 Dec 28;107(52):22505-10.
- 635 24. Poon LL, Pritlove DC, Fodor E, Brownlee GG. Direct evidence that the poly(A) tail  
636 of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion  
637 RNA template. *J Virol*1999 Apr;73(4):3473-6.
- 638 25. Tomescu AI, Robb NC, Hengrung N, Fodor E, Kapanidis AN. Single-molecule FRET  
639 reveals a corkscrew RNA structure for the polymerase-bound influenza virus promoter.  
640 *Proc Natl Acad Sci U S A*2014 Aug 12;111(32):E3335-42.
- 641 26. Chang S, Sun D, Liang H, Wang J, Li J, Guo L *et al.* Cryo-EM structure of influenza  
642 virus RNA polymerase complex at 4.3 Å resolution. *Mol Cell*2015 Mar 5;57(5):925-35.
- 643 27. Jorba N, Coloma R, Ortin J. Genetic trans-complementation establishes a new  
644 model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog*2009  
645 May;5(5):e1000462.
- 646 28. Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortín J, Arrese M *et al.* Mutational Analysis  
647 of Influenza A Virus Nucleoprotein: Identification of Mutations That Affect RNA  
648 Replication. *J Virol*1999 Feb;73(2):1186-94.
- 649 29. Coloma R, Valpuesta JM, Arranz R, Carrascosa JL, Ortin J, Martin-Benito J. The  
650 structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS*  
651 *Pathog*2009 Jun;5(6):e1000491.
- 652 30. Martin-Benito J, Area E, Ortega J, Llorca O, Valpuesta JM, Carrascosa JL *et al.*  
653 Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein  
654 particle. *EMBO Rep*2001 Apr;2(4):313-7.
- 655 31. Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP. Influenza virus nucleoprotein interacts with  
656 influenza virus polymerase proteins. *J Virol*1998 Jul;72(7):5493-501.
- 657 32. Ng AK, Chan WH, Choi ST, Lam MK, Lau KF, Chan PK *et al.* Influenza polymerase  
658 activity correlates with the strength of interaction between nucleoprotein and PB2  
659 through the host-specific residue K/E627. *PLoS One*2012;7(5):e36415.
- 660 33. Poole E, Elton D, Medcalf L, Digard P. Functional domains of the influenza A virus  
661 PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*2004 Mar  
662 30;321(1):120-33.
- 663 34. Cauldwell AV, Moncorge O, Barclay WS. Unstable polymerase-nucleoprotein  
664 interaction is not responsible for avian influenza virus polymerase restriction in human  
665 cells. *J Virol*2013 Jan;87(2):1278-84.
- 666 35. Tamuri AU, Dos Reis M, Hay AJ, Goldstein RA. Identifying changes in selective  
667 constraints: host shifts in influenza. *PLoS computational biology*2009  
668 Nov;5(11):e1000564.

- 669 36. Taft AS, Ozawa M, Fitch A, Depasse JV, Halfmann PJ, Hill-Batorski L *et al.*  
670 Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian  
671 H5N1 influenza virus. *Nat Commun*2015;6:7491.
- 672 37. Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D *et al.* Genome-wide  
673 RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication.  
674 *Nature*2010 Feb 11;463(7282):818-22.
- 675 38. Shapira SD, Gat-Viks I, Shum BO, Dricot A, de Grace MM, Wu L *et al.* A physical and  
676 regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection.  
677 *Cell*2009 Dec 24;139(7):1255-67.
- 678 39. Konig R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S *et al.* Human  
679 host factors required for influenza virus replication. *Nature*2010 Feb 11;463(7282):813-  
680 7.
- 681 40. Watanabe T, Watanabe S, Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza  
682 virus life cycle. *Cell Host Microbe*2010 Jun 25;7(6):427-39.
- 683 41. York A, Hutchinson EC, Fodor E. Interactome analysis of the influenza A virus  
684 transcription/replication machinery identifies protein phosphatase 6 as a cellular factor  
685 required for efficient virus replication. *J Virol*2014 Nov;88(22):13284-99.
- 686 42. Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y *et al.*  
687 Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development.  
688 *Cell Host Microbe*2014 Dec 10;16(6):795-805.
- 689 43. Munier S, Rolland T, Diot C, Jacob Y, Naffakh N. Exploration of binary virus-host  
690 interactions using an infectious protein complementation assay. *Mol Cell*  
691 *Proteomics*2013 Oct;12(10):2845-55.
- 692 44. Bradel-Tretheway BG, Mattiaccio JL, Krasnoselsky A, Stevenson C, Purdy D,  
693 Dewhurst S *et al.* Comprehensive proteomic analysis of influenza virus polymerase  
694 complex reveals a novel association with mitochondrial proteins and RNA polymerase  
695 accessory factors. *J Virol*2011 Sep;85(17):8569-81.
- 696 45. Fodor E, Smith M. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of  
697 the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol*2004  
698 Sep;78(17):9144-53.
- 699 46. Swale C, Monod A, Tengo L, Labaronne A, Garzoni F, Bourhis JM *et al.* Structural  
700 characterization of recombinant IAV polymerase reveals a stable complex between viral  
701 PA-PB1 heterodimer and host RanBP5. *Scientific reports*2016;6:24727.
- 702 47. Resa-Infante P, Jorba N, Zamarreno N, Fernandez Y, Juarez S, Ortin J. The host-  
703 dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is  
704 required for virus RNA replication. *PLoS One*2008;3(12):e3904.
- 705 48. Hudjetz B, Gabriel G. Human-like PB2 627K influenza virus polymerase activity is  
706 regulated by importin-alpha1 and -alpha7. *PLoS Pathog*2012 Jan;8(1):e1002488.
- 707 49. Gabriel G, Klingel K, Otte A, Thiele S, Hudjetz B, Arman-Kalcek G *et al.* Differential  
708 use of importin-alpha isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza  
709 virus. *Nat Commun*2011 Jan 18;2:156.
- 710 50. Martinez-Alonso M, Hengrung N, Fodor E. RNA-Free and Ribonucleoprotein-  
711 Associated Influenza Virus Polymerases Directly Bind the Serine-5-Phosphorylated  
712 Carboxyl-Terminal Domain of Host RNA Polymerase II. *J Virol*2016 Jul 1;90(13):6014-  
713 21.
- 714 51. Rodriguez A, Perez-Gonzalez A, Nieto A. Cellular human CLE/C14orf166 protein  
715 interacts with influenza virus polymerase and is required for viral replication. *J*  
716 *Virol*2011 Nov;85(22):12062-6.

- 717 52. Rodriguez-Frandsen A, de Lucas S, Perez-Gonzalez A, Perez-Cidoncha M, Roldan-  
718 Gomendio A, Pazo A *et al.* hCLE/C14orf166, a cellular protein required for viral  
719 replication, is incorporated into influenza virus particles. *Scientific*  
720 *reports*2016;6:20744.
- 721 53. Llompart CM, Nieto A, Rodriguez-Frandsen A. Specific residues of PB2 and PA  
722 influenza virus polymerase subunits confer the ability for RNA polymerase II  
723 degradation and virus pathogenicity in mice. *J Virol*2014 Mar;88(6):3455-63.
- 724 54. Vreede FT, Chan AY, Sharps J, Fodor E. Mechanisms and functional implications of  
725 the degradation of host RNA polymerase II in influenza virus infected cells.  
726 *Virology*2010 Jan 5;396(1):125-34.
- 727 55. Amorim MJ, Bruce EA, Read EK, Foeglein A, Mahen R, Stuart AD *et al.* A Rab11-  
728 and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus  
729 viral RNA. *J Virol*2011 May;85(9):4143-56.
- 730 56. Long JS, Giotis ES, Moncorge O, Frise R, Mistry B, James J *et al.* Species difference  
731 in ANP32A underlies influenza A virus polymerase host restriction. *Nature*2016 Jan  
732 7;529(7584):101-4.
- 733 57. Kawaguchi A, Nagata K. De novo replication of the influenza virus RNA genome is  
734 regulated by DNA replicative helicase, MCM. *EMBO J*2007 Oct 31;26(21):4566-75.  
735

736 **LEGENDE DES FIGURES**

737 **Figure 1.** a. Aperçu des différentes structures du complexe polymérase des virus  
738 influenza. La forme globale des complexes polymérase dans les quatre structures  
739 résolues est représentée, avec une position constante du cœur central. La sous-unité  
740 PB1 est colorée en beige, PB2 en bleu, PA en vert. Les références pdb sont : la  
741 polymérase d'un virus influenza A de chauve-souris associée à des extrémités 5'+3' d'un  
742 vARN : pdb 4WSB (Pflug et al., 2014), la polymérase d'un virus influenza B humain  
743 associée aux extrémités 5'+3' d'un vARN : pdb 4WSA (Reich et al., 2014) ou associée à  
744 l'extrémité 5' d'un cRNA : pdb 5EPI (Thierry et al., 2016), la polymérase d'un virus  
745 influenza C sans ARN (apo-fluC) : pdb 5d9 (Hengrung et al., 2015). b. Schéma de  
746 l'organisation des domaines des sous-unités PA/P3, PB1 et PB2. La numération est  
747 donnée pour les polymérase des virus influenza A (fluA) de chauve-souris, influenza B  
748 (fluB) humains et influenza C (fluC) humains comme indiqué. Les domaines hachurés  
749 sont ceux qui font partie du cœur central de la polymérase.

