



Université Claude Bernard



Lyon 1

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **26 septembre 2019**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Shishan WANG**

Titre de la thèse : « *Production, Assembly and solid-state NMR analysis of Various Hepatitis B Virus Capsids* »



Résumé

L'hépatite B est une maladie du foie qui pose un problème majeur de santé publique. Il n'existe à ce jour aucun traitement permettant de guérir complètement de l'infection, et de nouvelles thérapies ont besoin d'être développées. Étant donné son rôle clé dans le cycle de vie du virus de l'hépatite B (VHB), la protéine core qui forme la capsid virale est aujourd'hui l'une des cibles avec le plus grand potentiel thérapeutique.

Nos recherches sont focalisées sur la caractérisation des capsides du VHB dans différents états conformationnels en utilisant des techniques de biochimie et de RMN du solide, afin de révéler leur conformation précise sous différentes conditions, incluant l'interaction des capsides avec des antiviraux, et la relation entre la conformation de la capsid et la maturation du virus. Un système d'expression bactérienne ainsi qu'un système acellulaire de synthèse de protéine à base de germes de blé ont été établis au laboratoire pour produire les capsides, et des protocoles pour désassembler puis réassembler les capsides en présence de différents types d'ARN ont été implémentés. Des échantillons de capsides formées dans *E. coli* et réassemblées *in vitro* ont été analysés par RMN. Les différentes formes de capsides observées incluent les protéines tronquées Cp140 et Cp149, la protéine entière Cp183, phosphorylée P-Cp183, et enfin des mutants.

Dans un premier temps, nous avons préparé des échantillons pour l'attribution séquentielle de la protéine core par RMN du solide. L'utilisation de la détection carbone en RMN requiert plusieurs dizaines de milligrammes d'échantillon, qui ont pu être produits en utilisant l'expressions bactérienne en milieu minimum contenant des isotopes marqués. Les attributions séquentielles ont été réalisées sur la protéine tronquée Cp149, qui donne des spectres très similaires à Cp183. Cet échantillon a également été utilisé pour identifier les

différences conformationnelles entre les 4 monomères de la capsid, qui sont provoquées par la symétrie icosaédrale T=4.

Ensuite, l'objet principal de cette thèse a été l'investigation et la comparaison d'une large variété de capsides, dans leur forme autoassemblée dans les bactéries *E. coli*, ainsi que dans leur forme réassemblée. Pour le réassemblage de la protéine entière, qui requiert la présence d'acides nucléiques, nous avons testé différents types d'ARN y compris l'ARN viral pré-génomique. Nous avons étudié différentes symétries (T=3 et T=4), ainsi que les états d'oxydation de la capsid, et comparé les différences de conformation grâce aux perturbations de déplacements chimiques observées dans les spectres RMN. Nous avons pu identifier les acides aminés impliqués dans les changements conformationnels majeurs entre les différentes préparations.

La RMN du solide en détection proton à 100 kHz a récemment émergé comme un outils important pour l'analyse de protéines produites en quantités moindres. Nous avons appliqué cette stratégie à l'analyse des capsides de Cp149 afin d'obtenir l'attribution des protons amides.

La détection proton par RMN du solide peut être combinée avec succès à la synthèse des protéines en système acellulaire, qui donne de faibles rendements par rapport aux cultures en bactéries. Cette approche est particulièrement intéressante pour analyser la modulation de l'assemblage des capsides induite par la présence de drogues. Bien que nous ayons commencé à étudier l'impact de modulateurs d'assemblage par RMN en détection carbone sur des capsides formées dans *E. coli* et réassemblées (données préliminaires non montrées dans ce manuscrit), la détection proton ouvre la voie vers l'analyse de l'impact de ces modulateurs sur l'assemblage des protéines core directement à la sortie du ribosome.