



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : 20 décembre 2019

Prénom et nom de famille de l'auteur : **Guillaume DAVID**

Titre de la thèse : « *Vers des études structurales de particules sous-virales d'Hepadnavirus par expression acellulaire à partir de germes de blé et RMN du solide* »



Résumé

Les études structurales des protéines membranaires eucaryotes sont importantes mais particulièrement difficiles à effectuer car elles nécessitent non seulement un système efficace et pratique pour produire la protéine dans une conformation native, d'une technique d'étude structurale compatible avec ce dernier. Du fait de leur modularité, les systèmes de production acellulaires *in vitro* sont adaptés à la production de protéines membranaires. De plus, l'amélioration de leur robustesse et de leur efficacité les rendent maintenant comme une alternative viable à l'expression cellulaire. Parmi ceux-ci, le Système d'Expression Acellulaire à partir de Germes de Blé (SEA-GB) est le plus efficace pour produire des protéines membranaires eucaryotes, et permet de plus un marquage isotopique efficace et spécifique. Ce dernier point est très utile pour la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), et plus spécifiquement la RMN du solide qui permet l'étude structure de protéines membranaires et d'assemblages macromoléculaires. Depuis récemment, la RMN du solide est compatible avec le SEA-GB, formant un outil puissant pour l'étude structurale de protéines membranaires et assemblages macromoléculaires.

Dans ces travaux, les deux techniques ont été combinées pour la production et l'étude des protéines d'enveloppe du virus de l'Hépatite B du canard (VHBC), appartenant à la famille des *Hepadnaviridae*. Ces virus sont capables de sécréter des virions actifs, mais aussi des particules composées uniquement de protéines d'enveloppe, appelées particules sous-virales (PSV). Dans un premier temps, nous montrons que plusieurs milligrammes de petite protéine d'enveloppe (DHBs S) du VHBC sont produits sous forme soluble avec le SEA-GB. DHBs S forme des PSV durant la traduction, ce qui confirme la conformation native de la protéine. Après désassemblage des PSV, la protéine est majoritairement en hélice α , synonyme d'un bon repliement. Après isolation par ultracentrifugation sur gradient de sucrose, les PSV ont été sédimentées dans un rotor de 0.7 mm et étudiées par RMN du solide. Des spectres 2D hNH très prometteurs ont été obtenus, avec un bon signal, des pics isolés et une résolution similaire à celle d'autres protéines membranaires sédimentées et étudiées par RMN du solide. De plus, la superposition du spectre de DHBs S avec des spectres simulés de protéines modèles possédant des structures secondaires caractéristiques confirme que DHBs S est principalement en hélice α dans le contexte des PSV. Le signal doit cependant être amélioré pour pouvoir réaliser les expériences nécessaires à des études structurales approfondies, c'est pourquoi des tests d'optimisation de la production ont été effectués. D'une part, l'amélioration du rendement de production, via l'utilisation d'un extrait de germes de blé commercial, et de la stabilisation des PSV, par incubation avec du KSCN, ont été testés. D'autre part, différentes méthodes de purification ont été examinées: précipitation à l'ammonium sulfate ou au PEG6000, incubation à haute température, élimination de contaminants via une unité d'ultrafiltration, purification d'affinité ou d'exclusion stérique ainsi qu'un test de désassemblage des particules, suivie d'une purification puis de la reconstitution des PSVs en présence de lipides.

Enfin, un marquage isotopique spécifique de certains acides aminés a été évalué. Dans la seconde partie, nous avons étendu les possibilités du SEA-GB via l'expression de la grande protéine d'enveloppe (DHBs L) du VHBC. *In vivo*, la protéine est phosphorylée spécifiquement et subit aussi une traduction alternative ; nous avons montré que c'était aussi le cas dans le SEA-GB. Nous avons aussi testé la coexpression de DHBs S, DHBs L ainsi que de la capside de DHBV pour inclure DHBs L dans les PSV, voire même reconstituer des virions entiers, ce qui augmenterait les possibilités du système. Enfin, nous avons aussi détaillé certains paramètres critiques pour la formation des PSV dans le système.