750 **Figure 2.** Le cœur catalytique de la polymérase des virus influenza. **a.** Diagramme en  
751 ruban de la sous-unité PB1, indiquant les modules typiques d'une ARN polymérase  
752 dépendante de l'ARN. Les motifs fonctionnels conservés et positionnés dans le pouce  
753 sont colorés en violet, la boucle d'amorçage en rouge, et le signal de localisation  
754 nucléaire bipartite de PB1 en rouille. **b** Schéma représentant le domaine polymérase de  
755 la protéine PB1 de fluA, flanqué par les domaines PA-C d'un côté et PB2-N de l'autre.  
756 PB1, PB2-N and PA-C sont colorés respectivement en beige, bleu et vert. Le NLS de PB1  
757 est représenté par des sphères rouille. Le domaine polymérase est donné pour la  
758 polymérase fluA (pdb 4WRT) qui est la seule dont la structure de la boucle d'amorçage a  
759 été résolue.

760  
761 **Figure 3.** La fixation du promoteur viral à la polymérase. Toutes les images ont été  
762 générées à partir de la structure pdb 4WRT (Reich et al., 2014) de la polymérase fluB,  
763 qui est la seule où la totalité des extrémités 5' et 3' utilisées comme substitut du  
764 promoteur viral sont résolues. **a.** Représentation des brins vARN 5' et 3' du promoteur,  
765 mettant en évidence l'appariement des bases de la région distale et la configuration des  
766 extrémités simple brin. **b.** Représentation de la surface de fixation du promoteur sur la  
767 polymérase virale, montrant l'interface ARN/protéine intervenant dans la liaison de  
768 l'extrémité 3'. **c.** Représentation du positionnement de l'extrémité 3' du vARN à l'entrée  
769 du canal putatif d'entrée du brin matrice. Ce dernier a été déduit par modélisation  
770 d'après la superposition avec la structure de la polymérase du virus Norwalk en  
771 complexe avec des brins matrice et amorce du vARN (Reich et al., 2014). **d**  
772 Représentation de la surface de la fixation du promoteur soulignant la liaison de la  
773 structure en épingle à l'extrémité 5' dans une poche formée par PB1 et PA.

774  
775 **Figure 4.** Représentation schématique du repliement de la sous-unité PB2 dans les  
776 configurations de la polymérase virale associée au promoteur (montrée pour la  
777 polymérase fluB, pdb 4WSA) et associée au 5'cARN (fluB, pdb 5EPI). La représentation  
778 séquentielle de la structure de PB2 débute par l'axe rigide constitué par les sous-  
779 domaines charnière cap-627 (violet clair) et milieu (rose), puis CAP (bleu clair), 627  
780 (cyan) et NLS (violet foncé), enfin la protéine PB2 entière (PB2-N en bleu ciel). Les  
781 extrémités N- et C-terminales de chaque polypeptide sont indiquées.

782  
783 **Figure 5.** Les polymérases compétentes pour la transcription. a. Les structures des  
784 polymérases flu A de chauve-souris (pdb 4WSB) et flu B humaine (pdb 4WSA), associées

785 aux vARN 5'+3', sont données avec PB2-C et PA-ENDO en représentation schématique et  
786 le reste de la polymérase en représentation de surface. Une coiffe associée au domaine  
787 de fixation à la coiffe de PB2 est montrée en rouge, et le site catalytique du domaine  
788 endonucléase de PA en violet clair. Le code de couleur pour les sous-unités PB1, PB2 et  
789 PA sont comme dans la figure 1-b. b. Vue en surface de la polymérase fluB (pdb 4WSA)  
790 mettant en évidence l'orientation d'une coiffe liée au site de fixation à la coiffe de PB2  
791 faisant face au centre catalytique de la polymérase. La vue passe à travers le domaine de  
792 fixation à la coiffe de PB2 comme indiqué dans le panel a. c. Représentation de la surface  
793 de la polymérase compétente pour la transcription (pdb 4WSA), soulignant le point de  
794 sortie du brin matrice indiqué par la position du couvercle hélical de PB2 qui l'obstrue  
795 (coloré en marron), et le canal de sortie putatif de l'ARNm viral.

796  
797 **Figure 6.** Les différentes dispositions de la sous-unité PB2 dans les configurations de la  
798 polymérase virale. **a.** Représentation des structures de la polymérase fluB quand elle est  
799 associée au promoteur viral 5'+3'vARN (pdb 4WSA), ou au 5'cARN (pdb 5EPI), et de la  
800 polymérase fluC sans ARN (apo-fluC ,pdb 5d9) . Le cœur de la polymérase est représenté  
801 en surface et en gris. PB2-C est représenté schématiquement en bleu clair pour PB2-  
802 CAP, en violet clair pour la charnière cap-627 et en rose pour le milieu. Les domaines  
803 PB2-627 (cyan) et NLS (bleu foncé) sont représentés en surface. PA-ENDO est en  
804 représentation schématique et coloré en vert. Les structures sont représentées dans une  
805 orientation similaire du cœur de la polymérase, pour souligner le réarrangement des  
806 sous-domaines de PB2-C dans le complexe polymérase. **b.** Représentation de la surface  
807 du domaine PB2-CAP associé à une coiffe représentée par une sphère rouge dans la  
808 configuration de la polymérase associée à un 5'cARN, soulignant l'obstruction du site de  
809 fixation à la coiffe par son apposition au sous-domaine charnière cap-627 de PB2.

810  
811 **Figure 7.** La formation de dimères **a.** Un dimère observé avec le sous complexe 1  
812 polymérase fluA de H5N1 (pdb3j9). Haut : représentation schématique du dimère, PB1  
813 est colorée en beige, PA en vert et les hélices de PB2 (attribuées aux aa 86 à 130 de la  
814 protéine) en cyan pour le monomère 1 ou bleu pour le monomère 2. Les hélices  $\alpha$  de PA  
815 impliquées dans l'interface du dimère sont colorées en rose clair (monomère 1) et rose  
816 foncé (monomère2), les hélices  $\alpha$  de PB2 intervenant dans l'interface de dimérisation  
817 sont colorée en cyan foncé (monomère 1) et bleu foncé (monomère 2). Les aa de PB1  
818 proposés intervenir dans la formation de tétramère sont colorés en jaune. Bas :  
819 l'interface de dimérisation est montrée en représentation de surface, pour souligner les  
820 contacts entre chaque monomère. **b.** Les éléments structuraux proposés pour l'interface  
821 de dimérisation sont montrés en représentation de surface dans la polymérase fluA  
822 H5N1 (pdb3j9), dans la polymérase flu B associée à un 5'cARN (pdb 5 EPI) et dans l'apo-  
823 polymérase fluC (pdb5d9), et colorés comme dans a. Ils sont montrés avec le reste de la  
824 polymérase en représentation schématique (gauche) et en représentation de surface  
825 (droite) pour mettre en évidence la contiguïté et l'accessibilité des hélices  $\alpha$   
826 intervenantes.

827  
828 **Figure 8.** L'interaction avec NP **a.** L'interface d'interaction avec NP. Le ruban  $\beta$  de PB1  
829 interagissant avec NP est coloré en beige, le 5'-vARN ou 5'-cARN en jaune, le 3'-vARN en  
830 orange. Les hélices  $\alpha$  N-terminales de PB2 impliquées dans la fixation de NP sont  
831 colorées en bleu, les hélices  $\alpha$  C-terminales de PB1 impliquées dans l'interaction  
832 PB1/PB2, qui avait été observée à partir de domaines isolés, sont colorées en beige. La  
833 position du NLS de PB1 dans le ruban  $\beta$  est colorée en rouge dans les polymérases fluB

