

2007-2011

Thèse n°1870

# THÈSE

pour le

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé**

**Mention : Sciences, technologie, santé**

**Option : Microbiologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 09/12/2011

Par Mildred DELALEAU

Né(e) le 03/05/1984 à Vernon

# **Import nucléaire de la capside du virus de l'hépatite B et libération du génome viral**

### **Membres du Jury**

Dr Jean Rosenbaum.....	Président
Dr Camille Sureau.....	Rapporteur
Pr Jean-Michel Rossignol.....	Rapporteur
Pr Ali Saib.....	Examinateur
Dr Christian Cazenave.....	Directeur de thèse
Pr Michael Kann.....	Chef du laboratoire

## Remerciements

Ce travail de thèse à été réalisé sous la direction du Dr. Christian Cazenave, que je souhaite remercier pour son travail d'encadrant ainsi que pour son soutien et ses conseils qui m'ont permis de me former au travail de chercheur.

Je souhaite aussi grandement remercier le Pr. Michael Kann qui m'a accepté au sein de son laboratoire pour le master 2 et m'as permis de rester en thèse dans son équipe, je souhaite le remercier pour son approche scientifique qui m'a beaucoup appris et pour son coté humain que j'ai beaucoup apprécié.

Je tiens aussi à remercier tout les membres de l'équipe qui m'ont aidé pendant cette thèse, surtout le Dr. Aurélia Cassany qui à répondu à toutes mes questions, qui parfois n'étaient pas très réfléchies et qui m'a supporté comme voisine de bureau pendant tout ce temps, merci pour son soutien et pour tous les conseils qui m'ont été souvent très utiles.

Je souhaite aussi remercier le Dr Sébastien Lainé pour son encadrement lors du master 2, ainsi que pour tous ses conseils lors de ma thèse et pour avoir contribué en grande partie à la bonne ambiance du laboratoire.

Je souhaite aussi remercier Jessica Ragues pour avoir mis un peu d'ordre dans le laboratoire et pour avoir préparé tout au long de ma thèse les réactifs communs et les cellules nécessaires aux expériences.

Je souhaite remercier aussi le Dr Harald Wodrich, pour tous ses conseils scientifiques qui m'ont aidé lorsque que les problèmes techniques devenaient frustrants, je souhaite aussi le remercier pour ces conseils lors du choix du Post-Doc.

Je souhaite aussi remercier le Dr Fabienne Rayne pour ses commentaires formateurs et les corrections apportées à mes présentations orales. Je remercie aussi Muriel Faure-Della Corte qui à participé au bon fonctionnement du laboratoire.

Je souhaite aussi remercier les personnes de l'hôpital qui nous on rejoint et qui ont apporté lors des réunions une connaissance clinique, le Dr Marie Edith Lafon, le Dr Isabelle Garrigue et le Dr Pascale Trimoulet.

Je souhaite aussi remercier tout les autres doctorants du laboratoire, Quentin Osseman, Ruben Martinez, Rémi Vaillant, Aurélie Deroubaix et Somar Kassab avec qui nous avons partagé nos expériences de thésard.

Je voudrai aussi remercier Kenza Snoussi pour sa motivation et son travail réalisé lors de son Master 1.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du MFP, surtout à Laure Coulange et Catherine André de l'Equipe de Bactériologie qui m'ont aidé lors de mon arrivée au laboratoire et qui sont devenues des amies au cours de ma thèse. Je souhaite aussi remercier les membres du MFP qui ont participé à mon projet de thèse, le Dr Michel Castroviejo qui m'a formé et m'a apporté ses connaissances pour l'utilisation des systèmes FPLC, je souhaite aussi remercier le Dr. Dominique Begu qui a avancé mon travail en réalisant pour moi certains clonages des plasmides. De plus je remercie le Dr. Patricia Laquel m'a permis d'aller plus vite dans mes travaux en réalisant la purification en grande quantité de quelques protéines nécessaires à mes expériences.

De plus je souhaite remercier la gestionnaire du laboratoire, Isabelle Dewor qui m'a aidé pendant les 5 ans que j'ai passé au laboratoire avec tous les papiers administratifs et avec qui j'ai pu discuté d'un peu de tout.

Je souhaite aussi remercier le Dr. Carmelo Di Primo avec qui j'ai pu tester les différents aspects du système Biacore et le Pr. Jean Velours pour ses connaissances qu'il a partagées avec moi sur les différentes techniques de Cross-Link.

Au niveau international, je souhaite surtout remercier Birgit Rabe de l'université de Giessen avec qui nous avons collaboré pour l'écriture de l'article dans Plos Pathogene, de plus je souhaite aussi la remercier pour son accueil lors de mon séjour à Giessen et ces travaux qui ont débuté le projet.

Je souhaiterais aussi remercier le Pr. Paul Pumpens de l'université de Riga qui nous a fourni différentes capsides purifiées et le Pr Katie Ullman qui a fourni au laboratoire les plasmides pour la surexpression des fragments de la Nup153.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury qui sont venu pour juger de la qualité de ma thèse et dont leurs commentaires mon permis de l'améliorer.

Je souhaite aussi remercier tout particulièrement ma famille qui m'a soutenu lors de mes études et m'ont permis d'arriver jusqu'au niveau de la thèse.

Je souhaite aussi remercier Christophe qui m'a grandement soutenu pendant cette période.

Je remercie donc toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de cette thèse.

<b>Introduction</b> .....	<b>12</b>
<b>I. Le virus de l'hépatite B humaine</b> .....	<b>13</b>
1. Historique .....	13
2. Taxonomie du virus.....	13
3. Epidémiologie : prévalence et mode de transmission .....	15
4. Infection par le VHB : cycle de l'infection .....	17
5. Vaccin et traitement .....	18
<b>II. Biologie moléculaire du virus de l'hépatite B humaine</b> .....	<b>20</b>
1. Structure des virions .....	20
2. Génome viral .....	21
3. Protéines structurales : .....	23
a. Protéines d'enveloppes : .....	23
b. Protéine de la capsid : .....	26
c. La polymérase virale : .....	29
4. Protéines non-structurales : .....	30
a. Protéine HBx : .....	30
b. Protéine précore et antigène HBe : .....	31
<b>III. Le cycle de réplication du VHB</b> .....	<b>32</b>
1. L'entrée du virus : .....	32
2. Migration de la capsid via le réseau intracellulaire : .....	34
3. Import nucléaire et libération du génome viral : .....	35
4. Réparation et conversion du génome viral: .....	36
5. Transcription des ARN viraux: .....	37
6. Transport des ARN viraux dans le cytoplasme: .....	37
7. Formation des capsides et encapsidation des ARNpg: .....	38
8. Rétro-transcription de l' ARNpg: .....	39
9. Bourgeonnement des particules virales: .....	41
<b>IV. Le pore nucléaire</b> .....	<b>43</b>
1. Morphologie du pore nucléaire : .....	43
2. Les nucléoporines: .....	44
3. Fonction du pore nucléaire: .....	47

<b>V.</b>	<b>Le transport nucléaire.....</b>	<b>48</b>
1.	Le transport passif: .....	48
2.	Le transport actif: .....	48
a.	Les signaux de localisation .....	48
b.	Les différents transporteurs .....	50
c.	Le cycle Ran GTP/GDP .....	54
d.	Les différents modèles d'import .....	55
<b>VI.</b>	<b>Import nucléaire de la capsid du VHB :.....</b>	<b>64</b>
1.	La capsid : .....	64
2.	Les transporteurs impliqués .....	70
a.	Importine alpha 2: .....	70
b.	Importine beta .....	71
3.	Nup153 : .....	74
<b>VII.</b>	<b>L'hypothèse de l'import : .....</b>	<b>77</b>
<b>VIII.</b>	<b>Désassemblage de la capsid et libération du génome : .....</b>	<b>81</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>		<b>83</b>
<b>I.</b>	<b>Matériel.....</b>	<b>84</b>
<b>II.</b>	<b>Méthodes.....</b>	<b>95</b>
1.	Transformation des bactéries.....	95
2.	Amplification et purification des plasmides : .....	96
3.	Clonage des plasmides : .....	96
4.	Surexpression et Purification des protéines : .....	98
5.	Préparation des capsides extracellulaires et intracellulaires.....	103
6.	Capsides recombinante : .....	107
7.	Electrophorèses et transferts.....	107
8.	Détermination des concentrations protéiques : .....	113
9.	Traitement à la protéinase K : .....	115
10.	Phénol/Chloroforme : .....	115
11.	Marquage des marqueurs de tailles radioactif : .....	116
12.	Modification des capsides : .....	117

13.	Marquage des importines :	121
14.	Préparation de RAN GTP et RANGDP :	121
15.	Essai d'import nucléaire :	122
16.	Localisation des Importines $\alpha$ et $\beta$ endogène dans les cellules Hela :	126
17.	Analyse des interactions avec les Importines $\alpha$ et $\beta$ :	126
18.	Centrifugation sur gradient de Nycodenz :	127
19.	Fractionnement des capsides sur les Colonnes Superdex75 :	128
20.	Cinétique de dégradation du génome dans les capsides par la nucléase S7 :	128
21.	Effet de différentes protéines sur la dissociation de la capside mature :	129
22.	Marquage du génome des capsides matures grâce à différentes sondes :	130
<b>Résultats</b>		<b>132</b>
<b>I. Purification des protéines :</b>		<b>133</b>
1.	Purification des protéines GST et GST-NLS :	133
2.	Purification de la protéine GST-IBB :	136
3.	Purification de la protéine Importine $\alpha$ - His :	137
4.	Purification de l'importine $\beta$ - His :	140
5.	Purification de la protéine Ran :	141
6.	Purification du fragment de la Nup153-C2 :	143
7.	GST-Nup153-C-terminal humaine :	144
8.	Purification des protéines Core :	146
9.	Purification des Capsides :	147
<b>II. Vérification de l'activité de l'Importine <math>\alpha</math> et <math>\beta</math> :</b>		<b>149</b>
1.	Vérification de la spécificité des anticorps primaires et secondaires :	149
2.	Import nucléaire des protéines GST, GST-NLS et GST-IBB :	150
<b>III. Localisation des importines endogènes :</b>		<b>152</b>
<b>IV. Analyse des interactions qui ont lieu lors de l'import nucléaire de la capside du VHB :</b>		<b>155</b>
1.	Formation des complexes et analyse sur gel SDS-PAGE :	155
2.	Formation des complexes et analyse au microscope confocal :	157
<b>V. Import nucléaire de la protéine GST-Core :</b>		<b>165</b>

<b>VI. Import nucléaire de la Capside mature :</b>	<b>167</b>
<b>VII. Import nucléaire des différentes capsides :</b>	<b>168</b>
<b>VIII. Stabilité des capsides recombinantes :</b>	<b>170</b>
1. Analyse de la capsid WT sur la Superdex 75 :	171
2. Analyse de la capsid C183S sur la Superdex 75 :	172
3. Analyse des intermédiaires de dissociation pour les capsides recombinantes :	174
<b>IX. Analyse des capsides sur gradient de Nycodenz :</b>	<b>175</b>
<b>X. Analyse des densités de capsid après import nucléaire :</b>	<b>176</b>
<b>XI. Import nucléaire dans des cellules traitées à la RNase :</b>	<b>177</b>
<b>XII. Accessibilité du génome et stabilité de la capsid :</b>	<b>179</b>
1. Accessibilité du génome encapsidé :	179
2. Accessibilité du génome et stabilité des capsides matures et immatures :	180
3. Accessibilité du génome et stabilité des capsides recombinante WT et C183S :	181
<b>XIII. Détermination des facteurs impliqués dans le désassemblage de la capsid :</b>	<b>182</b>
<b>XIV. Résultats préliminaires :</b>	<b>183</b>
1. Biotinylation des capsides :	184
2. Marquage du génome par des sondes :	184
<b>Discussion</b>	<b>187</b>
<b>I. Expression, purification et fonctionnalité des protéines :</b>	<b>188</b>
<b>II. Interaction entre les différents cargos karyophiliques et les protéines de l'import nucléaire :</b>	<b>190</b>
1. Interactions contrôles :	190
2. Interaction avec la protéine Core :	190
3. Nup153-C2 de xénope et Nup153-Cter humaine :	191
4. Interaction de Ran avec l'Importine $\beta$ :	192
5. Dissociation des complexes d'imports par Ran-GTP :	192
pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.	193

<b>III.</b>	<b>Localisation des importines :.....</b>	<b>193</b>
<b>IV.</b>	<b>Import nucléaire de la protéine Core et de la capsid mature : ...</b>	<b>193</b>
<b>V.</b>	<b>Import nucléaire des différentes capsides :.....</b>	<b>194</b>
<b>VI.</b>	<b>Stabilité des capsides recombinante WT et C183S :.....</b>	<b>194</b>
<b>VII.</b>	<b>Affinité des anticorps Dako et Fab3105 pour la capsid et ces intermédiaires d'assemblages :.....</b>	<b>195</b>
<b>VIII.</b>	<b>L'import nucléaire des capsides matures change leurs densités : 195</b>	
	1. Distribution des capsides dans un gradient de densité :.....	195
	2. Effet du transport nucléaire sur la sédimentation de la capsid mature :.....	196
	3. Effet de l'ARN nucléaire sur les capsides nucléaires et ces intermédiaires de désassemblage :.....	196
<b>IX.</b>	<b>Stabilité des capsides et accessibilité du génome :.....</b>	<b>197</b>
<b>X.</b>	<b>Facteurs impliqués dans la libération du génome :.....</b>	<b>197</b>
	<b>Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>199</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>203</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>231</b>

Liste des abréviations :

- VHB : virus de l'hépatite B
- HBsAg : protéine de surface
- ADN : Acide désoxyribonucleique
- ARN : Acide ribonucleique
- WHV : Woodchuck hepatitis B virus
- DHBV : Duck hepatitis B virus
- ALT : Alanine Amino transferase
- CHC : carcinome hepatocellulaire
- S : protéine de surface small
- M : protéine de surface medium
- L : protéine de surface large
- PKC : protéine kinase C
- Hsp70 : Heat shock protein 70
- Hsp90 : Heat shock protein 90
- ADNrc : ADN relâché partiellement double brin
- ADNccc : ADN circulaire covalamment clos
- ORF : Open reading frame : cadre ouvert de lecture
- NLS : nuclear localisation signal
- ARNpg : ARN prégénomique
- GTP : Guanosine tri-phosphate
- GDP : Guanosine di-phosphate
- NPC : nuclear pore complex
- NE : Nuclear envelope
- NES : nuclear export signal
- Nup153 : Nucleoporine 153
- IBB : Importin beta binding domain
- ATP : adenosine tri-phosphate
- RRL : rabbit reticulocyte lysat
- GST : glutathion S transferase
- NS7 : nucléase S7
- WGA : wheat germ agglutinin

## Résumé :

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un virus du foie qui cause 1 à 2 millions de morts chaque année. Approximativement 400 millions d'individus sont infectés chroniquement. Le VHB est un virus enveloppé et comprend un génome ADN de ~3.2 kbp au sein d'une capsidie icosaédrique. La capsidie est formée de 240 copies d'une protéine unique appelée Core ou protéine de la capsidie. Durant l'infection, la capsidie est importée dans le noyau pour libérer le génome viral. L'import est facilité au travers du complexe du pore nucléaire (NPC) en utilisant des récepteurs de transport nucléaire. Des biopsies réalisées sur des patients infectés par le VHB ont montrées que les capsides nucléaires sont issues de l'entrée nucléaire mais aussi de protéines Core nouvellement traduites.

Ce travail analyse l'import nucléaire de la capsidie du VHB et la libération du génome viral. Nous avons montré que les imports des protéines Core et de la capsidie suivent des systèmes d'import différents. Il a été démontré à partir de tests d'import nucléaire basés sur des cellules perméabilisées par la digitonine que les capsides utilisent l'hétérodimère des importines  $\alpha$  et  $\beta$ . Cette découverte est en accord avec de précédentes observations qui ont également démontrées l'exposition de NLS à la surface de la capsidie, sur lequel s'attache l'importine  $\alpha$ . Des expériences de contrôle utilisant le GST-NLS ont permis de démontrer que la fixation du NLS sur l'importine  $\alpha$  nécessite une interaction avec l'importine  $\beta$  pour la stabilisation du complexe de l'import. En analysant l'import nucléaire de la protéine Core non assemblée, nous avons pu observer un import basé uniquement sur l'interaction avec l'importine  $\beta$ , ce qui implique que la protéine Core présente un domaine IBB et non un NLS. Le transport à travers le NPC se termine par l'arrivée des capsides dans le panier nucléaire, qui est une structure en cage, du côté nucléaire. En accord avec la littérature, nous avons observé une liaison de l'importine  $\beta$  sur le domaine C-terminal de la Nup153. L'ajout de RanGTP, qui dissocie les complexes d'import, ne dissocie pas l'importine  $\beta$  de ce domaine, ce qui permet d'émettre l'hypothèse qu'un autre domaine de la Nup153 est impliqué. Contrairement aux autres cargos, la capsidie du VHB est stoppée dans le panier nucléaire par son interaction avec la Nup153. Puisque le domaine de liaison de l'importine  $\beta$  chevauche celui de la capsidie, l'importine  $\beta$  doit se dissocier de la Nup153. L'interaction capsidie-Nup153 est supposée déstabiliser la capsidie et permettre la libération du génome viral dans le noyau et la diffusion des protéines Core en supériorité numérique par rapport à la Nup153.

