

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **25 septembre 2024**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur BRIGANDAT Louis**

Titre de la thèse : « *Études RMN d'assemblages de nucléocapsides virales* »



Résumé

La récente épidémie de SRAS-CoV-2 a mis la lumière sur les vecteurs viraux et les a placés comme un problème de santé mondiale. Cet épisode a notamment souligné l'importance de la recherche sur les virus afin de répondre à des enjeux de société de plus en plus importants.

Le virus de l'hépatite B (VHB) est responsable de plus de 800 000 décès dans le monde chaque année, malgré l'existence d'un vaccin efficace. Ce bilan s'explique en partie par l'absence d'antiviraux permettant de guérir les patients infectés. Les médicaments actuellement disponibles comme les analogues de nucléos(t)ides ou les interférons alphas, sont limités, soit car ils provoquent de lourds effets secondaires et sont donc restreints à un nombre limité de patients, soit car ils nécessitent une administration à vie puisqu'ils ne permettent pas d'éliminer l'ADN viral des cellules infectées. De nouvelles stratégies antivirales apparaissent donc cruciales, et une alternative prometteuse consiste à cibler la protéine de capsid Cp. En plus de former une cage supramoléculaire protégeant le génome viral, Cp participe à la transcription inverse de l'ARN pré-génomique, au transport intracellulaire du virus, est associé à l'ADN circulaire fermé de façon covalente et est impliqué dans l'enveloppement du virion. Ainsi, comprendre et interférer avec son fonctionnement permettrait de lutter efficacement contre le virus. Parmi les antiviraux qui utilisent cette stratégie, les modulateurs d'assemblages de la capsid (CAMs) sont des petites molécules qui se lient à l'interface entre deux dimères de Cp et qui perturbent la formation de capsides virales.

Nous avons donc combiné des approches d'expression bactérienne, de synthèse acellulaire à base de germes de blé avec de la microscopie électronique et de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) afin d'obtenir des informations structurales sur Cp en interaction avec des CAMs. Nous avons montré que les assemblages formés en présence de CAMs ne présentent qu'une conformation de Cp, contrairement aux capsides qui en contiennent quatre. De plus, les spectres RMN enregistrés en présence de CAMs permettent de différencier entre les deux classes de CAMs. Ensuite, le domaine d'assemblage de Cp tronqué ou entière, possède la même structure en présence de CAMs, malgré des différences d'apparence à l'échelle mésoscopique. Enfin, nous avons montré que les CAMs

modifient la phosphorylation de Cp et l'emballage de l'ARN lorsqu'ils agissent directement à la sortie du ribosome, dans un système acellulaire à base de germes de blé.

Ensuite, nous avons utilisé une combinaison de RMN paramagnétique et de dynamique moléculaire afin d'obtenir des informations sur la protrusion du domaine C-terminal (CTD) de Cp. En effet, ce dernier est intrinsèquement désordonné et donc n'est jamais observé dans les structures par rayons X ou par cryo-microscopie électronique, et n'est même pas mesuré en RMN du solide « conventionnelle » dû à sa dynamique intermédiaire de l'ordre de la microseconde. Or, ce CTD est crucial pour le virus car il est notamment impliqué dans l'encapsidation de l'ARN viral et sa transcription inverse ainsi que dans le transport nucléaire du virus. Il possède un signal de localisation nucléaire (NLS) qui interagit avec les importines de l'hôte et doit donc être exposé à la surface des capsides, afin de permettre le transport des particules matures vers le noyau. Ce phénomène est régulé par la phosphorylation dynamique du CTD. Nous avons donc utilisé la RMN paramagnétique pour comparer la protrusion du CTD en fonction de son état de phosphorylation et dans des assemblages de Cp liés à des CAMs. Nous avons trouvé que le bien que l'extrémité C-terminale reste majoritairement à l'intérieur de la capside dans tous les cas, le CTD des formes hyperphosphorylées et lié au CAM s'approche des pores d'ordre six. De plus, nous avons montré que seul le CTD des capsides hyperphosphorylées interagit avec l'importine alpha 1.

En parallèle, nous avons étudié la protéine de capside du virus de la dengue. Ce virus est responsable de près de 20 000 morts dans le monde chaque année, mais ce chiffre est voué à augmenter. En effet, le virus est transmis par le moustique du genre *Aedes* et ce dernier est amené à migrer en dehors des zones tropicales à cause du changement climatique. Le virus peut être séparé en cinq sérotypes qui peuvent chacun mener à une infection et éliciter une réponse immunitaire distincte. Le seul vaccin actuellement disponible contre dengue est seulement approuvé par 20 pays et est réservé aux individus de 6 à 45 ans ayant déjà été infecté par le virus. En effet, il a été montré que les vaccinés séronégatifs sont plus à même de développer des symptômes graves après infection. De plus, aucun antiviral n'est actuellement disponible pour lutter contre le virus. Le virus est composé d'une nucléocapside enveloppée par des protéines de surface. La structure de l'enveloppe a été résolue, mais celle de la nucléocapside n'a pas été élucidée.

Nous avons donc étudié par RMN la protéine de capside du sérotype 2 de dengue DEN2C, en interaction avec des acides nucléiques. Nous avons mis en évidence que la protéine est capable d'interagir aspécifiquement avec plusieurs acides nucléiques différents. De plus, les résidus affectés par l'interaction avec ces acides nucléiques sont différents des acides aminés postulés dans la littérature.

Enfin, nous avons examiné la glycoprotéine n du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV), un virus émergent transmis par les tiques *Hyalomma*. Ce virus fait partie des dix pathogènes identifiés par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une menace potentielle pour la santé publique. Nous rapportons ici l'attribution efficace des résonance RMN de la protéine grâce à une combinaison de synthèse acellulaire, de spectroscopie RMN à haut champ et d'utilisation d'outils d'apprentissage profond.