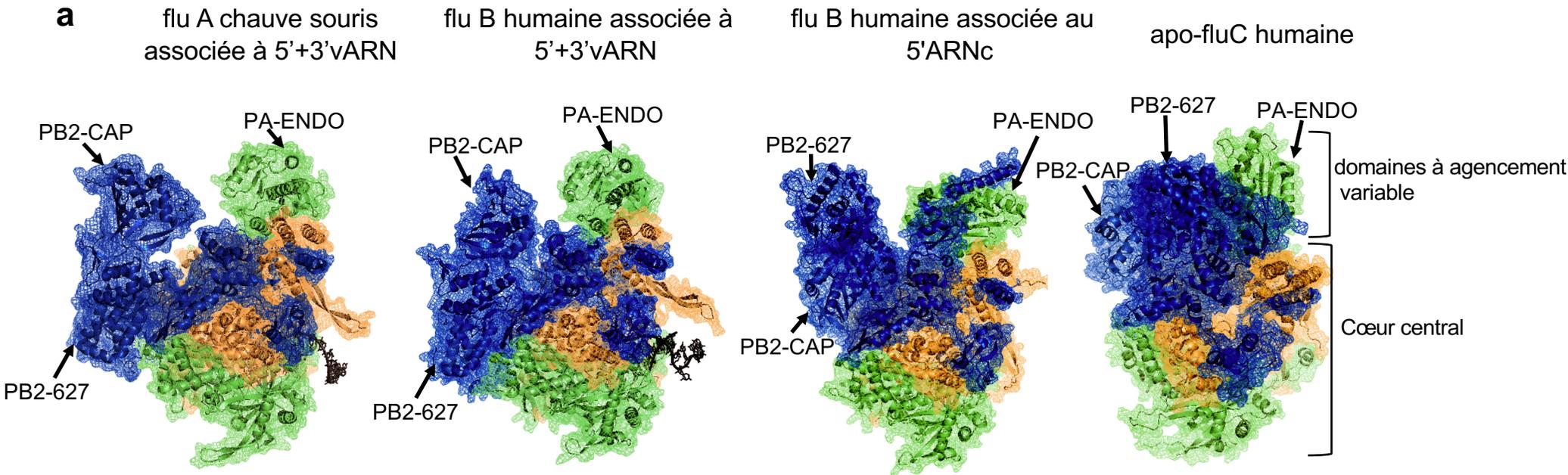
834 associées au 5'+3'vARN et au 5'-ARN, mais pas dans l'apo-fluC où il n'est pas conservé.  
835 Le ruban  $\beta$  de PB1 et les brins d'ARN sont donnés en représentation schématique, le  
836 reste de la polymérase en représentation de surface colorée en blanc. Les images sont  
837 construites à partir des structures pdb 4WSA pour la polymérase fluB associée au  
838 promoteur, pdb 5EPI pour la polymérase fluB associée au 5'cARN, pdb 5j9 pour l'apo-  
839 fluc C polymérase. b. La localisation des interfaces d'interaction avec NP est montrée  
840 dans la polymérase fluB associée au promoteur (gauche, pdb 4WSA), ou associée au  
841 5'cARN (droite, pdb 5EPI) et dans l'apo-fluc C polymérase (pdb5d9). Elle est indiquée  
842 par rapport aux tunnels de sortie putatifs des brins produits d'ARN (flèche bleue foncée  
843 pour la sortie des ARNm, rouge pour la sortie des brins répliqués), et de la position  
844 supposée de la sortie du brin matrice ARN indiquée par la position du couvercle hélical  
845 de PB2 qui l'obstrue (coloré en marron). Notez que la position du tunnel de sortie putatif  
846 du brin matrice est indiquée sur la face de la polymérase où le brin matrice est supposé  
847 émerger. Le domaine PB2-627K en représentation schématique est coloré en cyan, les aa  
848 intervenant dans l'interaction avec NP sont colorés en rouge. Le groupe d'hélices  $\alpha$   
849 formé par PB1C/PB2N et le ruban  $\beta$  de PB1 sont en représentation schématique.

850  
851 **Figure 9.** Les acides aminés d'adaptation dans la polymérase a. Les aa d'adaptation de la  
852 polymérase des virus influenza. Les aa sont montrés sur la surface des formes  
853 compétente pour la transcription (pdb 5WSA, left) et associée au 5'cARN (pdb 5EPI,  
854 right) de la polymérase fluB. Les aa d'adaptation sont colorés en rouges pour PB2, en  
855 violet pour PA, en marron pour PB1. b. Les aa d'adaptation de la sous-unité PB2 colorés  
856 en rouge sont montrés dans la polymérase fluB associée au 5'cARN, dans une  
857 représentation de la surface en transparence pour mettre en évidence les aa positionnés  
858 le long de l'interface entre PB2 et PB1 ou PA (indiqués par des flèches). c. Les acides  
859 aminés d'adaptation dans les domaines 627/NLS de PB2 colorés individuellement, leur  
860 accessibilité indiquée dans les formes compétentes pour la transcription (gauche) et  
861 associée au 5'-cARN (droite) de la polymérase fluB.

862  
863 **Figure 10.** Les interactions de la polymérase avec des facteurs de l'hôte. a. L'interaction  
864 avec les importines  $\alpha$ . Haut (gauche) représentation schématique du domaine NLS de la  
865 polymérase fluB associée au 5'cARN (pdb 5EPI) coloré en bleu foncé, avec le reste de la  
866 polymérase montré en représentation de surface. Les aa intervenant dans l'interaction  
867 avec les importines  $\alpha$  sont colorés en rouge. (droite) représentation de la surface du NLS  
868 de PB2 dans la même configuration de la polymérase. Bas : le domaine NLS de PB2 n'est  
869 que partiellement résolu dans la polymérase fluB associée au promoteur (pdb 4WSA), et  
870 est montré en représentation schématique coloré en bleu foncé. Le peptide contenant le  
871 NLS à l'extrémité C-terminale de la protéine PB2 est représenté par une ligne pointillée  
872 car il n'a pas de densité électronique dans cette structure, ce qui reflète un état non  
873 structuré et flexible. b. Interaction avec hCLE. L'interface d'interaction de PA avec le  
874 facteur humain hCLE est montré en représentation de surface, et coloré en rouge dans la  
875 polymérase fluB associée au promoteur ARN v5'+v3' (pdb 4WSA). Les aa 504 de PB2 et  
876 550 de PA impliqués dans la dégradation de l'ARN polII sont représentés par des  
877 sphères violettes.

878  
879 **Figure 11** Les interfaces potentielles d'interaction. Représentation de la surface de la  
880 polymérase fluB associée au 5'+3'vARN (pdb4WSA, gauche) ou au 5'cARN (pdb 5EPI  
881 droite). Les surfaces exposées spécifiquement dans la polymérase associée au  
882 5'+3'vARN sont colorées en marron (PB2) et violet (PA), les surfaces plus exposées dans

883 la forme associée au 5'cARN sont colorées en saumon (PB2) et rose (PA). L'aa 627K de  
884 PB2 est coloré en jaune.  
885  
886



**b**

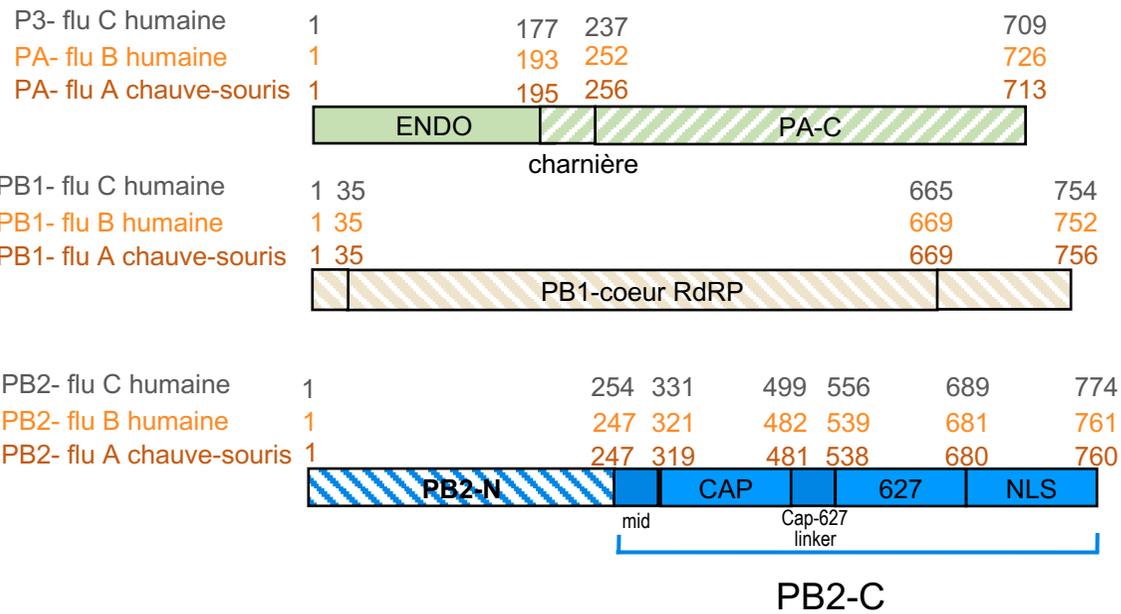
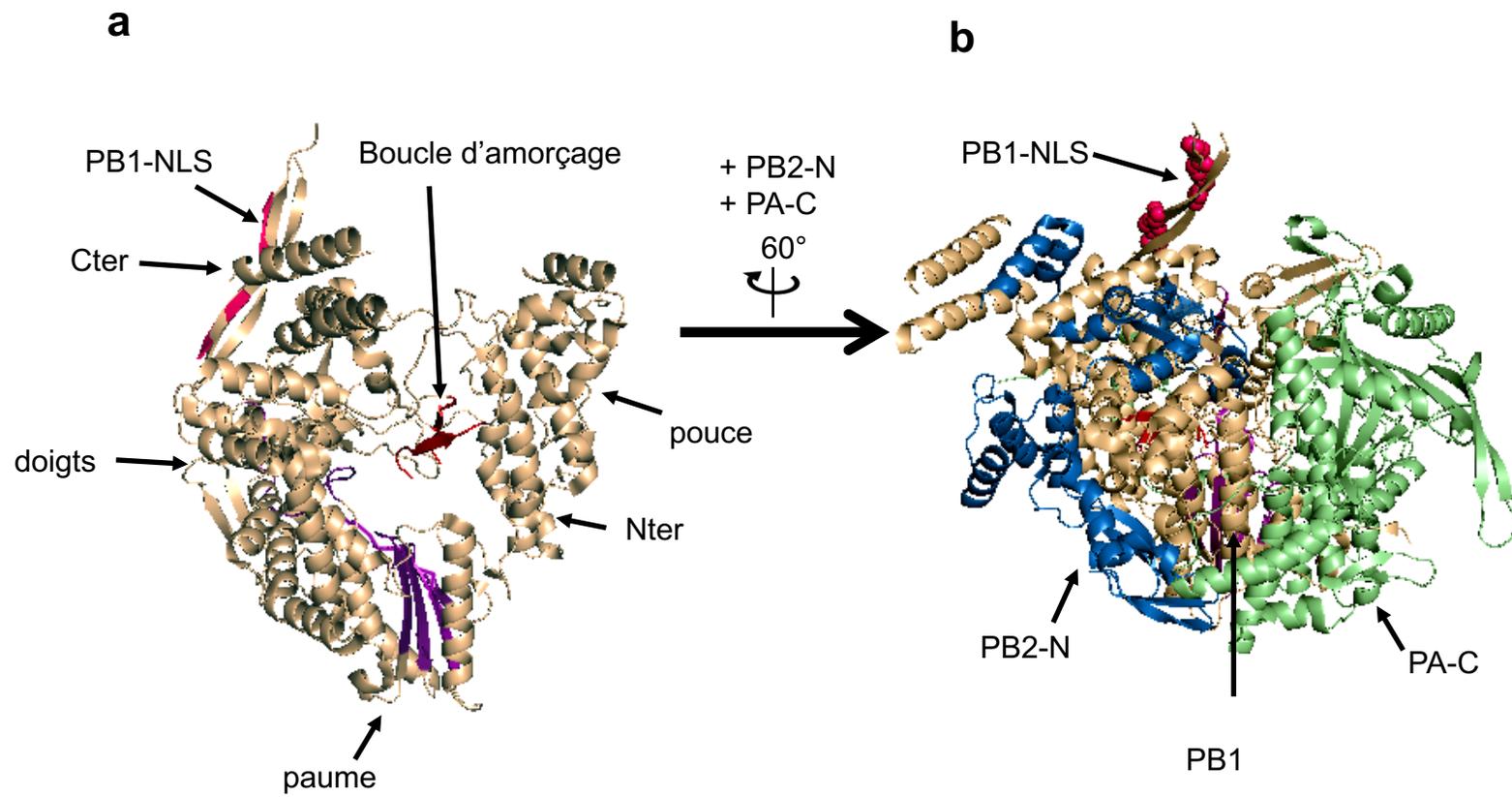