En conséquence, les capsides montrent une instabilité, comme nous l'avons démontré par chromatographie d'exclusion de taille, révélant non seulement la capside mais aussi ses intermédiaires d'association/dissociation. Ces expériences sont limitées aux capsides recombinantes car elles nécessitent une grande quantité d'échantillons. Dans le but de confirmer l'instabilité des autres capsides (matures et immatures), nous avons analysé l'accessibilité des acides nucléiques encapsidés pour la nucléase S7. Les résultats ont confirmé une dissociation *in vitro* partielle pour toutes les capsides, mais avec une cinétique lente, ce qui n'est pas cohérent avec la réaction *in vivo*. En analysant l'impact de la Nup153 sur cette accessibilité, nous observons qu'un facteur nucléaire supplémentaire, présent du moins dans les cellules hépatiques, accélère la cinétique de dissociation.

# Introduction

# **I. Le virus de l'hépatite B humaine**

## **1. Historique**

Le virus de l'hépatite B n'a été découvert qu'en 1963 par le Dr. Baruch Blumberg, mais la première épidémie recensée comme étant due au virus de l'hépatite B (VHB) date de 1883. Une épidémie de variole se déclencha à Brême en Allemagne, où les employés des chantiers navals furent vaccinés avec le sérum de personnes immunisées. Après plusieurs semaines, environ 15 % des personnes vaccinées montrèrent les signes d'un ictère et une hépatite sérique fut alors diagnostiquée. La publication de Lürman de 1885 a prouvé qu'une contamination lymphatique d'un lot de vaccin était à l'origine de cette épidémie (Lürman 1885).

Par la suite de nombreux cas similaires furent signalés, mais l'existence d'un virus ne fut soupçonnée qu'en 1947 avec les travaux de MacCallum, qui proposa d'appeler hépatite A, l'hépatite épidémique à incubation courte et hépatite B l'hépatite sérique à incubation longue (MacCallum 1947). Il fallut ensuite attendre 1963 et les travaux du Dr. Blumberg qui décida d'utiliser le sérum de patients hémophiles ayant subis de multiples transfusions et donc produit de nombreux anticorps contre les protéines du sang des donneurs. Un résultat inhabituel fut observé entre l'anticorps d'un hémophile new-yorkais et les antigènes trouvés dans le sang d'un aborigène australien, cet antigène fut alors appelé antigène « australia » (Blumberg, 1965). Après de plus amples analyses il fut montré que cet antigène était lié à l'hépatite B (Blumberg, 1967). Cela fut ensuite confirmé deux ans plus tard par l'équipe du Dr Prince (Prince 1968). Le nom d'antigène HBs, fut par la suite utilisé pour désigner cet anticorps. Le Dr. Blumberg obtint le prix Nobel de médecine en 1976 pour cette découverte et pour la conception de la première génération de vaccin contre l'hépatite B.

Puis en 1970, Dane et ses collaborateurs ont visualisé au microscope électronique les particules du virus appelées maintenant particules de Dane (Dane, 1970), et ce fut en 1979 que le génome du virus fut séquencé par l'équipe française du Dr Tiollais (Galibert, 1979).

## **2. Taxonomie du virus**

Actuellement, cinq hépatites humaines virales ont été découvertes, ce sont les hépatites A, B, C, D, E et G (Cronshaw, 2002) (Kelly, 2002). Il existait auparavant l'hépatite F mais qui a été démontrée comme étant en fait une hépatite A. Ces différents virus se distinguent entre eux

grâce à leur mode de transmission (Figure 1). En effet l'hépatite A et E se transmettent par voie entérale ou féco-orale, alors que les hépatites B, C, D et G se transmettent par les voies parentérales. Ce sont tous des virus à ARN excepté le virus de l'hépatite B qui est à ADN mais passe par une étape ARN au cours de son cycle. Ces virus provoquent des hépatites aiguës ou chroniques pour la B, C et D. Malgré le fait que ces virus infectent tous le foie, leurs cycles viraux sont assez différents, de plus ces virus ne font pas partie de la même famille dans le classement taxonomique.

	A	B	C	D	E	G
Famille	Picornavirus	Hepadnavirus	Flavivirus	Viroid/virus satellite	Calicivirus	Flavivirus
génom	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA	RNA
Enveloppe	non	oui	oui	non	non	oui
Transmission	Orofécal	sang	sang	sang	oral	sang
chronicité	jamais	Dépend de l'âge	70-85 %	Dépend du statut VHB du patient	jamais	Dépend du génotype et de l'âge

**Figure 1:** Description des différentes hépatites

En effet, le virus de l'hépatite B (VHB) appartient à une famille de virus animal nommée les *Hepadnaviridae*, car se sont des virus (viridae) du foie (hepa) qui possèdent un génome ADN (dna). Ce sont donc des virus contenant un génome ADN et infectant spécifiquement les cellules du foie. Cette famille de virus avec la famille des *Caulimoviridae* forme le groupe des Pararetrovirus.

Le VHB a été le premier découvert au sein de la famille des *hepadnaviridae*, en 1963, puis par la suite d'autres virus de cette famille ont été découverts. Ces virus ont été classés en deux genres : les *Orthohepadnavirus* et les *Avihepadnavirus*. Le premier genre, les *Orthohepadnavirus*, comprend le virus de l'hépatite B humaine ainsi que ceux des rongeurs comme celui de la marmotte, le woodchuck hepatitis virus (WHV), celui de l'écureuil, le ground squirrel hepatitis virus (GSHV) ou l'artic squirrel hepatitis virus (ASHV). Ce genre comprend aussi les virus retrouvés chez les singes : ChHBV (chimpanzés), GoHBV (gorille), OuHBV (orang-outang), GiHBV (gibbon) et WMHBV (singe laineux). Quand au genre des *Avihepadnavirus*, il comprend les virus retrouvés chez les oiseaux comme celui du canard (DHBV), celui du héron (HHBV) et celui de l'oie, ross's goose hepatitis B virus (RGHBV).

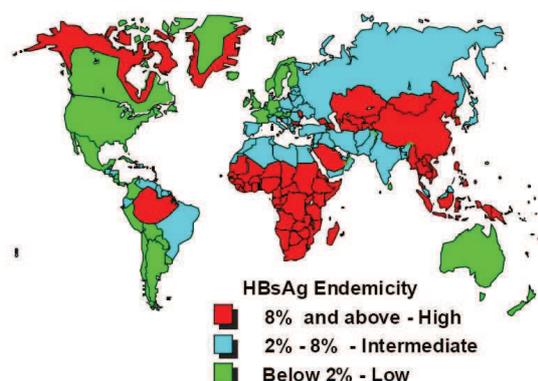
Ils diffèrent des virus de mammifères par le fait que ces virus ne possèdent ni la protéine HBx ni la protéine de surface M (Funk, 2007).

Le VHB possède huit géotypes différents, classés de A à H qui présentent une différence au niveau de leurs séquences ADN d'environ 8 %. Ces géotypes diffèrent par leur distribution géographique mais aussi par leur pathogénicité, ce qui inclut le risque de chronicité et la capacité d'induire des cancers (Dehesa-Violante, 2007). Le géotype C est actuellement celui qui induit les hépatites les plus sévères et le plus de cancer (Pujol, 2009). Il faut cependant prendre en compte le biais du aux problèmes ethniques et environnementaux.

### **3. Epidémiologie : prévalence et mode de transmission**

L'hépatite B est un problème major de santé publique. En effet, environ 30 % de la population mondiale, soit environ 2 milliards de personnes, portent la trace sérologique d'une infection passée ou présente par le VHB. Il a été estimé que 360 millions de ces personnes infectées le sont de façon chronique et que 600 000 en meurent chaque année. Actuellement, le VHB est la seconde cause de cancer dans le monde après le tabac (Gomaa, 2008).

La présence de l'antigène HBs, qui reflète le nombre de personnes infectées chroniquement, est observée dans le monde entier. Cette détermination sérologique a permis de mettre en évidence les zones de forte endémie dans laquelle la prévalence de l'antigène HBs est supérieure à 8 %. Il s'agit de l'Asie du sud-est et de l'Afrique sub-saharienne (Figure 2).

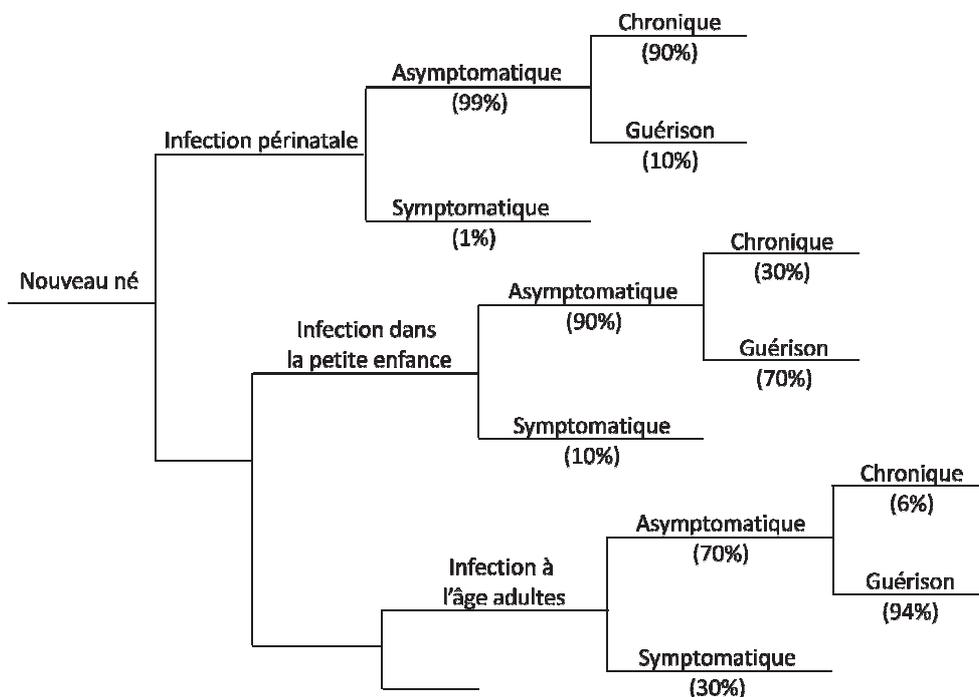


**Figure 2:** Distribution géographique de l'antigène HBs (world health organization. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services, 2001, Geneva, WHO, WHO/V&B/01.31)

Le VHB est un virus relativement résistant, il peut rester stable plusieurs jours dans le milieu extérieur (environ 7 jours), mais aussi résister à la congélation et à l'alcool à 90°(Bronowicki, 2006).

Les personnes infectées de façon chronique sont le réservoir naturel de ce virus. Chez les personnes infectées, les nouveaux virus sont retrouvés en majorité dans leur sang, mais aussi en faible quantité dans le lait maternel, la salive, le sperme et l'urine (Davison, 1987). De plus le VHB est un virus très contagieux (100 fois plus que le VIH), la contamination se fait surtout par voie sexuelle, ou par voie sanguine avec les transfusions mais également par voie percutanée ou lors de transplantation du foie. La voie la plus importante reste le passage de la mère à l'enfant lors de l'accouchement (Shepard, 2006). Il est connu que plus l'infection par le VHB se fait tôt dans la vie plus le risque de développer un hépatocarcinome est grand (Figure 3).

En effet, 90 % des infections périnatales se terminent en hépatite chronique, alors que lorsque l'infection se produit dans la petite enfance (entre 1 et 5 ans) le pourcentage chute à 25-30 %. Lorsque l'infection se produit à l'âge adulte seulement 6 % des personnes infectées risquent de déclarer une hépatite chronique (Goldstein, 2005).



**Figure 3:** Développement de la maladie selon l'âge de l'infection (d'après les données de Goldstein).

Il a donc été montré que le développement de la maladie dépend de l'âge de la personne infectée, mais à cela peut être ajouté deux autres facteurs importants que sont la dose infectieuse et l'état du système immunitaire de la personne infectée.

En effet, le virus en lui-même ne possède pas de capacité cytotoxique, les dégâts observés sur le foie des patients résultent de la réponse immunitaire de l'hôte contre le virus. Cela explique le fait que pour les personnes n'ayant pas une immunité très développée, comme à la naissance, l'immunité ne va pas pouvoir éliminer les virus et va permettre le développement d'une hépatite chronique. Cela peut aussi être observé lorsque la dose infectieuse est très faible, l'immunité peut soit éliminer le virus sans déclencher d'inflammation importante ou alors elle peut passer inaperçue et devenir chronique. Le devenir de l'infection est en fait un équilibre entre l'immunité de l'hôte et la réplication du virus.

Il existe donc deux formes d'infection, la forme aiguë et la forme chronique. La forme aiguë possède des symptômes non spécifiques comme des malaises, pertes d'appétit, nausées et douleurs abdominales. Cependant pour environ 10 % des cas cela peut aussi provoquer de l'arthrite, de la fièvre ou un ictère. Cette forme de la maladie est le plus souvent détectée par quantification des enzymes hépatiques ALT. Mais elle peut aussi être montrée par le dosage dans le sérum de l'antigène HBs (HBsAg). Cependant, si la présence de HBsAg persiste pendant plus de six mois après la fin de l'infection, cela signifie que la maladie passe de la forme aiguë à la forme chronique. Plus rarement 0,1 % des infections déclarées aiguës peuvent devenir très sérieuses voir mortelles, ce sont des hépatites fulminantes. Dans ce cas, le foie subit d'importants dommages en seulement quelques jours, ce qui peut déclencher un coma hépatique et cela peut s'avérer fatal, si une greffe de foie n'est pas pratiquée.

La forme chronique de la maladie, possède elle aussi des symptômes non spécifiques qui sont la fatigue, des malaises, la perte de poids. Cependant, elle passe souvent inaperçue jusqu'à la découverte d'une cirrhose. De plus, lors de la forme chronique de la maladie, des carcinomes hépatocellulaires (CHC) peuvent apparaître, ce risque concerne environ 360 millions de personnes dans le monde.

#### **4. Infection par le VHB : cycle de l'infection**

Un des aspects très importants du cycle de l'infection est la différence dans la progression de la maladie entre les patients immunocompétents et ceux ne possédant pas une immunité très développée. Il existe trois phases importantes de l'infection (Fattovich, 2008), la première est

la phase d'immunotolérance qui est développée lorsque l'infection est contractée pendant l'enfance, elle n'est pas présente chez les patients infectés plus tard dans leur vie.

Cela est dû au fait que l'immunité n'est pas encore mature chez les nourrissons ce qui permet aux virus de se répliquer dans les hépatocytes. Cette phase est caractérisée par une charge virale très importante ( $10^7$ - $10^{11}$  copie/ml) avec très peu d'inflammation du foie, le taux d'alanine transférase reste normal (Blumberg, 1965). De plus durant cette phase, le patient est positif pour l'antigène HBe (HBeAg), HBe est une protéine virale utilisée comme marqueur de l'évolution de la maladie car il existe une corrélation entre la charge virale et la quantité d'HBe.

La deuxième phase de l'infection chronique est la phase immuno-active, l'entrée dans cette phase n'est pas encore bien comprise mais l'hypothèse est que l'expression des antigènes de l'hépatite B pourrait causer une importante réponse immunitaire cytotoxique contre les cellules du foie infectées par le virus. Cela augmente la concentration d'ALT et diminue le taux de génome de VHB. C'est durant cette phase que le foie subit le plus de dommages, et que soit l'hôte va éradiquer le virus, soit il va se créer un équilibre entre la réaction immunitaire et la réplication du virus ce qui va aboutir à la chronicité de l'infection (Chu, 1997).

Puis la séroconversion de HBeAg du patient va marquer le passage dans la troisième phase qui est la phase résiduelle. Cette phase est définie par une régression biochimique et histologique de l'inflammation hépatique. Une amélioration histologique est observée dans les mois ou années qui suivent la séroconversion. Pendant cette phase, le taux d'ADN reste faible ( $10^3$ - $10^5$  copie/ml), cependant dans 30 % des cas une réactivation du virus peut se produire et cela est désigné comme hépatite B chronique HBeAg négative (Thompson, 2007).