Figure 1



*Figure 2*

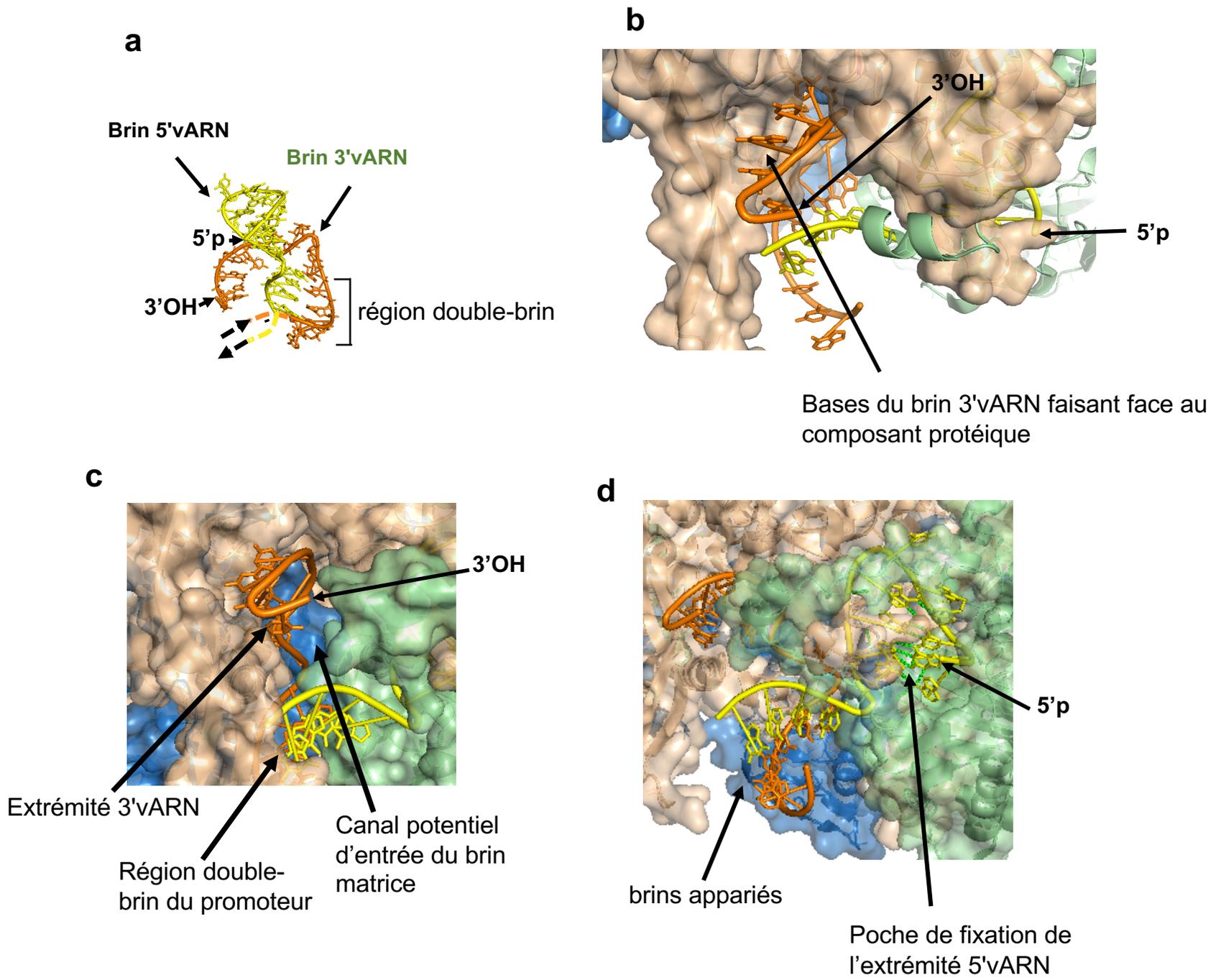


Figure 3

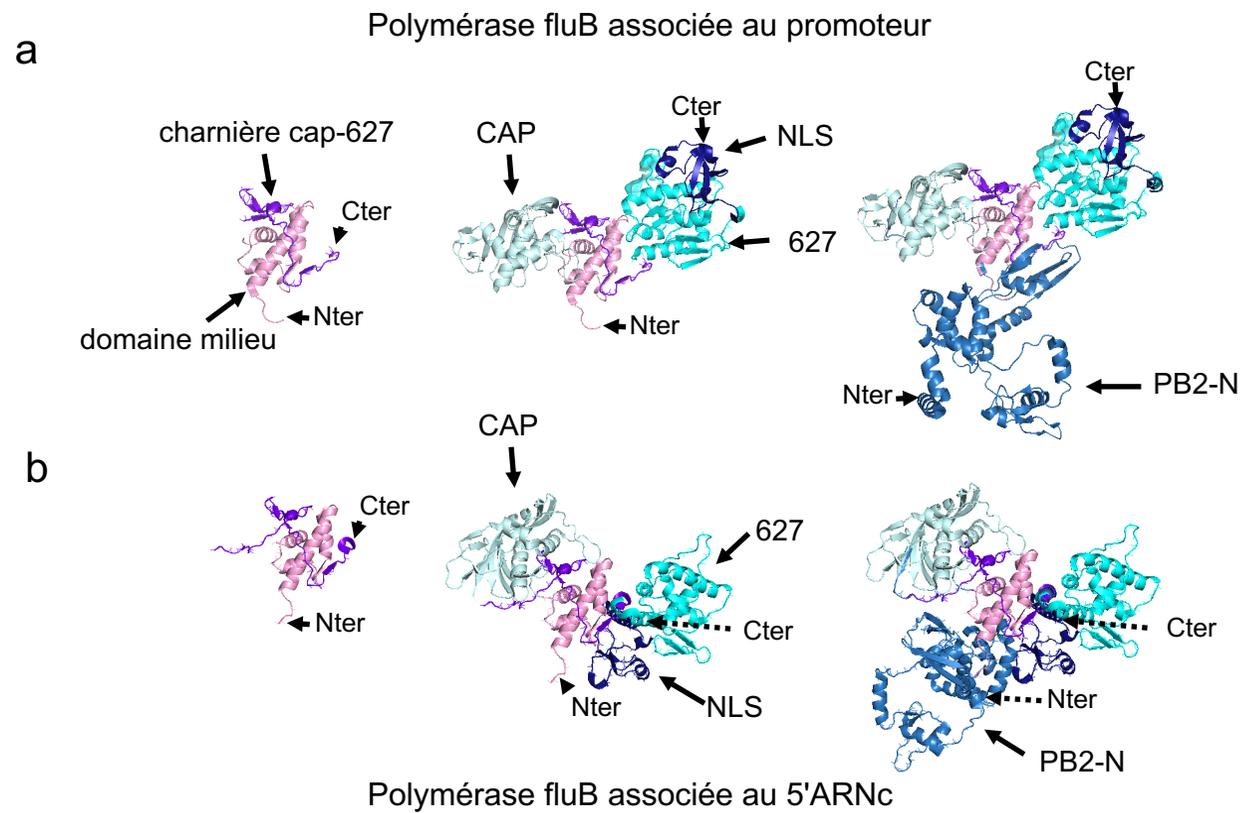


Figure 4

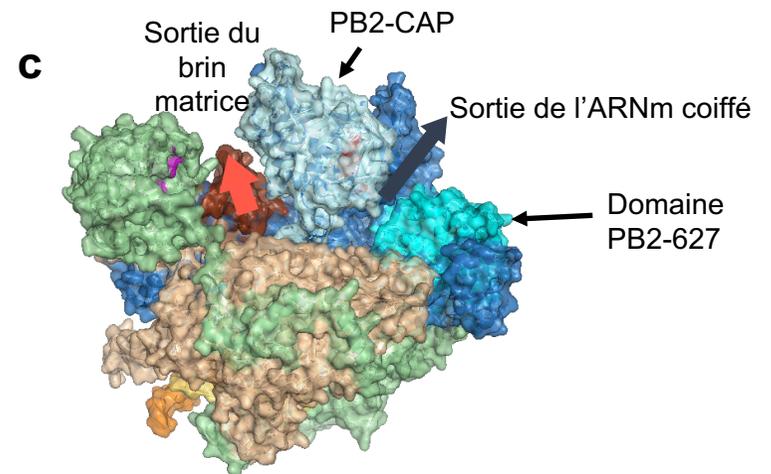
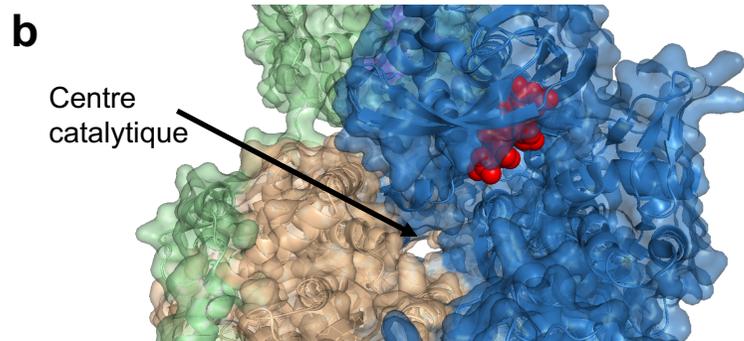
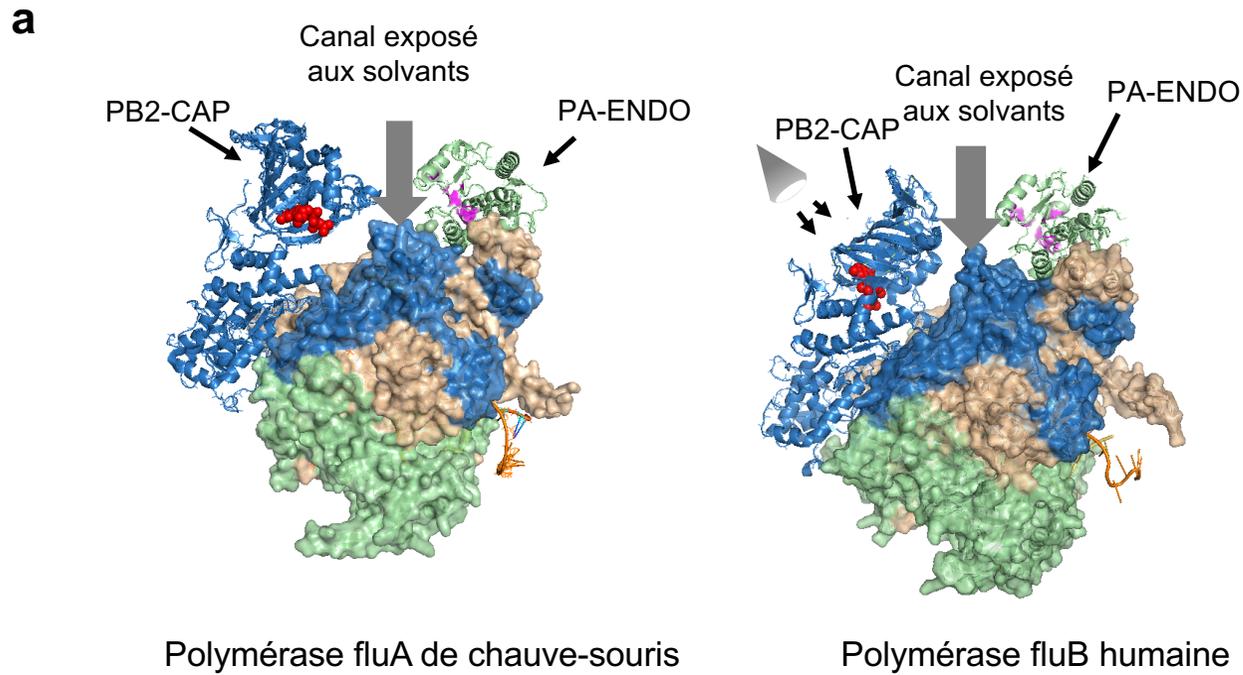


Figure 5

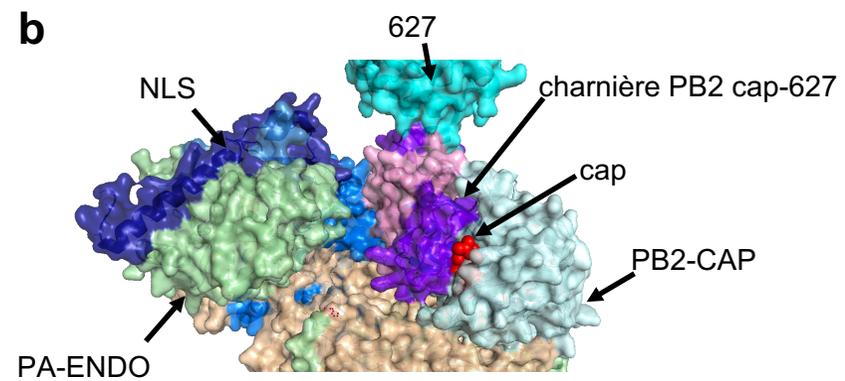
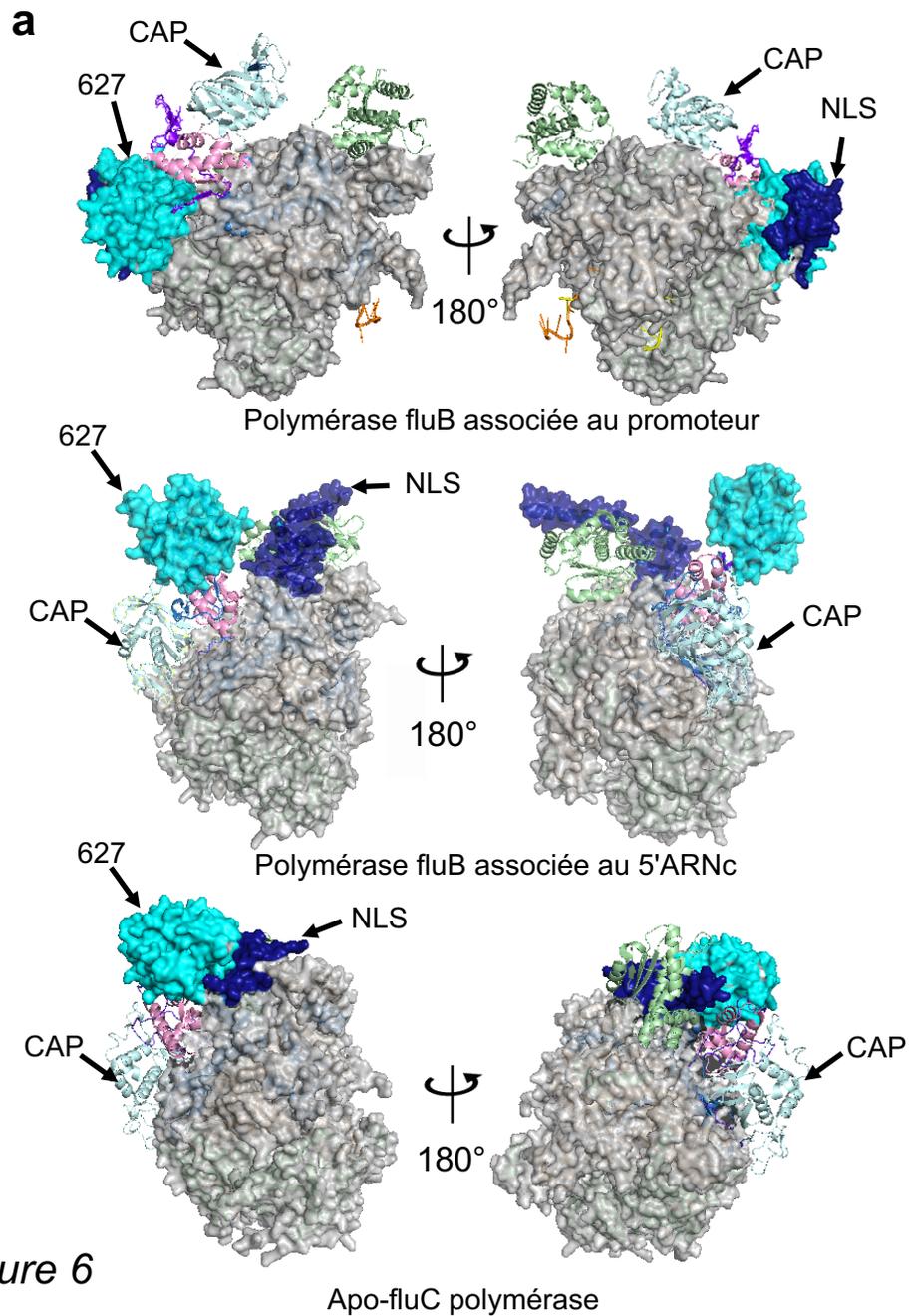