## **5. Vaccin et traitement**

Le premier vaccin contre l'hépatite B a été découvert en 1976, il était constitué de particules virales vides purifiées de sérum de patient infecté de façon chronique (Maupas, 1976). Ce dernier fut remplacé pour des mesures de sécurité par des vaccins qui sont en fait constitués de protéines d'enveloppe recombinantes (Kane 1996).

La réponse au vaccin est mesurée par le dosage des anticorps neutralisants antiHBs, cependant il a été montré qu'une faible proportion d'individus ne répond pas à ce vaccin, de plus des mutations au niveau des protéines de surface ne sont pas rares (Inchauspe, 2007).

Pour le traitement, il existe deux grandes familles de molécules thérapeutiques, les immuno-régulateurs et les drogues antivirales (Marcellin, 2005). La première famille, les immuno-régulateurs, est composée surtout de l'interféron alpha et l'interféron alpha pegylé. Ces molécules inhibent la synthèse de l'ADN viral en activant les enzymes antivirales cellulaires. De plus ils augmentent la présentation de l'antigène par les molécules du CMH1, ce qui stimule les lymphocytes T Helper et les cellules NK.

Ce traitement à l'interféron est efficace dans seulement 20 % des cas et présente des effets secondaires.

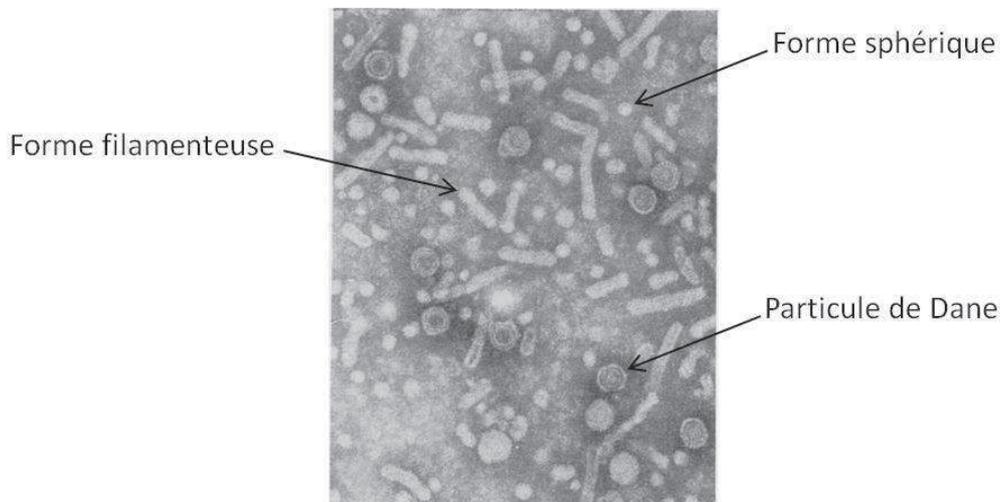
La deuxième famille est composée des analogues nucléotidiques et/ou nucléosidiques. Les plus utilisés sont le Tenofovir et l'Entecavir. Ces molécules inhibent l'étape de transcription inverse. Le problème de ce traitement est qu'il ne débarrasse pas les cellules de l'ADN viral, mais bloque sa réplication. A l'arrêt du traitement, il y aura réactivation de la réplication. De plus, ces traitements engendrent des mutations au niveau de la polymérase virale.

Récemment une nouvelle molécule antivirale à fait son apparition, il s'agit des PNAs (peptids nucleic acid), ce médicament est en essai clinique. Ce sont des analogues d'oligonucléotides dans lesquels le squelette phosphodiester reliant les bases nucléiques, est remplacé par un squelette polyamide. Ces PNAs s'hybrident sur un des brins de l'ADN viral ou les ARNm grâce à leurs bases complémentaires et inhibent la transcription ou la traduction par encombrement stérique (Chen, 2007).

## II. Biologie moléculaire du virus de l'hépatite B humaine

### 1. Structure des virions

Le VHB est un virus très infectieux, en effet la majorité des virions sont infectieux. De plus, il possède la capacité de réaliser une surproduction des protéines de surface, ce qui entraîne la production de particules subvirales vides. Le virion mature est constitué d'une enveloppe composée de trois glycoprotéines différentes qui sont les protéines de surface S (small), M (medium) et L (large). Cette enveloppe englobe une nucléocapside, composée généralement de 240 protéines "core", qui elle-même contient le génome du virus constitué d'ADN circulaire relâché partiellement bicaténaire (ADNrc). A l'extrémité 5' du brin négatif de cet ADNrc la polymérase virale est liée de façon covalente. La nucléocapside contient aussi des protéines d'origine cellulaire encapsidées lors de la formation des virus. Ces protéines sont la protéine kinase C (PKC) (Kann, 1993), ainsi que des protéines chaperonnes Hsp70 et Hsp90 (Stahl, 2007). Les virions ainsi constitués présentent une taille d'environ 45 nm déterminée par microscopie cryo-électronique (Stannard, 1973). Les virions sont aussi nommés particules de Dane, du nom du chercheur les ayant observés pour la première fois en 1970 (Figure 4).



**Figure 4:** VHB contenu dans le sérum de patient infecté et observé par microscopie électronique (Stannard, 1973).

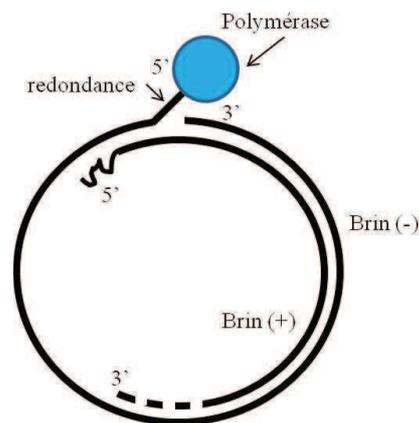
Dans le sérum des patients malades, il a été observé, en plus des virions matures, des particules sousvirales composées de protéines de surface et possédant un diamètre d'environ 20 nm. Ces particules sont présentes sous deux formes : la forme sphérique et la forme

filamenteuse dont le diamètre est aussi de 20 nm mais dont la longueur est variable. La forme de ces particules semble être déterminée par la quantité de protéines L contenues dans les enveloppes vides, ainsi la présence des protéines L induirait la formation des formes filamenteuses plutôt que sphériques (Patient, 2007). On retrouve ces particules sousvirales en grande quantité dans les sérums de patients, de 1000 à 10000 fois plus nombreuses que les virions matures. Cette forte concentration de particules vides agirait comme un leurre sur le système immunitaire (Seeger, 2000) (Patient, 2009).

## 2. Génome viral

Le génome du virus de l'hépatite B est considéré comme un des plus petits génomes de virus pathogènes de l'homme, avec une taille d'environ 3200 paires de bases. Dans les virions matures, le génome est retrouvé sous forme d'ADN circulaire relâché partiellement bicaténaire (ADNrc) (Figure 5). Il est constitué d'un long brin négatif, qui contient une redondance de 7-10 bases, ainsi qu'un brin positif plus court de taille variable. Le brin positif varie entre 1100 et 2600 nucléotides.

C'est au niveau de la redondance du brin négatif en extrémité 5' que se fixe la polymérase virale. Le brin positif contient quant à lui une coiffe ARN en 5', composée de 18 nucléotides qui servent d'amorce lors de la synthèse du brin d'ADN positif, et qui devient aussi la terminaison en 5' de l'ARN pré génomique.

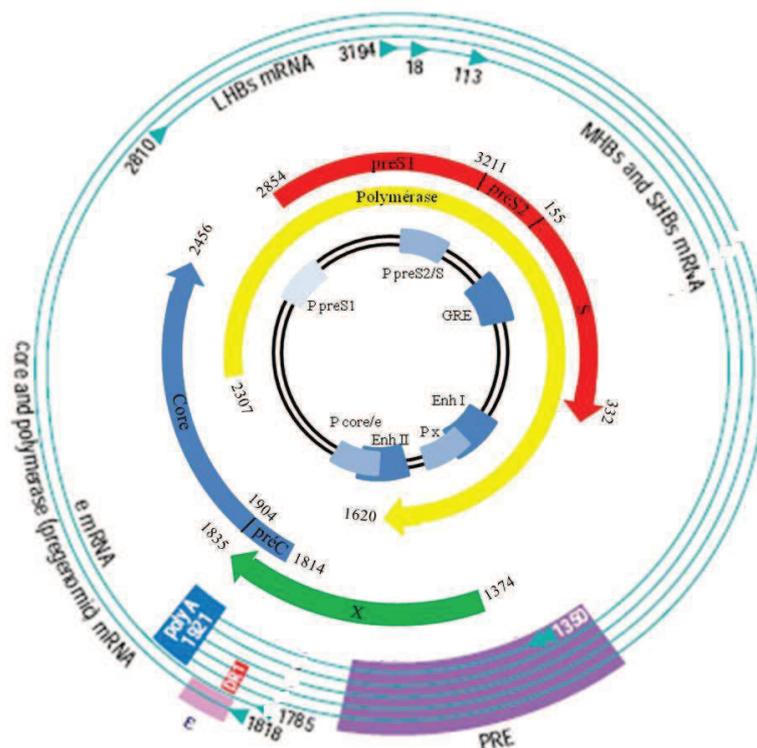


**Figure 5:** Génome du VHB sous forme d'ADN circulaire relâché partiellement double brin

Dans le noyau, l'ADNrc subit une réparation/conversion en ADN circulaire covalamment clos (ADNccc), étape nécessitant plusieurs modifications impliquant la participation de nombreuses enzymes. (Voir : Réparation et reconversion du génome viral).

Le génome porte quatre cadres ouverts de lecture (ORF, pour open reading frame) qui se chevauchent et qui recouvrent tout le génome. Les quatre ORFs sont l'ORF P, l'ORF S, ORF C et l'ORF X (Seeger, 2000):

- l'ORF P couvre 80 % du génome et code pour la polymérase virale.
- l'ORF S chevauche l'ORF P et code pour les trois protéines d'enveloppe et possède 3 codons d'initiations pour le gène PréS1, le gène PréS2 et le gène S. Ces gènes vont servir à coder les protéines HBs Small (gène S), HBs Médium (gène préS2 et gène S) et HBs Large (gènes préS1, PréS2 et gène S). Cela signifie que les protéines d'enveloppe ont toutes les trois la même extrémité C terminale.
- l'ORF C qui chevauche l'extrémité 5' de l'ORF P, le gène C code pour la protéine de la capside et pour le pré-core, la traduction du C et du pré-C donne le précurseur de la protéine HBc.
- l'ORF X qui chevauche l'extrémité 3' de l'ORF P code pour la protéine HBx.



**Figure 6:** Organisation du génome du VHB. Le génome est représenté au centre en noir, les éléments de la régulation sont positionnés approximativement sur le génome. Les promoteurs sont représentés en bleu clair et les "enhancers" (Enh) et le "Glucocorticoid responsive element" (GRE) sont représentés en bleu foncé. Les ORFs sont dessinés par des flèches. Les différents ARNs sont représentés à l'extérieur, les triangles verts représentent la terminaison 5'. Les terminaison 3' sont identiques aux différents ARN et sont liées à des queues poly-A. Les éléments de régulation de l'ARN sont montrés en rose pour signal d'encapsidation ε, en bleu pour le signal de polyadenylation, en rouge pour DR1 et en violet pour le "post-transcriptional element" (PRE).

L'expression du génome est régulée à deux niveaux, au niveau de l'ADN avec :

- quatre promoteurs (PréC/C, S, HBsL et HBx),
- deux "enhancers", EnhI et EnhII qui vont réguler les promoteurs
  - o Enh1 est peu spécifique des hépatocytes, il utilise des facteurs comme le Nuclear factor 1 (NF1), l'activating protein 1 (AP1), le nuclear factor kappa B et d'autres.
  - o Enh2 montre réellement de la spécificité pour les hépatocytes, les facteurs de transcription utilisés sont C/EBP et HNF4. Cet 'enhancer' ne régule pas tous les promoteurs, comme par exemple le promoteur HBsL.
- le "Glucocorticoid responsive element" (GRE), localisé entre l'Enh1 et l'Enh2 et qui augmente l'activité d'Enh1.
- le "Negative regulatory element" (NRE) qui diminue l'activité de transcription et plus particulièrement inhibe l'activité du promoteur "core", PréC/C
- le "CCAAT element" qui régule négativement la transcription du promoteur préS1 mais qui active la transcription de l'ARNm S.
- le "Direct repeat 2" qui est situé sur le brin d'ADN négatif et qui sert de site d'initiation à la synthèse du brin d'ADN positif.

Il existe aussi de nombreux systèmes de régulation au niveau de l'ARN :

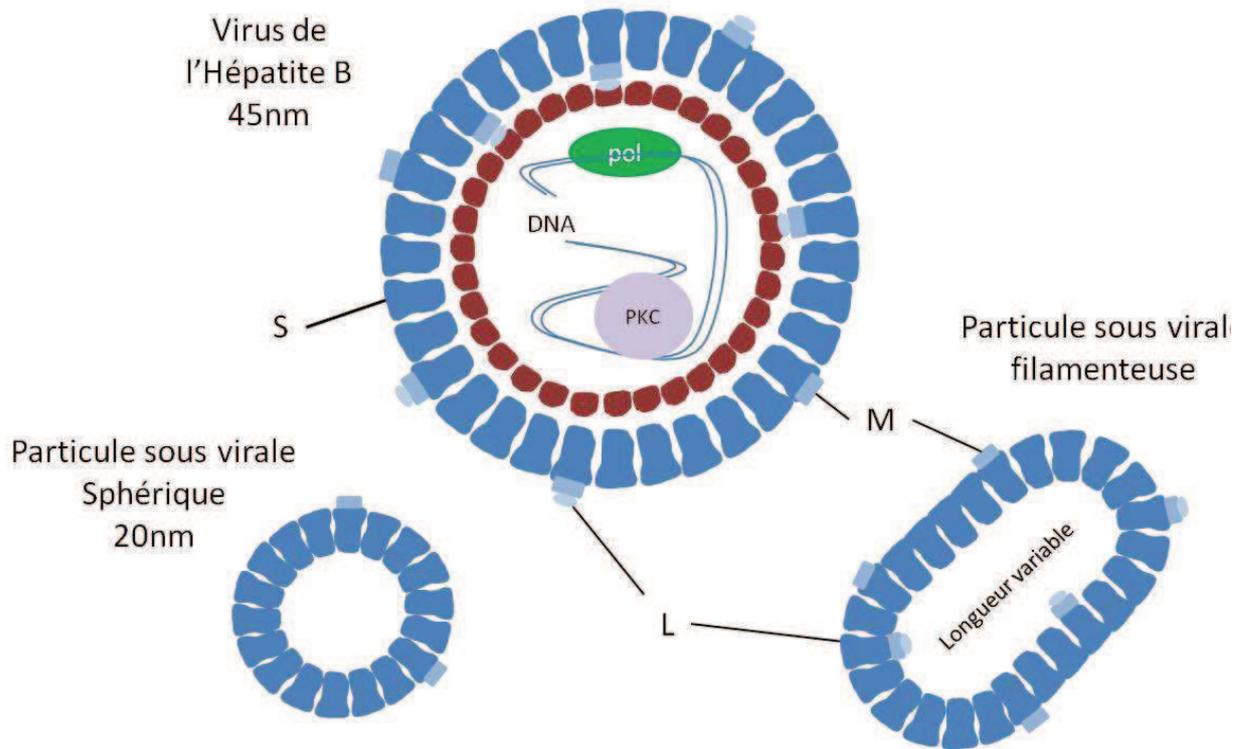
- Le signal de polyadénylation: tous les ARNm se terminent en 3' par une queue poly A
- Le 'post-transcriptional element' (Kohler, 1999) qui prévient l'épissage des ARNm viraux
- Le signal  $\epsilon$  qui est le site d'attache de la polymérase sur l'ARN, et va également servir à l'initiation du brin d'ADN négatif.

### **3. Protéines structurales :**

#### **a. Protéines d'enveloppes :**

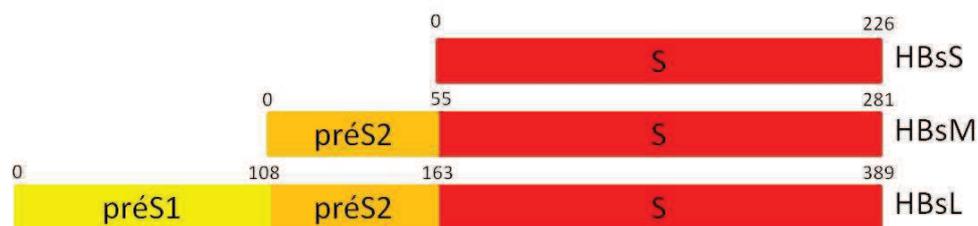
Les protéines d'enveloppe sont codées par l'ORF S composé des régions préS1, préS2 et S. A cet ORF correspondent deux ARNm qui vont coder pour les trois protéines HBs. Les protéines S et M sont traduites à partir des ARNm viraux de 2,1 kb, il existe une micro-hétérogénéité au niveau de leurs extrémités 5', alors que la protéine L est traduite de l'ARNm de 2,4 kb. Ces protéines ont un rôle dans l'entrée du virus lors de la reconnaissance du

récepteur cellulaire, et dans la fusion entre les membranes virales et cellulaires afin de libérer les capsides dans le cytoplasme, c'est le domaine pré-S1 qui interagit avec la capside. D'autre part, elles participent à la morphogénèse des virions, lors de l'acquisition de l'enveloppe avant la sécrétion des particules virales matures ou vides. La distribution de ces protéines varie entre les virions, la forme filamenteuse et la forme sphérique. Ainsi, on trouve plus de protéine L dans les virions et les particules sousvirales filamenteuses (Figure 7).



**Figure 7:** VHB et particules subvirales (d'après Glebe, 2007).

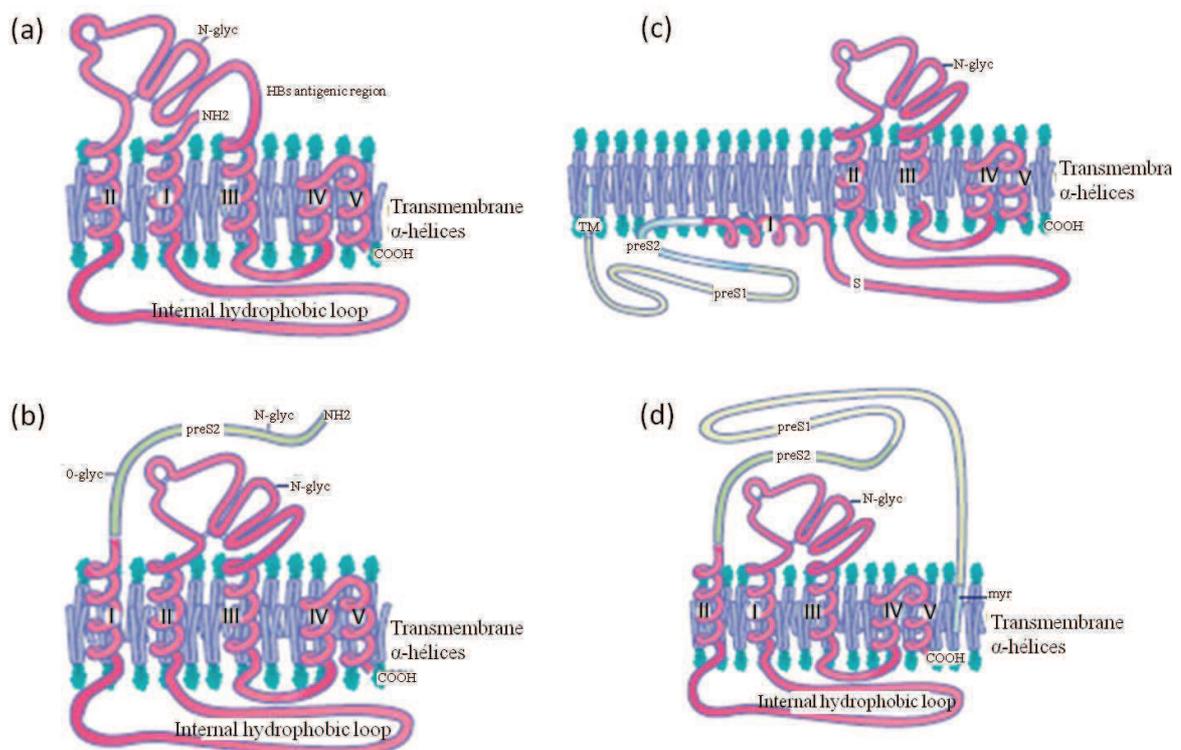
Les protéines sont exprimées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, puis subissent des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations, au niveau du réticulum endoplasmique (Shepard, 2006).



**Figure 8:** Protéines d'enveloppe du VHB (d'après Glebe, 2007)

La protéine S est la plus abondante dans l'enveloppe des virions, où elle représente environ 85 % de celle-ci. Elle est exprimée à partir du gène S et est composée de 226 acides aminés. Au sein du RE, c'est une protéine transmembranaire qui possède ses extrémités N et C terminales orientées vers la lumière du RE (Figure 9). Elle est constituée de quatre segments transmembranaires, TM1 à TM4, ainsi qu'une boucle antigénique majeure située entre le TM2 et le TM3 et qui sera exposée au niveau de la surface des particules virales. La protéine S est rencontrée sous deux formes, la forme p24 non glycosylée et la forme gp27 glycosylée sur l'asparagine 146. Cette forme glycosylée est présente à environ 40 % sur les particules virales (Glebe, 2007).

La protéine M, composée des 226 acides aminés de la région S et des 55 acides aminés de la région préS2, est quant à elle beaucoup moins abondante dans les particules virales. Elle possède la même topologie que la protéine S, cependant le domaine préS2 en N terminal se trouve dans la lumière du RE. On retrouve la protéine M sous deux formes : la forme gp33, mono-glycosylée (sur l'asparagine 4) et la forme gp36 qui est diglycosylée (sur l'asparagine 4 du domaine préS2 et sur l'asparagine 146 du domaine S). La glycosylation du domaine préS2 est nécessaire à la maturation des protéines M, et à son interaction avec la calnexine, une protéine chaperonne du RE.



**Figure 9:** Modèle topologique des trois protéines de surface (a) : HBsS, (b) : HBsM et (c) (d) : HBsL (d'après Kann, 1997).

La troisième protéine de l'enveloppe est la protéine L. Elle diffère de la protéine M par la région préS1 située en N terminal de la protéine, correspondant à une addition de 108 à 119 acides aminés selon les génotypes. Son extrémité N terminale est ancrée dans la membrane du RE car elle est myristylée sur la glycine en position 2 du domaine préS1. De plus la protéine L a la particularité de posséder deux topologies différentes : d'une part la forme initiale i-préS (internal-preS), qui présente les domaines préS1 et préS2 et TM1 orientés vers le cytoplasme. D'autre part à la suite d'un mécanisme dépendant de la protéine chaperonne GRP78/Bip, les domaines préS sont transloqués dans la lumière du RE, ce qui donne la topologie e-préS (external preS). Dans la cellule les deux formes sont retrouvées en quantités égales alors que seule la forme e-préS est retrouvée dans les virions. La protéine L, apparaît elle aussi sous deux formes, la forme p39 non glycosylée et la forme gp42 qui est glycosylée sur l'asparagine 146.

La protéine de surface L, sous sa forme topologique e-préS1, est nécessaire à l'entrée des virions dans les cellules hépatiques. Les résidus 3 à 77 du domaine préS1 sont particulièrement importants pour ce processus de même que la myristylation de la glycine en position 2.

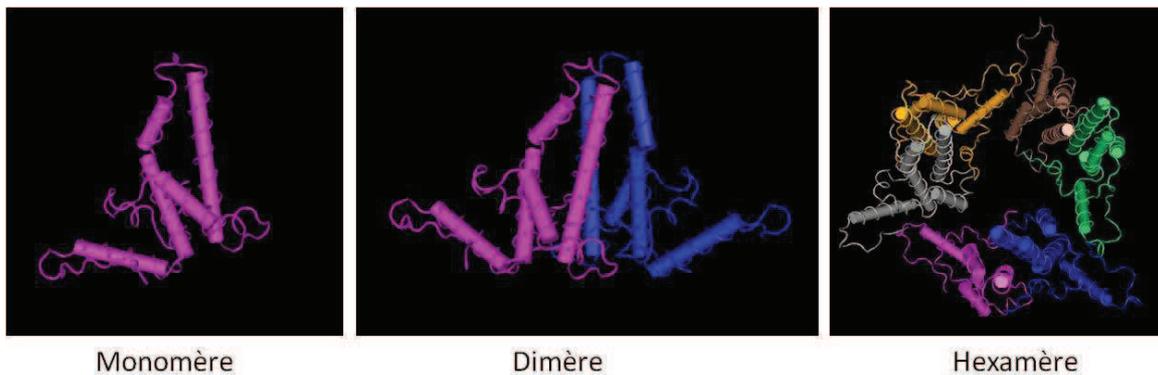
Lors de la réplication virale, il a été montré que les protéines d'enveloppe sont des éléments moteurs de la morphogénèse et du bourgeonnement des virions et des particules sous virales. Les protéines L et S sont requises pour ces étapes alors que la protéine M n'est pas nécessaire. Ces protéines sont liées entre elles par les résidus cystéines retrouvés dans le domaine S des protéines (Bruss, 2004).

#### b. Protéine de la capsid :

La protéine de capsid est appelée protéine "core", ou p21 ; elle est codée par l'ORF C et traduite de l'ARN pré génomique. L'ORF C a 212 ou 214 codons mais la traduction ne commence que sur le codon 29. C'est une protéine de 21,5 kDa de 183-185 acides aminés, selon les génotypes. Cette protéine exprimée dans le cytoplasme des cellules infectées est cependant également détectée dans leurs noyaux.

La protéine "core" est constituée de deux domaines. Le premier domaine en N terminal, comprenant les résidus 1 à 149 (ou 151 en fonction du génotype), est constitué de quatre hélices alpha disposées en structure antiparallèle formant une pointe entre les hélices trois et quatre (Figure 10). Ce domaine est impliqué dans la formation des homodimères des protéines

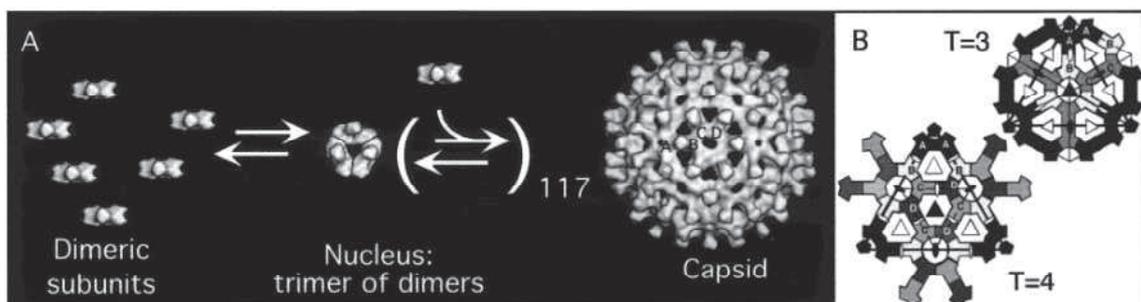
de la capside. Le deuxième domaine comprenant les 34 acides aminés situés en C terminal, est une région basique riche en arginine possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) (Eckhardt, 1991) (Kann, 1999) (Yeh, 1990) (Li, 2010), et constituant le site d'interaction de la 'core' avec l'ARN. Il est aussi nécessaire pour l'encapsidation de l'ARNpg et de la polymérase.



**Figure 10:** Structure 3D de la protéine Core (seulement 143 aa), sous forme monomère, dimère, hexamère (MMDB ID: 79809).

Lors de l'encapsidation, les monomères de "core" s'associent spontanément pour former des homodimères (Zhou, 1992). Après sécrétion, dans un environnement oxydant, ces dimères sont stabilisés par des ponts disulfures au niveau des cystéines 48 et 61. Puis, plus lentement, il y a formation de trimères de dimères (hexamère) qui vont ensuite eux-mêmes s'assembler pour former les capsides icosaédriques (Figure 11).

Par cryomicroscopie deux structures différentes ont été observées : une forme minoritaire (forme T3), composée de 180 monomères de "core" de diamètre 30 nm et une forme majoritaire, (forme T4), représentant 80 à 90 % des capsides, composée de 240 monomères de 'core' et possédant un diamètre de 36 nm (Crowther, 1994) (Figure 11).



**Figure 11:** A : Schéma de l'assemblage de la capside du VHB, B : Représentation schématique des faces icosaédriques des formes T3 et T4 (Zlotnick, 1999)

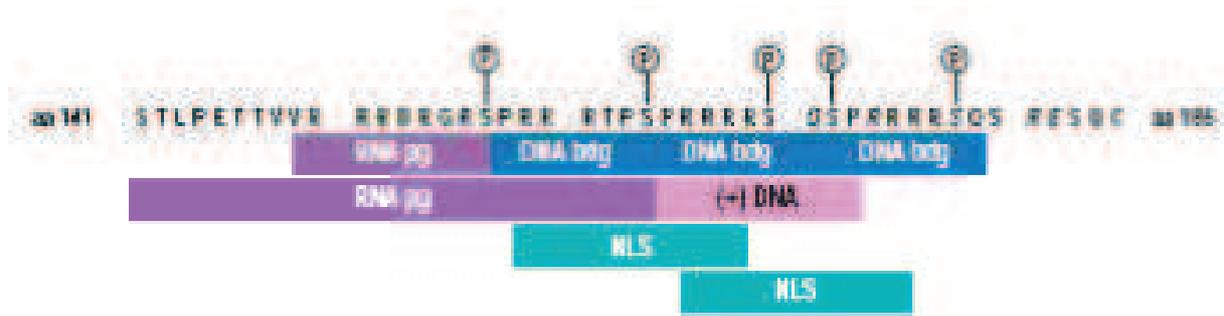
Les capsides sont donc constituées en majorité de 240 copies de la protéine “core” qui s’assemblent en formant une structure icosaédrique. Cette structure possède à sa surface des pores d’environ 1,3 et 2 nm qui permettent le passage de petites molécules comme les nucléotides nécessaires à la synthèse de l’ADN viral à partir de l’ARNpg.

La capside interagit avec les protéines de surfaces du VHB par liaison des résidus 76 à 82 de la protéine core avec le domaine préS1 de la protéine L (Bruss 1997).

Un des rôles importants de la capside est de conduire le génome viral jusqu’au noyau des hépatocytes (Rabe, 2006). Elle protège le génome dans le cytoplasme et grâce au NLS situé en C terminal des protéines de “core” l’achemine jusqu’au pore nucléaire. Elle est aussi importante pour la maturation du génome, de sa forme ARNpg en ADNrc par la polymérase virale. Cette étape se déroule à l’intérieur de la capside. La capside peut être phosphorylée sur différents résidus sérine et ces phosphorylations semblent avoir un rôle de régulation dans la libération du génome au noyau, ainsi que dans l’encapsidation et la maturation du génome. La phosphorylation de la protéine “core” est effectuée par une protéine kinase cellulaire identifiée très récemment comme la protéine kinase C (PKC) (Wittkop, 2010).

Seules des capsides matures peuvent libérer leurs génome (Rabe, 2003). La relation entre la phosphorylation de la capside et la maturation du génome n’est pas encore très claire. Cependant, il a été montré que le NLS localisé sur le domaine C terminal (Figure 12) n’est accessible aux protéines d’import qu’après phosphorylation. Celle-ci induirait un changement de conformation du C terminal qui deviendrait alors exposé à l’extérieur de la capside. Mais cela est aussi lié à la maturation du génome car les capsides possédant l’ARNpg ont un domaine C terminal localisé dans la lumière de la capside alors que les capsides matures possédant un génome ADNrc ont leur NLS exposé à l’extérieur de la capside.

Malgré tout, ce changement est aussi observé après phosphorylation des capsides recombinantes surexprimées chez *E. coli*, ce qui appuie l’hypothèse que la phosphorylation déclenche la maturation du génome. Les autres phosphorylations ont elles aussi des rôles importants. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 164 est essentielle pour l’encapsidation de l’ARNpg, et la phosphorylation de la sérine 172 est nécessaire à la synthèse du brin positif de l’ADNrc (Lan, 1999).

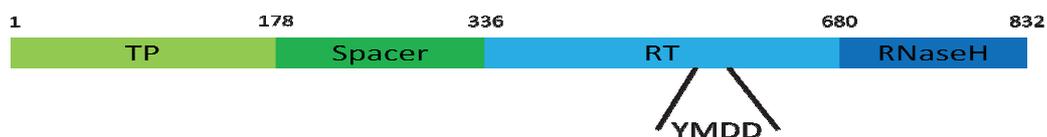


**Figure 12:** Domaine C terminal de la protéine “core”

c. La polymérase virale :

La polymérase virale ou protéine P est codée par l’ORF P et traduite à partir de l’ARNpg. C’est une protéine de 832 à 845 acides aminés selon le génotype et d’une taille de 90 kDa environ.