Figure 6

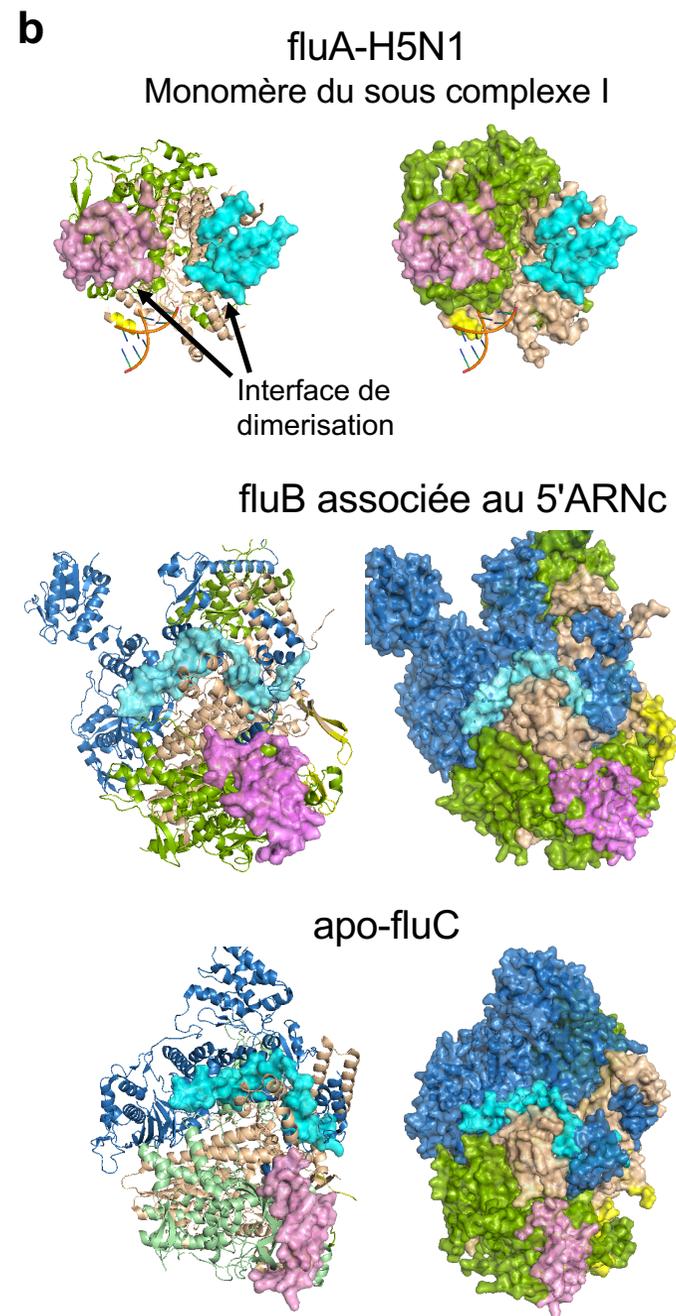
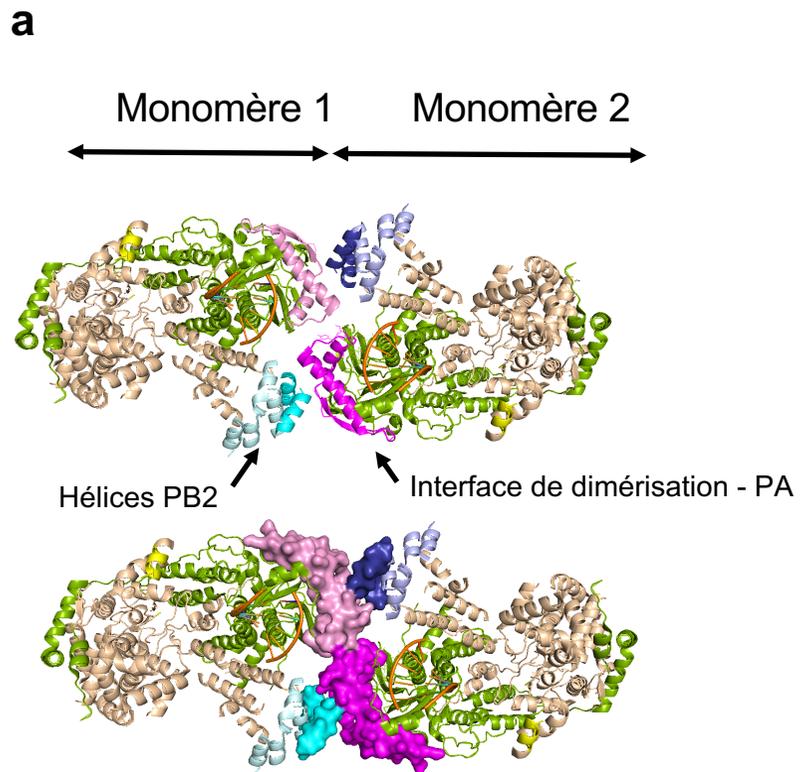


Figure 7

**a**

Polymérase associée au 5'+3'vARN

Polymérase associée au 5'ARNc

Apo-polymérase

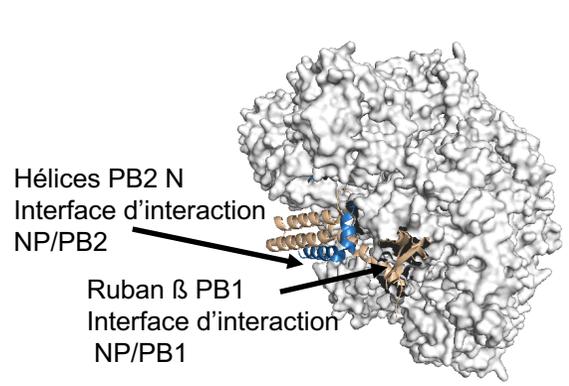
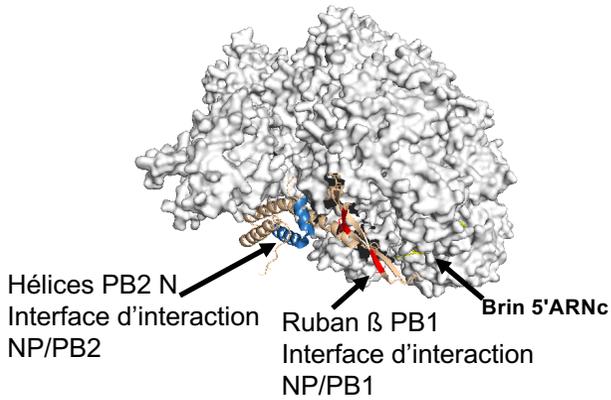
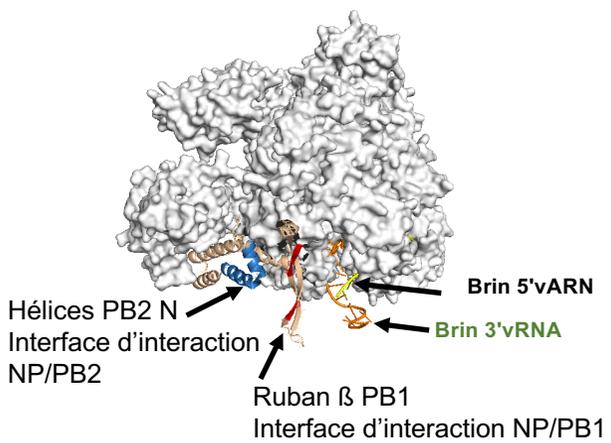
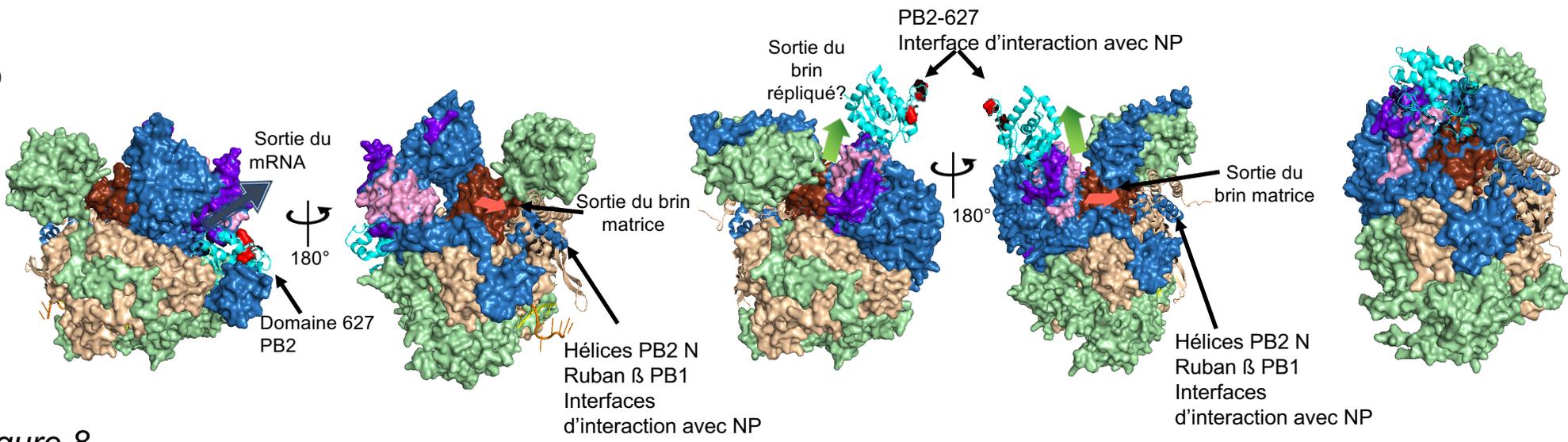
**b**