Cette protéine possède quatre domaines distincts (Figure 13). Le domaine N-terminal de 178 acides aminés, est le domaine TP (pour “Terminal Protein domain”). Il est impliqué dans l’encapsidation de l’ARNpg, et dans l’initiation de la synthèse du brin négatif de l’ADNrc. Cette initiation se fait au niveau du résidu tyrosine en position 63 de la polymérase qui, ainsi se retrouve liée de façon covalente à l’extrémité 5’ du brin négatif de l’ADNrc. Le deuxième domaine de la polymérase ne possède pas de fonction enzymatique, il est nommé domaine espaceur (pour “spacer”) et est localisé entre les résidus 178 et 336. Entre les résidus 336 et 680, se trouve le domaine RT (pour “Reverse Transcriptase”) qui porte l’activité ADN polymérase. Dans ce domaine se trouve le site catalytique YMDD conservé dans la séquence des transcriptases inverses de tous les hépadnavirus et certains rétrovirus. En C-terminal se trouve le domaine RNase H entre les résidus 680 et 832. Ce domaine permet la dégradation de l’ARN présent dans les hétéro duplexes ARN/ADN, intermédiaires de la réplication.



**Figure 13:** La polymérase virale et ces différents domaines

Elle possède aussi un rôle important lors de l’étape d’encapsidation en reconnaissant le signal  $\epsilon$  de l’ARNpg. Cette protéine posséderait un NLS non fonctionnel, qui ne serait actif qu’après

clivage, cependant aucune modification post-traductionnelle n'a été montrée lors de l'infection par le VHB. L'analyse des caractéristiques biochimiques de cette protéine in vivo reste difficile car elle possède des interactions avec la capsid et l'ARNpg qui servent lors de l'encapsidation de celui-ci dans la capsid.

En comparaison avec les polymérasés d'autres rétrovirus, celle-ci ne possède pas de domaine d'intégrase car l'ADN de VHB reste non intégré dans le noyau sous la forme d'un mini chromosome épisomal.

#### **4. Protéines non-structurales :**

##### **a. Protéine HBx :**

La protéine HBx est une protéine virale de 17,5 kDa constituée de 154 acides aminés. Cette protéine est exprimée très faiblement lors des hépatites aiguës et chroniques, mais induit la réponse immunitaire (Malmassari, 2005) (Hwang, 2002). Il est à noter que l'ORF X codant pour cette protéine n'est présent que chez les Orthohepadnavirus. Elle a tout d'abord été décrite comme étant nécessaire à la réplication car les génomes de WHB ne possédant pas l'ORF X ne peuvent se répliquer dans les cellules de marmottes (Zoulim, 1994). Il a aussi été montré que HBx est nécessaire pour l'initiation et le maintien de la réplication dans les cellules différenciées (Lucifora, 2011). HBx apparaît comme pouvoir jouer de nombreux rôles, comme sur la réparation de l'ADN, sur l'adhésion des cellules et sur le cycle cellulaire, mais ceux-ci ne sont pas encore bien déterminés et son rôle exact est encore controversé. Cependant, il a été montré qu'elle joue un rôle dans la réplication virale mais surtout dans la transcription des gènes viraux et cellulaires, ainsi que dans l'apoptose, dans la prolifération cellulaire et dans l'hépatocarcinogénèse. HBx est composée de trois domaines. Les domaines N et C terminaux sont des domaines hélicoïdaux encadrant le domaine central "coiled coil" impliqué dans les interactions protéiques présentes lors des différents mécanismes d'action de HBx. Le domaine N terminal possède le domaine de régulation négatif car la délétion de ce domaine engendre une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Benhenda, 2009).

b. Protéine précore et antigène HBe :

La protéine précore (p25) est une protéine de 25 kDa, traduite à partir de l'ARN préC et précurseur de l'antigène HBe. Bien que la protéine core et la protéine précore soient issues de l'ORF C, la protéine core est transcrite à partir de l'ARNpg alors que la protéine précore est codée via l'ARN préC. La protéine précore ou p25 est adressée, après sa synthèse, aux voies de sécrétion où elle va subir sa maturation en passant par plusieurs intermédiaires.

La protéine précore diffère de la protéine core (p21) par 29 acides aminés rajoutés à l'extrémité N-terminale correspondant au domaine d'adressage de la protéine pour le réticulum endoplasmique. Il permet ainsi la translocation co-translationnelle du précore. Après un premier clivage, la protéine perd les 19 premiers acides aminés du domaine Pré-C, libérant dans la lumière du RE la protéine p22, composée de 193 acides aminés. Cette protéine p22 est clivée à son tour à son extrémité C-terminale par la furine au sein des réseaux "Trans Golgi Network" (TGN) ainsi que dans les vésicules de sécrétion. Il existe deux sites de clivage à la furine, le premier sur le résidu 167, localisé du côté C-terminal de la protéine produisant la protéine p20, le second en position 154 produisant l'antigène HBe.

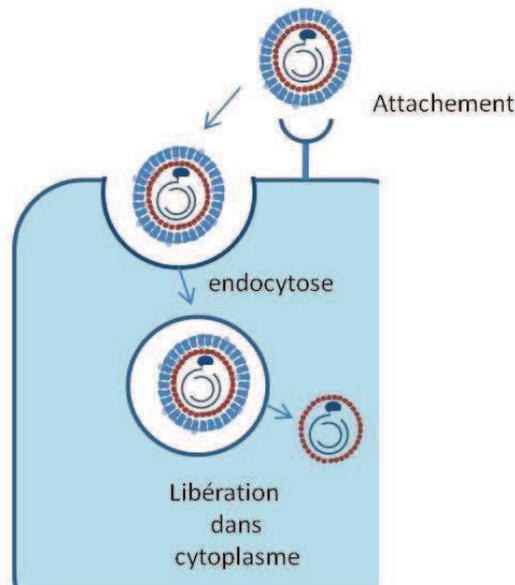
L'antigène HBe de 17 kDa est surtout exprimé en début de l'infection et pour certains variants son expression peut être inhibée. En effet, la protéine précore n'est pas indispensable au cycle viral même si elle est impliquée dans l'établissement de la persistance virale, et non pas son maintien. Le dosage de HBe est utilisé en clinique comme un marqueur de l'évolution de la maladie, car il y a une corrélation entre la charge virale et la quantité de HBe (Standring, 1988).

### III. Le cycle de réplication du VHB

#### 1. L'entrée du virus :

Le virus de l'hépatite B est un virus très spécifique de l'hôte et du type de cellules infectées. En effet il est retrouvé majoritairement dans les hépatocytes de l'homme mais il peut aussi être retrouvé plus rarement dans les lymphocytes, les glomérules rénaux, l'épithélium tubulaire et dans les cellules pancréatique (Mason, 1993).

L'entrée du virus dans la cellule n'est pas encore connue, une des hypothèse actuelle est que le virus s'attache aux cellules hépatiques, puis il y aurait endocytose et pénétration du virus dans le cytoplasme par fusion des membranes (Cooper, 2003) (Figure 14).



**Figure 14:** Entré du virus dans la cellule

Malheureusement ces étapes ne sont pas encore bien définies chez le VHB car pendant des années la production des virus *in-vitro* à été réalisée par transfection d'ADN recombinant dans des lignées hépatiques telles que les Huh7 et les HepG2. Cependant ce ne sont pas de bons modèles pour l'étude des étapes précoces car ces lignées sont résistantes à l'infection par le VHB. L'étude des étapes d'entrée a donc été effectuée *in-vitro* sur des hépatocytes primaires fraîchement préparés. Cependant la culture des hépatocytes primaires humains nécessite l'utilisation de facteurs de croissances particuliers pour maintenir la différenciation, et de plus, le taux d'infection reste très faible comparé à celui observé chez les patients.

Des travaux réalisés dans les années 1990 ont montré qu'une musaraigne des arbres, la *Tupaia Belangeri* qui est un petit mammifère proche des primates, était sensible à plusieurs virus humains : le VHB, l'herpes simplex, les rotavirus et peut-être le VHC. Des infections ont donc pu être réalisées sur des cultures primaires d'hépatocytes de *Tupaia Belangeri* (Walter, 1996). Puis en 2002, l'isolation de cellules infectables par le VHB a permis d'effectuer des tests d'infection (Gripon, 2002), ce qui a été une grande évolution dans l'étude des étapes d'entrée du virus. Ces cellules infectables sont appelées HepaRG, ce sont des hépatocytes humains dérivés d'une lignée cellulaire qui permet la réplication de VHB.

Le DHBV a aussi été beaucoup étudié en vue de comprendre, par extrapolation, le cycle de réplication du VHB. Les études sur le DHBV ont montré que ce virus se lie à la surface des hépatocytes grâce à une interaction entre la protéine de surface L et la carboxypeptidase D de la membrane plasmique. Puis il y a entrée par endocytose dans la cellule, et la capside contenant le génome est libérée par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome. Cependant, il faut souligner que le virus DHBV et le virus de l'hépatite B ne possèdent pas exactement le même cycle de réplication, et que de plus le DHBV ne possède pas la protéine d'enveloppe HBsM.

Pour le VHB, le récepteur cellulaire nécessaire à l'attachement du virus à la membrane plasmique n'est pas encore identifié mais plusieurs protéines ont été proposées. Ainsi, les récepteurs des IgA (Pontisso, 1992), et de l'interleukine-6 (Neurath, 1992), la protéine membranaire des hépatocytes HBV-BF (HBV binding factor) (De Falco, 2001), la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase, le récepteur asialoglycoprotéin et la carboxypeptidase D (Glebe, 2007) ont tous été rapportés comme interagissant avec le domaine préS1. La fibronectine (Budkowska, 1995) et les récepteurs à la transferrine ont quand à eux été suggérés comme partenaires au domaine préS2 (Franco, 1992). Enfin l'annexine V et l'apolipoprotéine H ont été proposées comme récepteurs pour la protéine S (Gong, 1999).

La forme e-préS de la protéine HBsL présente le domaine préS exposé à la surface du virion, ce qui est important pour l'entrée des virus, et plus particulièrement les résidus 3 à 77 du domaine préS1 qui sont essentiels pour l'infection. La myristylation de la glycine 2 du domaine préS1 est requise pour l'infection.

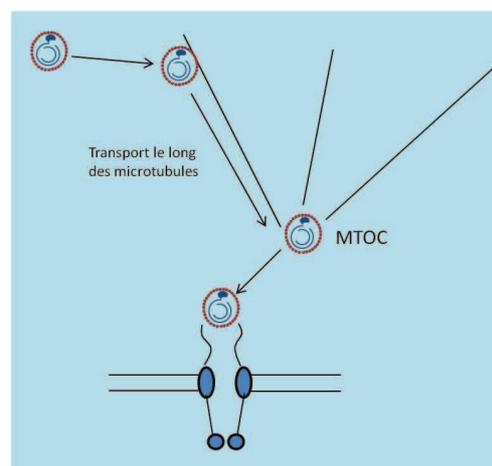
Cependant, les étapes d'entocytose et de fusion ne sont pas encore vraiment comprises. L'étape d'endocytose apparaît s'effectuer par la voie des clathrines (Macovei, 2010). Il a aussi

été montré que l'entrée du virus dans la cellule est indépendante de l'acidification des endosomes.

## **2. Migration de la capside via le réseau intracellulaire :**

Suite à la fusion des membranes virales et cellulaires, la capside est libérée dans le cytoplasme. La capside doit alors emmener le génome viral jusqu'au noyau. Pour cela, la capside nécessite un transport actif et dirigé. Dans les cellules eucaryotes, il y a deux transports actifs cytoplasmiques majoritaires : les systèmes de microfilaments, et de microtubules. Il a été montré que les microtubules jouent un rôle important dans la migration de la capside jusqu'au noyau.

Etant donné qu'il n'existe pas de lignée cellulaire permettant d'observer les premières étapes de l'infection, d'autres moyens ont été utilisés. L'une des techniques utilise la lipofection de capsides dans la cellule. Dans ce cas les protéines de surface sont remplacées par une membrane lipidique qui va pouvoir fusionner avec la membrane des cellules. Ce système montre une sécrétion de nouveaux virions similaire à celle observée *in vivo* après infection (Rabe, Glebe et al. 2006).



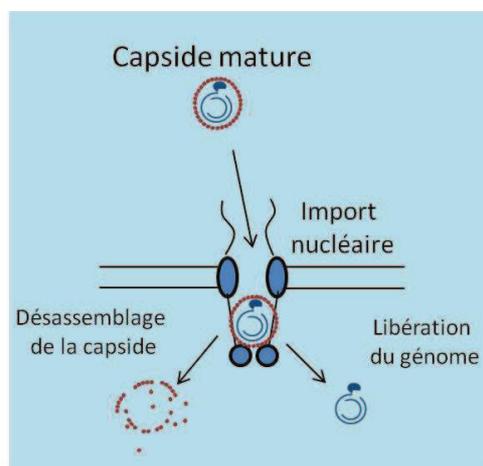
**Figure 15:** Transport intracellulaire de la capside

De plus ce système, permettant d'introduire une quantité de capsides observables au microscope, a permis d'observer les capsides au niveau de la membrane nucléaire seulement 15 minutes après l'entrée des capsides, confortant l'hypothèse d'un transport actif. De même,

il a été montré que l'addition de molécules inhibitrices des microtubules, comme le nocodazole, inhibe l'accumulation des capsides à la membrane nucléaire (Kann, 2007). Cependant, si le transport de la capside par les microtubules emmène la capside jusqu'au niveau du MTOC (Microtubule organizing center), le transport depuis le MTOC jusqu'au pore nucléaire n'est pas encore précisément défini. Notre hypothèse est que ce sont les protéines mises en jeu dans l'import nucléaire de la capside qui vont également permettre à celle-ci d'arriver jusqu'au pore nucléaire (Figure 15).

### **3. Import nucléaire et libération du génome virale :**

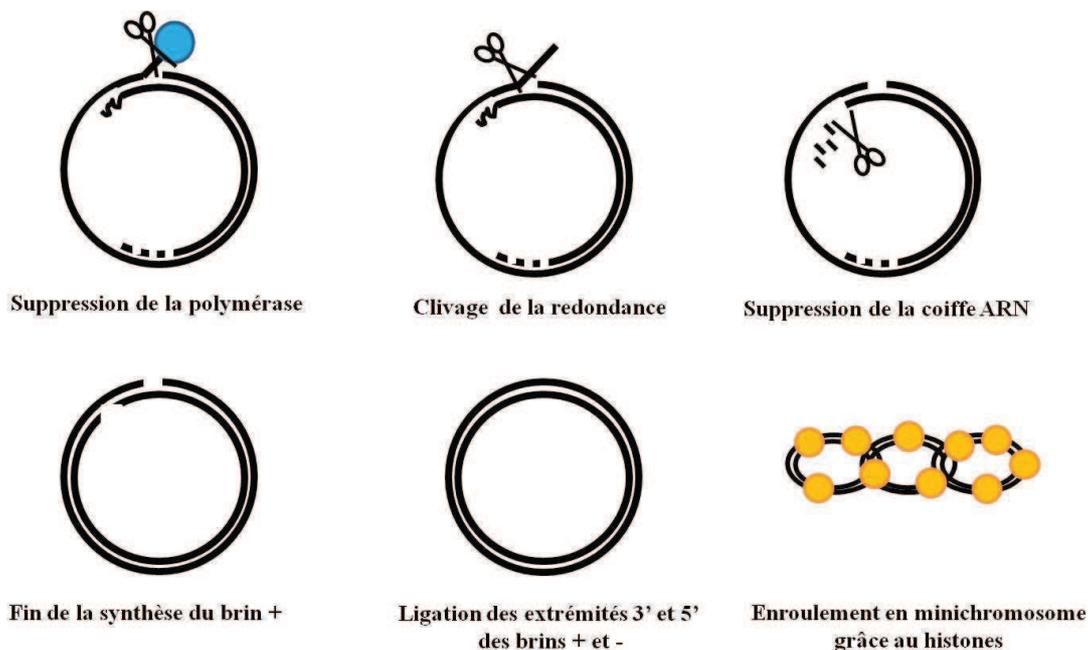
La capside doit ensuite libérer le génome viral dans le noyau. Pour cela le VHB utilise la machinerie cellulaire pour importer sa capside entière dans le noyau (Figure 16). En effet, dans le cytoplasme, la capside mature qui possède son NLS exposé à l'extérieur va être reconnue par l'importine  $\alpha$ . Cette protéine est en fait une protéine adaptatrice qui va elle-même être reconnue par l'importine  $\beta$  qui est une protéine d'import (Rabe, 2003). Ce complexe va alors pouvoir traverser le pore nucléaire pour ensuite arriver au panier nucléaire. C'est dans cette structure en panier située du côté nucléaire du pore que se trouve la nucléoporine 153, qui interagit avec le complexe d'import et arrête la capside dans le panier nucléaire (Schmitz, 2010). Cette étape d'import est dépendant de Ran GTP (Rabe, 2003). Le processus de libération du génome n'est pas encore connu précisément mais nous en reparlerons par la suite car c'est une des parties du cycle viral que nous avons analysée (voir chapitre VII).