Figure 8

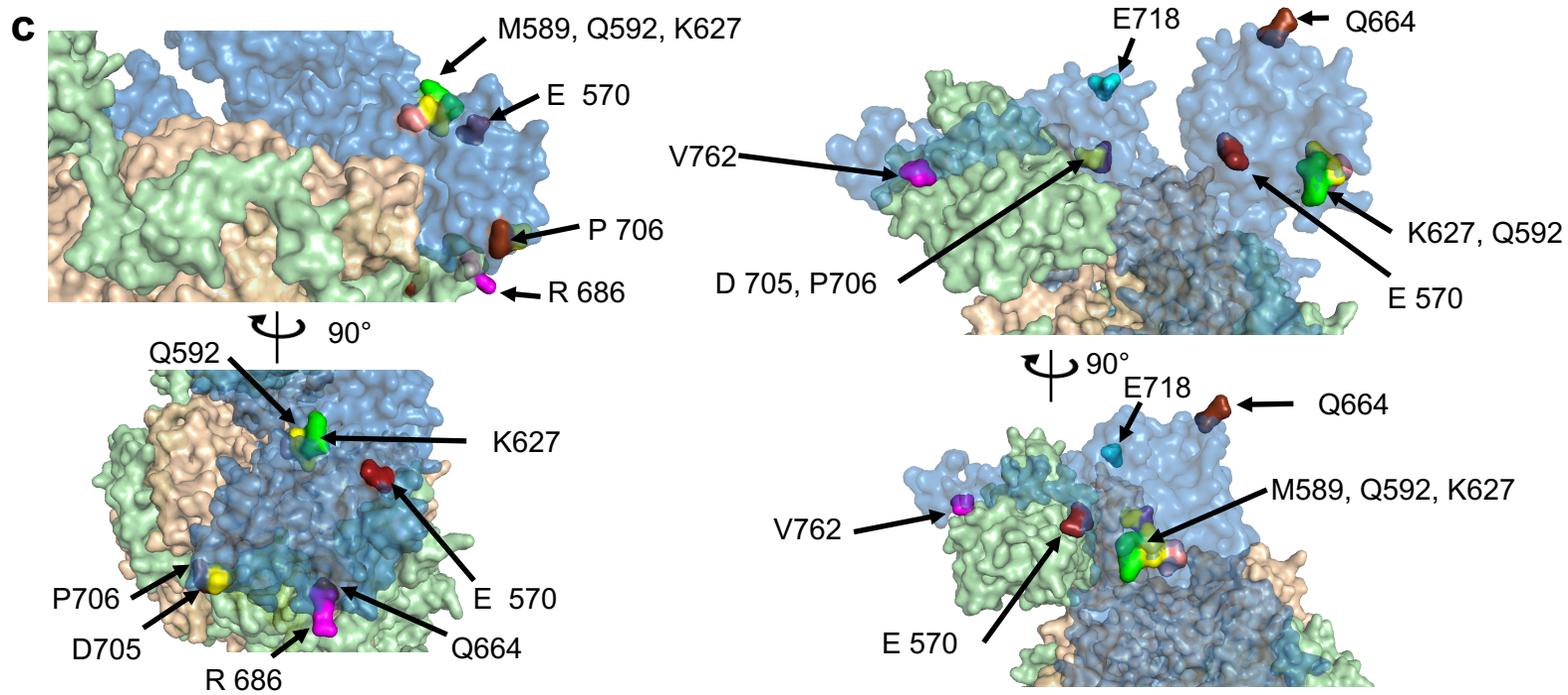
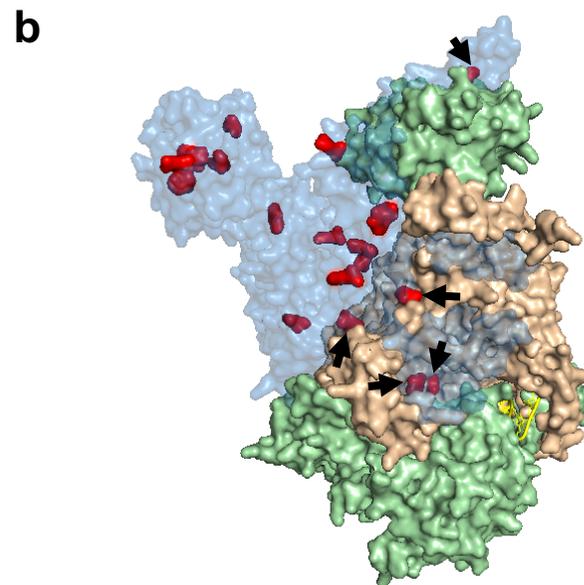
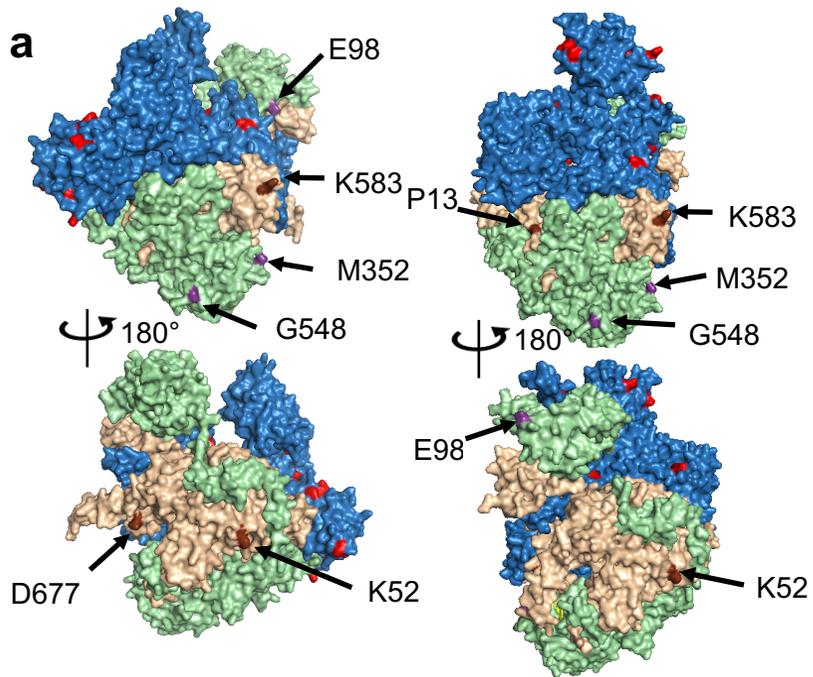
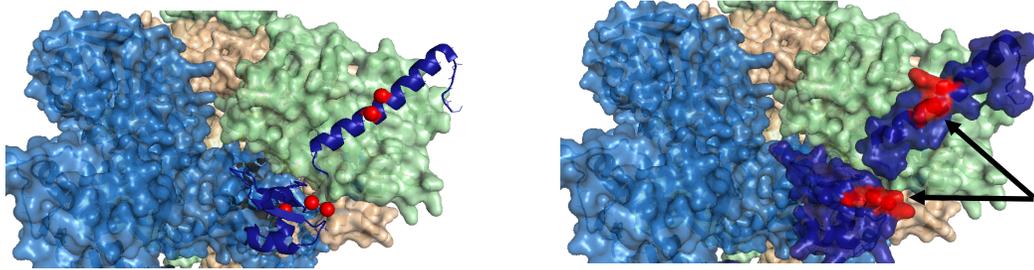