**Figure 16:** Transport intracellulaire de la capside

#### 4. Réparation et conversion du génome viral:

Lorsque la capside arrive dans le noyau, elle libère le génome viral qui est sous forme d'ADN circulaire relâché partiellement double brin. Cet ADNrc est converti en ADN circulaire covalentement clos (ADNccc) qui sera utilisé comme matrice pour la transcription des ARN viraux. Cette conversion nécessite plusieurs étapes qui ne sont pas encore définies avec précision, ainsi le mécanisme de réparation / conversion reste flou, et les enzymes impliquées sont encore inconnues. La conversion de l'ADNrc en ADNccc nécessite certaines modifications comme (Figure 17): la suppression de la polymérase virale en 5' du brin négatif, la suppression de la coiffe ARN en 5' du brin positif, la synthèse complète du brin positif, le clivage de la redondance sur le brin négatif, la ligation des extrémités 3' et 5' du brin négatif et du brin positif, et finalement l'enroulement en minichromosome de l'ADN et son association avec des histones (Zoulim 2005).



*Figure 17:* Réparation / reconversion du génome viral

Il est difficile d'étudier ces mécanismes car l'ADNccc n'est pas présent en quantité suffisante dans les noyaux : 1 à 50 copies par cellule. L'ADNccc du DHBV est lui présent entre 5 et 50 copies par cellule. L'ADNccc est stable dans le noyau, c'est à cause de cela qu'il est difficile de soigner les patients infectés de façon chronique car il y a en effet une persistance de la forme ADNccc. Des études ont été conduites pour déterminer la demi-vie de l'ADNccc mais

les résultats qui varient entre 14 et 50 jours, restent encore très controversés. Le devenir de l'ADNccc durant la division cellulaire est aussi sujet à discussion, car il est postulé que l'ADNccc est perdu pendant la division cellulaire (Jilbert, 2008).

## **5. Transcription des ARN viraux:**

La transcription de l'ADN en ARNs viraux se déroule dans le noyau. Le brin d'ADN négatif est utilisé comme matrice pour la synthèse des transcrits viraux. Cette transcription est effectuée par l'ARN polymérase II cellulaire. Les transcrits du VHB sont classés en deux familles, les ARNs de taille génomique et les ARNs sous génomiques. Tous ces ARNs possèdent un site de polyadénylation en 3' et sont coiffés en 5'. Le site de polyadénylation est commun pour les ARNs viraux de VHB, ce qui signifie que leur extrémité 3' est identique. En revanche, chaque ARN possède son propre site d'initiation, ce qui les différencie au niveau de l'extrémité 5' (Figure 6). Il existe deux ARNs de taille supérieure au génome : 3,5 kb, pour l'ARN pré-génomique et l'ARN préC. Ces deux ARNs ont une taille supérieure au génome car on retrouve la présence de la redondance en 3' et en 5'. De plus, ces deux ARNs sont polycistroniques. En effet, l'ARN pré-génomique, qui sert de matrice lors de la réplication, permet l'expression de la protéine core (p21) et de la polymérase virale. L'ARN préC ne permet l'expression que de la protéine précore qui est le précurseur de la protéine HBe.

Les ARNs sous génomiques sont de trois tailles différentes : 0,8 kb, 2,1 kb et 2,4 kb. L'ARN de 0,8 kb permet la production de la protéine HBx. Les autres ARNs servent pour les protéines de surface S, M et L.

La transcription se fait sous le contrôle de quatre promoteurs, eux même régulés par deux enhanceurs (voir chapitre II.2).

## **6. Transport des ARN viraux dans le cytoplasme:**

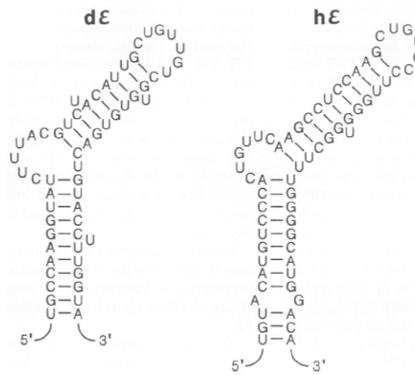
Les ARNs viraux sont synthétisés dans le noyau puis transportés dans le cytoplasme pour leur traduction en protéines. Dans les cellules eucaryotes, les ARNs cellulaires peuvent subir un épissage avant le transport vers le cytoplasme. Ces deux événements sont couplés dans la cellule. Cependant, la majorité des ARNs viraux ne subissent pas d'épissage. Des ARNs épissés ont été décrits, mais leur rôle reste incertain. Les ARNs épissés doivent donc être exportés vers

le cytoplasme par un autre moyen de transport. Bien que les ARNs du VHB possèdent une variété de sites donneurs et accepteurs pour l'épissage, la majorité des ARN du VHB échappe à ce mécanisme. L'export nécessite la séquence PRE (Post-transcriptional Regulatory Element) (Huang, 1995). Ce PRE est présent sur tous les ARN viraux et localisé à environ 750 nucléotides de l'extrémité 3', et chevauche la séquence de l'enhancer I. Le PRE possède une structure secondaire constituée de deux tige boucles qui facilitent l'export nucléaire (Smith, 1998). En effet ce domaine PRE recrute la protéine Crm1 qui va avec la molécule Ran GTP effectuer l'export jusqu'au cytoplasme. Certaines protéines cellulaires se lient à la séquence PRE afin de réguler l'export des ARN viraux. On peut citer par exemple la protéine glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) qui diminue l'export des ARNs de 2,1 kb (Huang, 1996). De même, la protéine cellulaire PTB (Polypyrimidine Tract Binding) peut, elle aussi, se lier à la séquence PRE (Huang, 2011).

## **7. Formation des capsides et encapsidation des ARNpg:**

La formation des capsides est la première étape de la morphogénèse. Cette étape est bien sûr dépendante de la quantité de protéine 'core' produite. Elle est aussi fortement liée à l'étape d'encapsidation de l'ARNpg qui est amorcée par la liaison de la polymérase virale sur le signal d'encapsidation  $\epsilon$  porté par l'ARNpg.

Actuellement ce phénomène est décrit comme suit : la polymérase interagit avec l'ARNpg grâce au signal d'encapsidation  $\epsilon$ . C'est une séquence de 65 nucléotides organisée en une structure stable en épingle à cheveux, constituée d'une boucle apicale et de deux tiges séparées par une boucle asymétrique interne (Figure 18) (Pollack, 1994). Chez le DHBV, les protéines chaperonnes Hsc70 et Hsp90 présentes dans la nucléocapside induisent un changement de conformation de la polymérase favorisant son interaction avec le signal d'encapsidation  $\epsilon$  (Stahl, 2007).



**Figure 18:** Structure ARN des DHBV  $\epsilon$  et du VHB  $\epsilon$  (Pollack, 1994)

Cette interaction est nécessaire afin de stopper la traduction de l'ARNpg (Ryu, 2008). Puis l'ARNpg lié à la polymérase va recruter les protéines Core pour former la capsid. La protéine core interagit avec la protéine Hsp90, pour faciliter le recrutement de la capsid (Shim, 2010). Les capsides vont ensuite se former de manière spontanée en créant des trimères de dimère de protéine core qui vont ensuite former des capsides entières.

## 8. Rétro-transcription de l'ARNpg:

Lors de cette rétro-transcription, l'ARNpg sert de matrice pour la production du brin d'ADN négatif. Ce mécanisme est effectué par la polymérase virale qui va transcrire l'ARNpg en ADNrc (Beck, 2007).

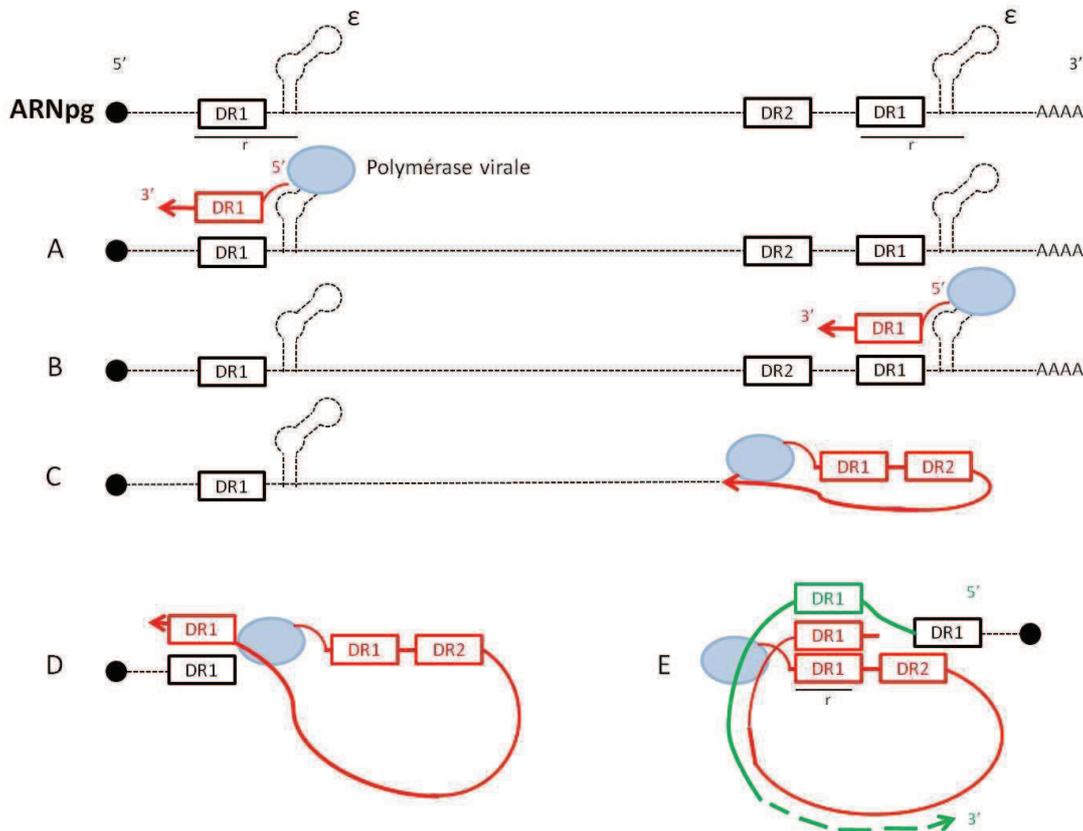
### a. Initiation et synthèse du brin long d'ADN négatif

Sur l'ARNpg, la séquence  $\epsilon$ , qui sert lors de l'encapsidation de celui-ci, constitue aussi le site d'initiation de la réplication. En effet la protéine Pol des Hepadnavirus utilise la séquence 5'-UUCA-3', présente dans la boucle asymétrique interne du signal d'encapsidation  $\epsilon$ , comme matrice pour la synthèse de l'amorce. Cette étape est liée à l'étape d'encapsidation et assistée par les protéines chaperonnes. Cette initiation se réalise au niveau du groupement hydroxyle de la tyrosine 63 située dans le domaine TP de la polymérase et qui forme une liaison covalente avec la guanine de l'amorce. Cette liaison permet l'amorçage de la synthèse du brin d'ADN négatif (Beck, 2007).

Le complexe polymérase-amorce prend place à côté de l'extrémité 5' de l'ARNpg, après peu de temps la synthèse est stoppée. Cependant, grâce à la redondance présente aux deux

extrémités de l'ARNpg, la polymérase est capable d'effectuer un saut de matrice intramoléculaire par translocation de l'amorce à l'extrémité 3' de l'ARNpg (Liu, 2004).

En parallèle, l'ARNpg matrice est dégradé au fur et à mesure de la synthèse du brin d'ADN négatif grâce au domaine RNase H de la polymérase virale. En fin de synthèse, le génome est sous forme ADN négatif simple brin (ADNss) (Figure 19).



**Figure 19:** Réplication du génome du VHB.

L'ARNpg est en pointillé, ainsi que les signaux d'encapsidation  $\epsilon$ , la coiffe est représentée par un cercle noir. A : Initiation de la transcription inverse sur le signal  $\epsilon$  en 5' de l'ARNpg, synthèse du brin - (en rouge). B : Translocation de l'amorce et de la polymérase en 3' de l'ARNpg. C : Elongation du brin - et dégradation de l'ARNpg. D : Terminaison de la synthèse du brin -. E : Translocation de l'amorce ARN en 5' du brin -, initiation de la synthèse du brin + (en vert) et élongation du brin + inachevé.

### b. Synthèse du brin court d'ADN positif

A la fin de la synthèse du brin d'ADN négatif, il reste un vestige de l'ARNpg qui n'a pas pu être dégradé et qui reste hybridé à l'extrémité 3' du brin négatif (Figure 19). Cet ARN va servir d'amorce pour la synthèse du brin positif. Cette amorce est transloquée au niveau de la séquence DR2 situé à l'extrémité 5' du brin négatif. Puis la polymérase virale va alors allonger l'amorce en utilisant le brin négatif comme matrice et commencer ainsi la synthèse du brin court d'ADN positif (Lee, 2004).

A la fin de la matrice, à l'extrémité 5' du brin négatif, il y a un saut de matrice intramoléculaire du brin positif en cours de synthèse sur l'extrémité 3' du brin négatif. La translocation du brin positif néo-synthétisé est assurée par la séquence redondante (r) présente aux deux extrémités du brin négatif. Ce saut est responsable de la circularisation du génome. La protéine Pol, polymérise ensuite le brin d'ADN positif, mais cette synthèse reste inachevée (Beck, 2007). En effet, le brin d'ADN positif est également appelé le brin court car la polymérisation s'arrête vers les 2400 nucléotides. Cet arrêt de synthèse serait dû au fait que la polymérase n'aurait plus accès aux désoxyribo-nucléotides triphosphates (dNTPs) lorsque la capsidie devient enveloppée. La capsidie mature renferme donc un ADN partiellement double brin sous la forme circulaire relâchée (ADNrc).

## **9. Bourgeoisement des particules virales:**

Lors de la sortie des virus, la capsidie mature doit acquérir l'enveloppe composée des trois protéines de surface S, M et L. Il est admis que cette étape s'effectue au niveau de membranes intracellulaires qui sont probablement post-RE et pré-golgi (Huovila, 1992). La capsidie interagit avec les protéines de surface et plus particulièrement avec la protéine L (domaine préS1 et préS2), et plus particulièrement 13 résidus situés sur le domaine C-terminal de préS1. C'est pour cette raison que la délétion de cette protéine inhibe la sécrétion de nouveaux virions (Bruss, 1997). En revanche, la protéine M n'est pas nécessaire à l'acquisition de l'enveloppe (Fernholz, 1991). La protéine S est la protéine majoritaire, elle possède de nombreux résidus cystéines qui sont impliqués dans l'homo-dimérisation et l'hétéro-dimérisation des protéines S, M et L. La mutation de certaines cystéines inhibe la sécrétion des particules virales (Mangold, 1993).

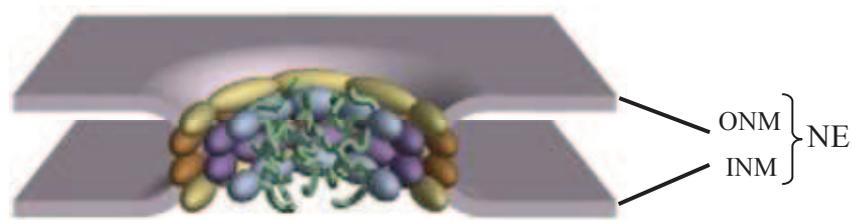
Une fois enveloppés, les virions doivent être sécrétés. Cette étape qui n'a été comprise que récemment se fait par bourgeoisement, cependant elle reste encore controversée. En effet, il a été mis en évidence que la protéine core et la protéine de surface L interagissent avec la  $\gamma$ 2-adaptin (Hartmann-Stuhler, 2001). Cette protéine a un rôle dans l'adressage des protéines aux corps Multi-Vésiculaires Endosomaux (MVB pour MultiVesicular Bodies). Il s'agit de vésicules intraluminales qui sont adressées à la voie de dégradation ou aux lysosomes, ou encore au milieu extracellulaire. Ces vésicules bourgeoisent à la surface des cellules grâce au complexe ESCRT III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Lambert, 2007). Cependant, il a été montré que la formation des particules virales vides ne s'effectue pas dans le même compartiment. En effet, ces particules se forment dans les ERGIC (ER-Golgi

Intermediate Compartment) qui se trouvent aussi dans la région post-RE et pré-golgi. Il a été vu au microscope que les particules vides observées dérivent en fait des particules filamenteuses (Patient, 2007).

## IV. Le pore nucléaire

### 1. Morphologie du pore nucléaire :

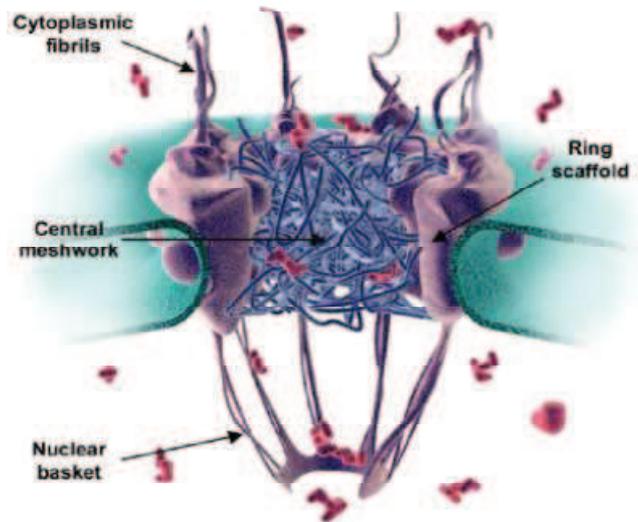
Les cellules eucaryotes sont caractérisées par la compartimentation du matériel génétique dans le noyau. Le noyau est délimité par une double membrane appelée l'enveloppe nucléaire (NE pour nuclear envelope). Cette enveloppe nucléaire contient la chromatine, elle forme une barrière qui sépare la transcription de la traduction, et sert aussi de site d'ancrage à de nombreuses structures cytoplasmiques et nucléaires comme la lamine. L'enveloppe nucléaire est constituée d'une double membrane contenant la membrane externe (ONM pour outer nuclear membrane), qui est contigüe au réticulum endoplasmique, et la membrane interne (INM pour inner nuclear membrane) (Fernandez-Martinez, 2009). La seule connexion entre ces deux membranes est le complexe du pore nucléaire (NPC pour nuclear pore complex) où les deux membranes fusionnent (Figure 20).



**Figure 20:** Le NPC encastré dans l'enveloppe nucléaire (Fernandez-Martinez, 2009)

Dans les cellules qui ne sont pas en division, le NPC est le seul passage entre le cytoplasme et le noyau. C'est un complexe multi-protéique qui forme un passage sélectif entre les deux membranes du NE. Le NPC qui a été découvert dans les années 1950, a été étudié seulement récemment car il a fallu attendre l'apparition de techniques comme la cryo electron tomographie et la microscopie de force atomique pour réussir à élucider sa structure. En effet, ces techniques ont permis l'obtention d'images détaillées y compris en structure 3D du NPC. Il a ainsi été montré que le nombre de pores nucléaires par noyau varie en fonction de l'organisme étudié, du type cellulaire considéré, de la taille de la cellule, mais aussi de son activité proliférative et synthétique (Maul 1977). Les cellules de mammifères possédaient entre 3000 et 5000 NPC par cellule (Maul 1977), alors que les levures n'en possèdent qu'environ 200 par cellule (Rout, 1993).

Le NPC est une structure protéique de 60-125 MDa chez les mammifères et de 40-60 MDa chez les levures. C'est une structure octogonale de 120 nm de large sur 200 nm de long, ce qui correspond à une taille d'environ 30 fois celle d'un ribosome. Le NPC est composé d'environ 30 nucléoporines différentes qui sont présentes en plusieurs copies (entre 8 et 56), l'assemblage final du NPC comportant 500 à 1000 protéines (D'Angelo, 2008).



*Figure 21:* Structure en 3D du NPC (Patel, 2007)

Ces nucléoporines sont positionnées de manière à former un corps central cylindrique formant un tunnel d'environ 9 nm de diamètre et de 45 nm de long. Ce corps central est encastré dans l'enveloppe nucléaire (Keminer, 1999). Le NPC est aussi constitué d'extensions cytoplasmiques et nucléaires, qui forment des filaments dans le cytosol et le panier nucléaire dans le noyau. Du côté nucléaire ces filaments se rejoignent au niveau de l'anneau distal, pour former une structure en panier (Figure 21).

## **2. Les nucléoporines:**

Les protéines présentes dans le complexe du pore nucléaire sont nommées les nucléoporines. Chez les vertébrés, le NPC est donc constitué d'environ 30 nucléoporines différentes qui sont présentes en plusieurs copies et forment la symétrie octogonale du NPC (Figure 22)

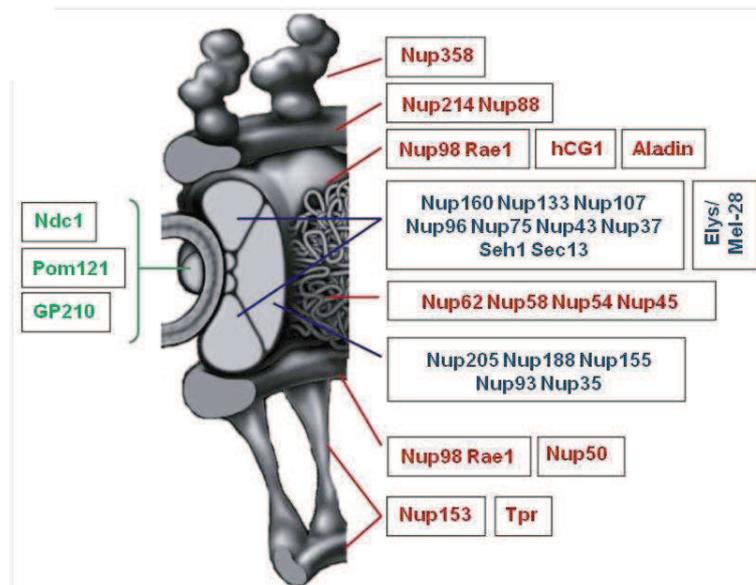
(Cronshaw, 2002). Ces nucléoporines varient énormément en taille, et elles sont nommées en fonction de leurs masses moléculaires.

<b>Structures du NPC</b>	<b>nucléoporines</b>
<b>Protéines transmembranaires</b>	GP 210 Ndc 1 Pom 121
<b>Anneaux centrale</b>	Nup 205 Nup 188 Nup 155 Nup 93 Nup 35
<b>Anneaux périphérique</b>	Nup 133 Nup 107 Nup 43 Nup 37 Nup 160 Nup 96 Nup 85 Sec 13 Sch1 ELYS
<b>Fibrilles cytoplasmiques</b>	Nup358 Nup214 Nup 88 Nup 98 Rae1
<b>Fibrilles nucléaires</b>	Nup 153 Nup 50 TPR Nup 98 Rae1
<b>Central meshwork</b>	Nup 62 Nup 58 Nup 54 Nup 45

**Figure 22:** Tableau récapitulatif des différentes nucléoporines et leurs localisations

Récemment l'analyse structurale des nucléoporines a permis de les classer en trois groupes (Figure 23) (Macara, 2001). Le premier contient les nucléoporines qui servent à l'ancrage du

NPC dans l'enveloppe nucléaire, ces protéines possèdent des domaines trans-membranaires. Les nucléoporines du second groupe sont localisées au centre du NPC et servent à lui procurer sa structure. Elles sont par ailleurs liées aux protéines du premier groupe et possèdent deux repliements spécifiques que sont les structures en feuillet bêta et en hélice alpha. Le troisième groupe est celui composé des nucléoporines localisées sur la périphérie du NPC, elles correspondent à un tiers de la masse du pore nucléaire. Ces protéines possèdent des séquences répétées de résidus phénylalanine et glycine que l'on nomme 'FG repeat'. Ces domaines sont localisés sur la partie mobile de ces molécules et sont séparés par des régions polaires de longueur variable. Le rôle de ces nucléoporines n'est pas encore entièrement compris mais certaines semblent importantes dans le transport intranucléaire alors que d'autres ont un rôle dans la transcription ou dans l'apoptose.



**Figure 23:** Prédiction de la localisation des différentes nucléoporines (D'Angelo, 2008)

Il existe différents types de 'FG repeat' qui sont définis par leur contenu en acides aminés : FxFG, GLFG, SAFG, PSFG ou SAFGxPSFG. Leur capacité à interagir ensemble semble plus être corrélée à la composition en acides aminés présents entre les motifs FG qu'aux motifs FG eux même (Krishnan, 2008).

### **3. Fonction du pore nucléaire:**

Le pore nucléaire est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires et possède ainsi de multiples fonctions (Tran, 2006). Le NPC est impliqué dans l'organisation de la chromatine, certaines nucléoporines étant utilisées comme sites d'ancrage à la lamine qui va procurer la structure au noyau (Hetzer, 2005). De plus le NPC entre en jeu dans la régulation de l'expression des gènes, ainsi que dans la ségrégation des chromosomes durant la mitose. Enfin, le NPC est aussi impliqué durant l'apoptose, certaines nucléoporines étant des substrats pour les caspases qui sont les protéines médiatrices de ce mécanisme (Ferrando-May, 2001). Le pore nucléaire étant le seul passage entre le cytoplasme et le noyau, une de ses fonctions majeures est d'assurer les échanges entre ces deux compartiments.

## V. Le transport nucléaire

Il existe deux grands types de transports nucléaires différents : le transport passif et le transport actif.

### 1. Le transport passif:

Le transport passif, permet la diffusion libre des molécules de petites tailles possédant un diamètre inférieur à 10 nm (< 20-40 kDa), comme les ions ou des petites protéines (Macara, 2001). Ce phénomène a lieu grâce aux gradients de concentrations de chaque coté de la membrane nucléaire. De plus la diffusion passive ne requiert pas d'interaction spécifique entre les molécules et les composants du NPC.

### 2. Le transport actif:

Le transport actif assure le passage de macromolécules qui ne peuvent traverser le NPC par diffusion. Ce transport nécessite la participation de récepteurs qui vont interagir avec les protéines du NPC et vont reconnaître des signaux de localisation. Le transport actif est donc hautement sélectif et nécessite de l'énergie apportée par le système Ran.

#### a. Les signaux de localisation

L'idée de signaux spécifiques pour le transport de macromolécules dans le noyau a été émise dans les années 1980 (Goldfarb, 1986). En effet, certaines protéines ne pouvant accéder au noyau par diffusion car possédant une taille trop importante, étaient capables de s'accumuler dans le noyau. Il est vrai que toutes les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme mais certaines d'entre elles doivent être importées dans le noyau pour effectuer leur rôle, comme par exemple les facteurs de transcription. A l'opposé, d'autres molécules doivent être exportées vers le cytoplasme. On distingue donc des signaux d'import nucléaire, les NLS pour "nuclear localisation signal" et des signaux d'export nucléaire, les NES pour "nuclear export signal" (Figure 24).

Type	Signal	Sequence
NLS	monopartite	PKKKRKV
	bipartite	KRPAATKKAGQAKKKKLD
	BIB	Domaine riche en arginine et lysine
NLS/NES	M9	GNYNNQNQSSNFGPMKGGNFG GRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGG YGGG
	KNS de hnRNPK	NES: 338-361 et NLS: 323-361
	HNS de HuR	Domaine riche en glycine et sérine
NES	Rev de HIV-1	LQLPPLERLTL
	PKI	LALKLAGLDL

*Figure 24:* Les différents signaux d'adressage

La première séquence identifiée pour l'import nucléaire est la séquence du NLS du Simian Virus 40 (SV40) située sur l'antigène T du virus (Kalderon, 1984). Cette séquence d'acides aminés basiques est constituée essentiellement de lysine et d'arginine (PKKKRKV). Ce NLS est désigné comme monopartite, en opposition au NLS bipartite comme celui de la nucléoplasmine. Les NLS bipartites sont constitués de deux séquences d'acides aminés basiques séparés par une dizaine de résidus : KRPAATKKAGQAKKKKLD (Robbins, 1991). Ces deux types de NLS sont dit 'classiques' et sont répandus dans de nombreuses protéines. Il n'existe cependant pas de séquence consensus pour les autres NLS et la définition fonctionnelle reste le meilleur moyen de les définir (Christophe, 2000). Une autre séquence basique qui est retrouvée sur des protéines importées est appelé BIB pour "β like import recepateur binding" (Muhlhauser, 2001).

Cependant, il existe d'autres types de NLS comme le domaine M9 de la protéine hnRNP A1 qui lui est composé de 38 acides aminés riches en glycine et en asparagine (Siomi, 1995). La protéine hnRNP est connue pour se déplacer continuellement entre le noyau et le cytoplasme car le domaine M9 présente un rôle d'import mais aussi un rôle d'export (Michael, 1995).

Parmi les séquences désignées permettant l'import et l'export, le domaine KNS pour "hnRNP K Nucleocytoplasmic Shuttling" ne ressemble ni à un NLS classique, ni à un domaine M9 (Michael, 1997). Il y a aussi le domaine HNS pour "HuR nucleocytoplasmic Shuttling" qui est une séquence riche en glycine et en sérine et qui ressemble au domaine M9 au niveau de sa séquence en acides aminés (Fan, 1998).

Il existe aussi différentes séquences de NES, mais la plus commune est constituée d'un motif hydrophobe riche en leucine et qui possède une taille d'environ dix acides aminés. Cette séquence a été découverte simultanément dans la protéine inhibitrice de la protéine kinase A (PKI) : LALKLAGLDL et dans la protéine virale Rev de HIV-1 : LQLPPLERLTL (Wen, 1995). Puis la même observation a été faite dans de nombreuses autres protéines. Cependant comme pour le NLS, la meilleure définition d'un NES reste son état fonctionnel.

#### b. Les différents transporteurs

Il a été montré dans les années 1980 que les signaux d'import ou d'export nucléaire sont reconnus par des transporteurs qui effectuent ensuite le transport. En effet, la microinjection de protéines contenant un NLS dans le cytoplasme d'ovocytes de xénopes aboutit à leur localisation nucléaire. Cependant cette localisation est saturable par un excès de peptides NLS, ce qui suggère qu'un récepteur soluble est requis pour l'import nucléaire in vivo.

#### Les karyophérines bêta :

C'est une famille de protéines contenant les transporteurs les plus souvent étudiés. Ils sont définis comme importines lorsqu'ils sont impliqués dans l'import et exportines lorsqu'ils sont impliqués dans l'export (Figure 25).

Une des caractéristiques des protéines de la famille des karyophérines bêta est leur capacité à interagir avec les nucléoporines du pore nucléaire et à former des complexes avec les protéines du système Ran.

Chez la levure on compte quatorze membres dans cette famille, dont dix importines et quatre exportines. Chez les mammifères, toutes les protéines de cette famille n'ont pas encore été identifiées mais il semblerait qu'il y ait deux fois plus de protéines différentes que chez les levures.

Dans l'import, les plus connues sont l'importine bêta, la transportine 1, la transportine SR et les importines 5 et 7. Pour l'export, les Karyophérines Bêta les plus connues sont Crm1, CAS, l'exportine t et l'exportine 4. Cependant, il existe aussi certaines de ces protéines qui sont capables d'effectuer aussi bien l'import que l'export telles l'exportine 5 et l'importine 13 (Gorlich, 1999).

Transport receptor (accession number) [alternative names]	Function
Importin $\beta$ (I52907) [p97, PTAC97, karyopherin $\beta$ 1]	Import of ribosomal proteins, HIV Rev, HIV Tat, HTLV Rex
Imp $\beta$ /Imp $\alpha$ complexes	Import of proteins containing a "classical" NLS.3 typical examples for such NLSs: SV40 T antigen (PKKKRKVE), nucleoplasmin (KRPAATKKAGQAKKKKLD) c-myc (PAAKRVKLD)
Imp $\beta$ /snurportin 1 complex	Import of m <sup>7</sup> G capped U snRNPs
Imp $\beta$ /XRIP $\alpha$ complex	Import of RPA
Imp $\beta$ /Imp7 heterodimer	Import of histone H1
Imp $\beta$ /RanBP8 heterodimer	Unknown
Transportin 1 (Q92973) [Importin $\beta$ 2, karyopherin $\beta$ 2]	Import of hnRNP proteins A1 and F, probably also B, D and E, import of ribosomal proteins
Transportin 2 (AF019039)	Unknown
Importin 5 (Y08890) [RanBP5, karyopherin $\beta$ 3]	Import of ribosomal proteins
RanBP6 (AF039023)	Unknown
Importin 7 (AF098799) [RanBP7]	Import of ribosomal proteins
RanBP8 (U77497)	Unknown
HsMtr10a (AJ133749)	Unknown
Transportin SR (AF145029)	Import of proteins with SR domains
HsMtr10b (BAA34444)	Unknown
CRM1 (Y08614)	Export of proteins containing leucine-rich NESs, m <sup>7</sup> G capped UsnRNAs, snurportin 1
CAS (P55060)	Export of importin $\alpha$ s
Exportin t (AF039022)	Export of tRNA

Figure 25: Membres de la famille des Karyophérine  $\beta$  (Gorlich, 1999)

### Les Importines :

Ce sont des protéines d'une masse moléculaire comprise entre 90 et 130 kDa, qui possèdent un site de liaison au RAN GTP dans leur domaine N-terminal et un domaine de liaison avec la molécule à transporter, c'est-à-dire le cargo, en C-terminal. De plus, elles possèdent aussi des domaines d'interaction aux nucléoporines du NPC (Bednenko, 2003).