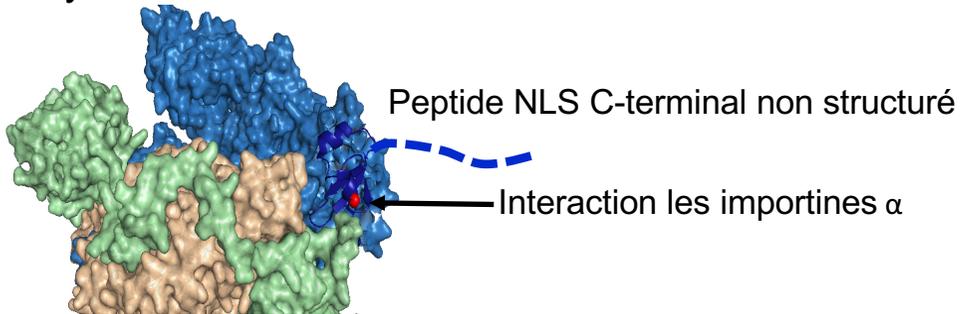
Figure 9

**a** Polymérase associée au 5'ARNc



Interaction les importines  $\alpha$

Polymérase associée au 5'+3'vARN



**b**

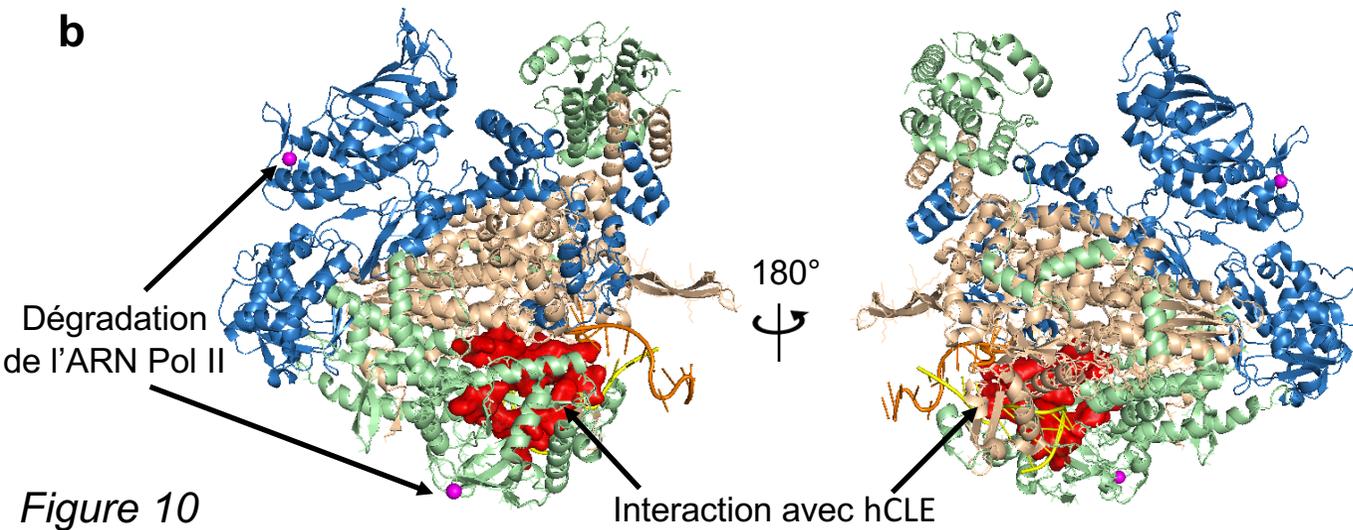
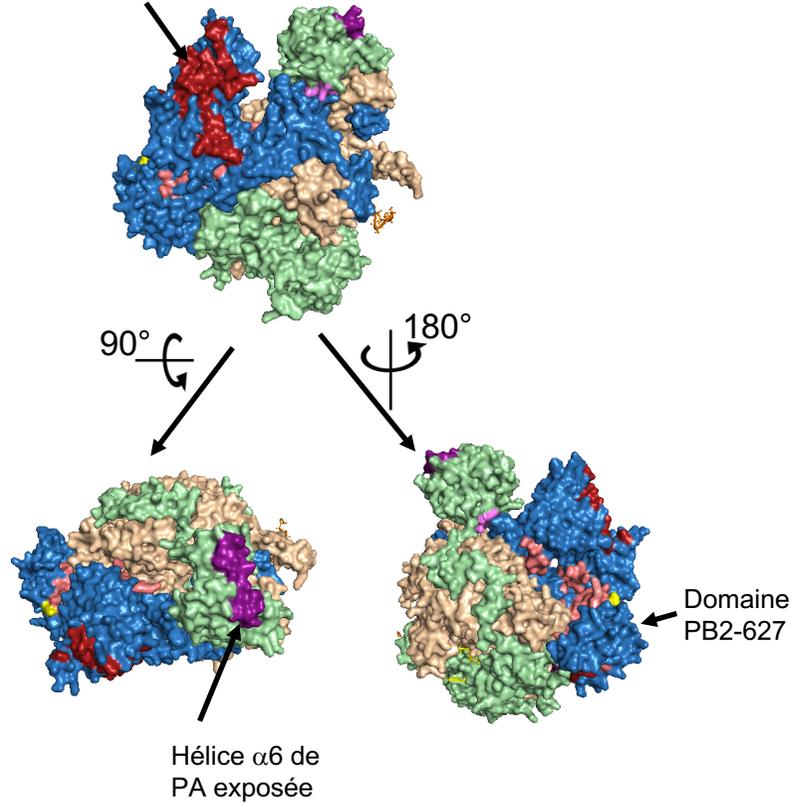


Figure 10

# Polymérase associée au 5'+3'vARN

# Polymérase associée au 5'ARNc

surface exposée des domaines PB2-CAP+milieu



Hélice  $\alpha 4$  de PA exposée

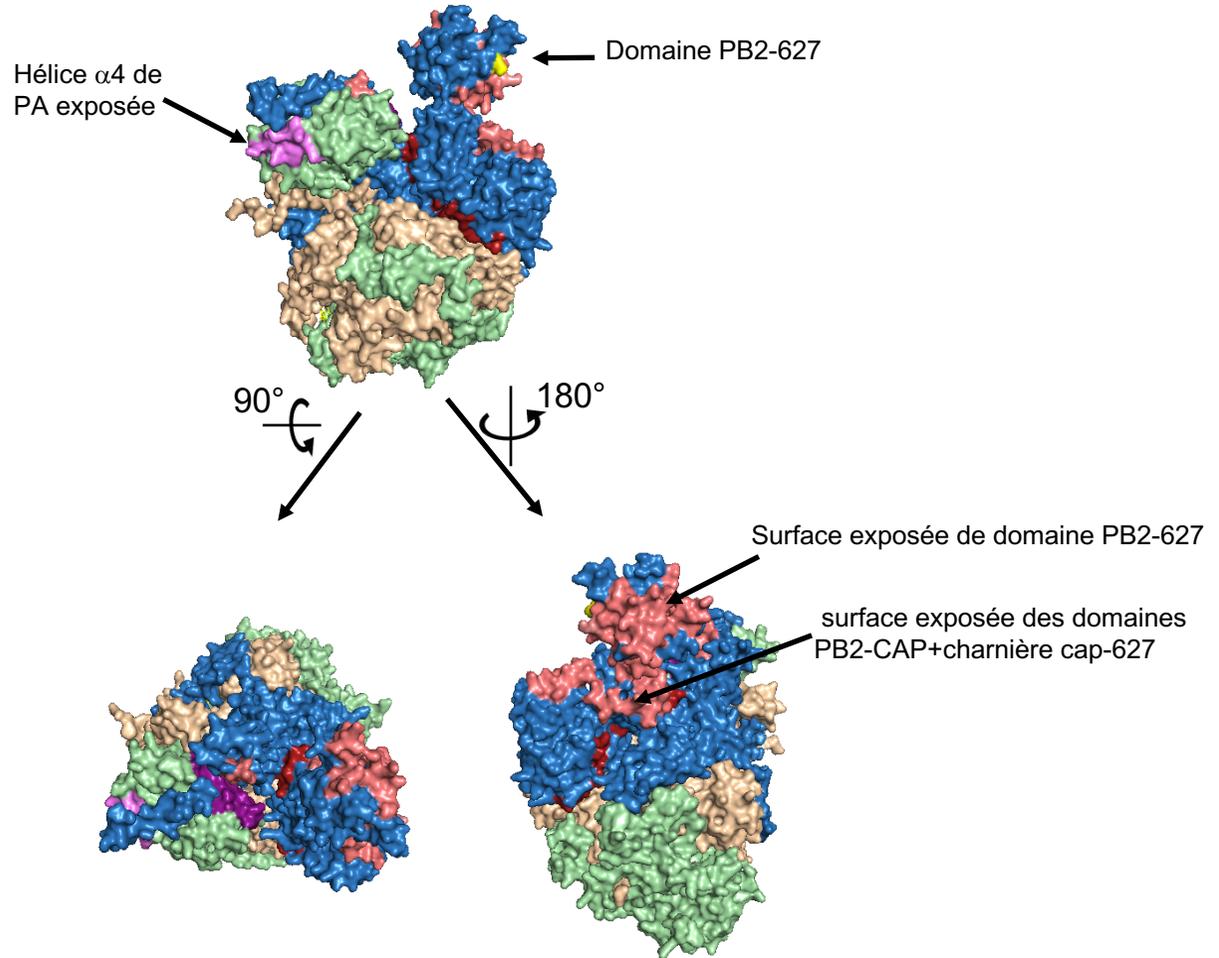


Figure 11