La plus importante et la mieux caractérisée est l'importine bêta (voir chapitre VI.2.). Elle possède un rôle dans l'import des protéines dans le noyau par association directe ou via l'utilisation d'un adaptateur. Parmi les protéines importées directement, il y a les protéines ribosomales et les protéines virales VIH Rev et VIH Tat qui interagissent directement via leur domaine BIB pour " $\beta$  like import receptor binding" (Palmeri, 1999).

L'utilisation d'un adaptateur aboutit à la formation d'un complexe hétérodimérique. Les protéines adaptatrices s'associent à l'importine  $\beta$  grâce à leurs domaines IBB pour "Importin  $\beta$  binding domain" (Jakel, 1998). Les adaptateurs les plus connus sont l'importine  $\alpha$  qui

possède un rôle important dans l'import des protéines possédant un NLS classique, l'importine 7 pour le transport des histones, ou encore la snuportine 1. Ces protéines ne possèdent aucun domaine d'interaction avec les protéines du NPC car elles sont incapables de transporter leur cargo par elles même et nécessitent obligatoirement une association avec l'importine  $\beta$ .

Une autre importine bien connue est la transportine 1 encore connue sous le nom de karyophérine  $\beta 2$  (Siomi, 1997). Cette protéine de 101 kDa, reconnaît les protéines possédant un NLS de type M9. Elle est constituée d'une structure en hélice  $\alpha$  comprenant 18 domaines appelés domaines 'HEAT' qui correspondent à des motifs Armadillo. Chaque motif Armadillo comprend deux hélices  $\alpha$  formant une structure en épingle à cheveux liée aux autres motifs par de petites hélices. Cette protéine interagit en N-terminal avec Ran et en C-terminal avec les domaines M9 .

Quant aux autres protéines d'import, on retrouve l'importine 5 (RanBP5 ou karyophérine  $\beta 3$ ) et l'importine 7 (RanBP7) qui effectuent spécifiquement l'import des protéines ribosomales (Jakel and Gorlich 1998). Il y a aussi la transportine SR qui effectue l'import de protéines contenant un domaine riche en arginine et en sérine (domaine SR), retrouvés sur les facteurs d'épissages (Steggerda, 2002).

#### Les exportines :

Les exportines reconnaissent les signaux d'export et leur interaction avec RanGTP est nécessaire pour l'export nucléaire.

Une des exportines les plus connues est l'exportine 1 ou Crm1 pour "chromosome region maintenance" (Fornerod, 2002). Crm1 se lie directement sur les NES riches en leucine et son interaction est renforcée en présence de RanGTP. De plus, cette protéine utilise les cofacteurs RanBP3, Nxt1 et RanBP1 qui vont faciliter l'export des protéines NES dans le cytoplasme.

La deuxième exportine très étudiée est la protéine CAS pour "cellular apoptosis susceptibility protein". Elle possède un rôle important dans le recyclage de l'importine  $\alpha$ , car cette protéine après import s'accumule dans le noyau (Kutay, 1997). CAS s'associe aux Importine  $\alpha$  et aux RanGTP pour former un complexe trimérique qui est exporté dans le cytoplasme. Là, l'hydrolyse de RanGTP en RanGDP permet la dissociation du complexe. Les Importines  $\alpha$  ne possèdent pas de domaine NES mais se lient à la protéine CAS par un large domaine de 137 résidus.

L'exportine 4 est responsable de l'export nucléaire du facteur d'initiation de la traduction eIF5A (Lipowsky, 2000). L'exportine 4 ne possède pas d'homologue chez la levure et c'est la protéine qui est la plus distante de la famille des Karyophérine  $\beta$ . Son homologie est située en N-terminal au sein de la région qui interagit avec RanGTP.

Pour le transport des ARNt, il existe un transporteur spécifique qui est nommé l'exportine-t. Elle interagit directement avec les ARNt et avec RanGTP ce qui permet l'export des ARN grâce à la formation d'un complexe trimérique. L'exportine-t reconnaît les formes d'ARN mature et non mature mais se lie plus facilement aux formes matures d'ARN qui ont subi des modifications sur certains nucléotides et dont les extrémités 3' et 5' ont été modifiées (Kutay, 1998).

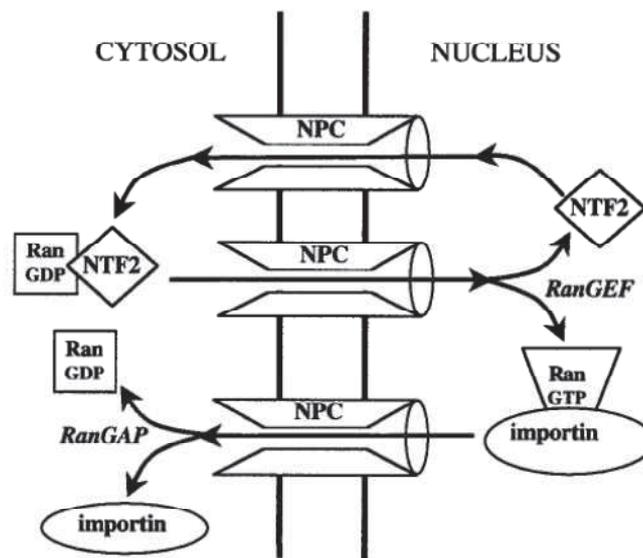
#### Les autres transporteurs :

Il existe d'autres transporteurs qui effectuent l'import et l'export nucléaire de molécules. Une autre protéine qui a été étudiée est la Calreticuline. C'est un récepteur d'export pour les protéines possédant un NES et pour le récepteur aux glucocorticoïdes. En effet le récepteur aux glucocorticoïdes est cytoplasmique en absence de son ligand, le cortisol. Mais lorsqu'il y a association du ligand à son récepteur, cela provoque l'exposition de deux NLS classiques qui vont permettre son import dans le noyau. La Calreticuline va permettre ensuite son retour dans le cytoplasme. Cette voie d'export ne nécessite pas d'interaction avec RanGTP, mais la présence de calcium est requise (Holaska, 2001).

L'export des ARNs nécessite des facteurs différents qui doivent être régulés et spécifiques car les ARNs ne doivent être exportés qu'après l'épissage. La protéine TAP aussi appelé NXF1 est un des transporteurs exportant les ARNs dans le cytoplasme.

### c. Le cycle Ran GTP/GDP

La protéine Ran (Ras-related Nuclear protein) est une petite protéine de 25 kDa qui est indispensable au transport nucléaire des macromolécules. C'est un membre de la famille des protéines Ras qui sont des petites GTPases. Cette famille contient plus d'une centaine de membres séparés en huit grands groupes qui partagent tous le domaine G, essentiel aux GTPases.



**Figure 26:** Cycle de Ran (Macara, 2001). Le transporteur NTF2 se lie spécifiquement au RanGDP cytoplasmique et l'emmène dans le noyau, là RanGEF catalyse l'échange du GDP en GTP sur Ran, ce qui détache NTF2 de Ran. Puis NTF2 retrouve seul dans le cytoplasme pour récupérer une autre molécule de RanGDP. Le RanGTP s'associe aux transporteurs (importines ou exportines) et traverse le NPC jusqu'au cytoplasme où le RanGTP est hydrolysé en RanGDP par RanGAP ce qui va libérer le Ran des transporteurs.

Ran est une protéine qui se lie au GTP, et comme toutes les protéines G, Ran alterne une forme liée au GTP avec une forme liée au GDP grâce à l'hydrolyse du GTP et à l'échange d'un nucléotide. Dans le noyau, Ran GDP est converti en Ran GTP par échange du GDP contre du GTP sous l'action de la protéine RCC1 pour "Regulator of chromosome condensation 1" (Figure 26). RCC1 est également appelée RanGEF (Ran Guanine nucleotide exchange factor). RCC1 est importée dans le noyau, via le complexe Importine  $\alpha/\beta$ , où elle se lie à la chromatine (Kohler, 1999). L'activité GTPase de Ran est, quand à elle, localisée dans le cytoplasme où elle est activée par RanGAP - "Ran guanine activating protein"- et est stimulée par deux cofacteurs cytoplasmiques. Ces deux cofacteurs sont les nucléoporines RanBP1 et RanBP2 (Ran Binding protein 1 et 2) qui facilitent la liaison du RanGTP à RanGAP (Plafker, 2000). Cette différence de localisation, crée un gradient de concentration

de RanGTP de 2 mM nécessaire au transport des macromolécules (Izaurralde, 1997). En effet, le gradient de RanGTP confère la direction du transport nucléocytoplasmique et ceci a été confirmé en 1999 lors d'expériences où dans des cellules perméabilisées, le gradient fut inversé (Nachury, 1999).

Cependant, comme Ran GTP est continuellement exporté, car il possède de nombreuses interactions avec les exportines et est aussi impliqué dans le recyclage des récepteurs d'import, un import nucléaire de Ran GDP est requis. Cette action est effectuée par la protéine NTF2 pour "Nuclear transport factor 2". Dans le noyau, l'échange de GDP en GTP rompt l'interaction entre Ran GDP et NTF2 (Macara 2001).

#### d. Les différents modèles d'import

Le mécanisme de translocation du complexe cargo-transporteur à travers le pore nucléaire est un sujet qui, de nos jours, est toujours ouvert au débat. Plusieurs modèles d'import ont été décrits :

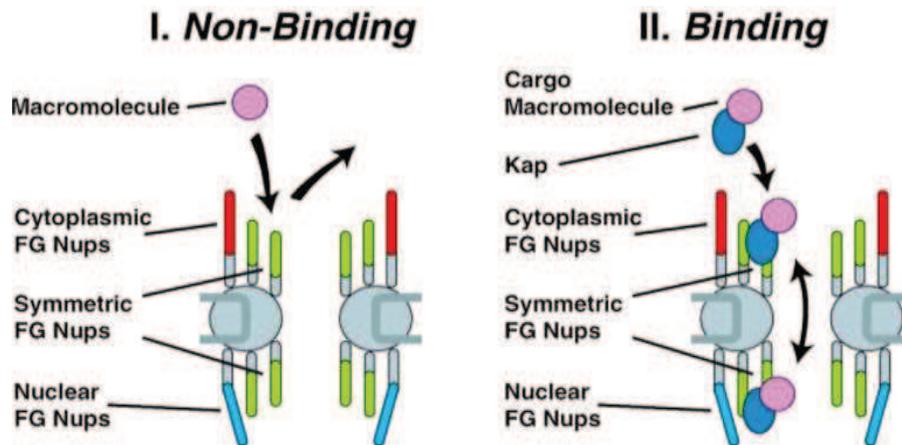
- en 2000, le "Brownian affinity gate model"
- en 2001, le "Oily spaghetti model"
- en 2001, le "Affinity gradient model"
- en 2001, le "Selective phase model"
- en 2003, le "Virtual gate model"
- en 2005, le "Dimensionality reduction model"
- en 2007, le "Two-gate model".

Aucun de ces modèles ne permet de répondre à toutes les questions posées par le processus de translocation nucléaire.

#### *Brownian affinity gate model :*

Ce modèle propose que la translocation s'effectue grâce au mouvement brownien ainsi qu'à deux sites d'ancrage présents de chaque côté du NPC (Figure 27). Ces sites d'ancrages, sont définis comme des nucléoporines possédant des répétitions FG, pouvant interagir avec les différents transporteurs, et responsables de la sélectivité de l'import. En effet, une macromolécule non associée à un transporteur ne peut pas se lier sur les sites d'ancrages et la probabilité qu'elle puisse traverser le NPC par diffusion reste très faible. Ces sites d'ancrages

possèdent aussi le rôle important de faciliter la translocation du complexe grâce à une différence d'affinité pour le transporteur. Par exemples, les protéines effectuant l'import auront plus d'affinité pour les nucléoporines situées du côté nucléaire (Rout, 2000).



**Figure 27:** The Brownian affinity gate model (Rout, 2000)

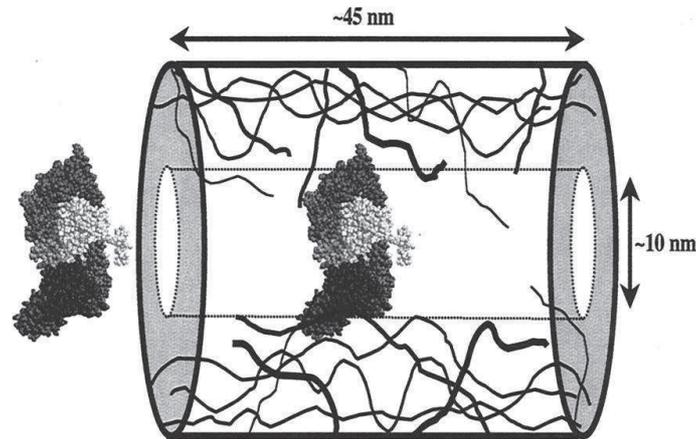
- (I) L'encombrement du tube central assure que les macromolécules qui ne se lient pas aux transporteurs (famille des Karyopherines (Kap)) ont des difficultés à traverser le NPC, et donc sont largement exclues.
- (II) Les macromolécules qui utilisent les transporteurs vont pouvoir se lier aux nucléoporines et donc augmentent la probabilité du transport nucléaire.

#### Oily spaghetti model :

Dans ce modèle, le pore est décrit comme une structure ouverte où les répétitions FG des nucléoporines qui forment des chaînes vont remplir le canal central à la manière d'un "plat de spaghettis" (Figure 28).

La taille du canal central serait à peu près de 10 nm ce qui laisserait passer les molécules plus petites par diffusion et les nucléoporines présentes autour formeraient une couche de 7 nm. De plus, il a été décrit que le changement de conformation des chaînes de nucléoporines possède un  $\Delta G$  suffisamment faible pour rendre compte des mouvements de ces chaîne à 37°C.

Ainsi, lorsque le complexe cargo-transporteur arrive au niveau des chaînes des nucléoporines, il y a une association avec les répétitions FG. Ces interactions sont faibles et donc temporaires, ce qui permet au complexe de se détacher et d'aller ensuite se fixer sur une autre chaîne présente à proximité. Ces association/dissociation vont permettre une diffusion facilitée à travers le pore (Macara 2001).



**Figure 28:** The oily spaghetti model (Macara, 2001)

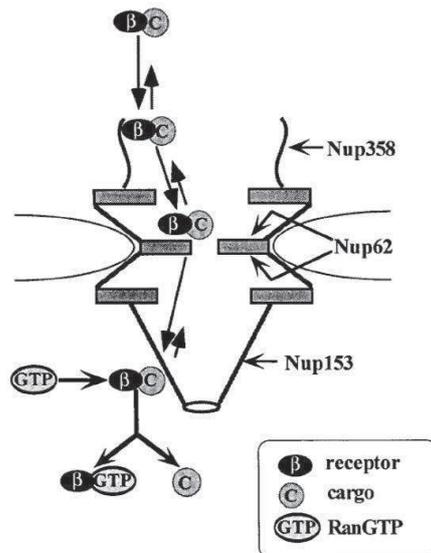
Les dimensions approximatives du NPC sont indiquées, les nucléoporines sont représentées par les lignes noires. Les molécules possédant un diamètre inférieur à 10 nm peuvent diffuser librement alors que les molécules plus grosses sont bloquées par les nucléoporines. Les transporteurs, peuvent eux se lier faiblement et momentanément aux nucléoporines, et peuvent donc diffuser d'un site d'interaction à un autre. Le temps d'interaction étant de quelques microsecondes, il a été assumé que les transporteurs diffusent sans direction précise.

Dans ce modèle le mouvement est décrit comme aléatoire au sein du canal central. Cependant des sites d'ancrage seraient présents à chaque extrémité afin d'augmenter la probabilité de la translocation ainsi que celle de l'assemblage et du désassemblage du complexe.

Nous savons que le taux de transport est d'environ 200 transporteurs/ NPC/seconde. Ce qui signifie que la durée de la translocation pour un transporteur est de 5ms alors que si le transporteur effectuait la traversée par diffusion, il prendrait environ 10  $\mu$ s ce qui signifie que les transporteurs ont le temps de se lier plusieurs centaines de fois au cours de leurs trajets.

#### Affinity gradient model :

Ce modèle décrit en 2001 par Ben-Efraim, a été postulé après que son étude ait montré que l'importine  $\beta$  se lie à la Nup 358, au complexe de la Nup 62 et à la Nup 153. Il a montré que l'affinité de ces interactions augmentait en fonction de la localisation des nucléoporines. En effet, on peut observer un gradient d'affinité de l'importine  $\beta$  pour les nucléoporines, l'affinité augmentant d'autant plus que leur localisation est nucléaire (Figure 29) (Ben-Efraim, 2001).



**Figure 29:** Affinity gradient model (Ben-Efraim, 2001).

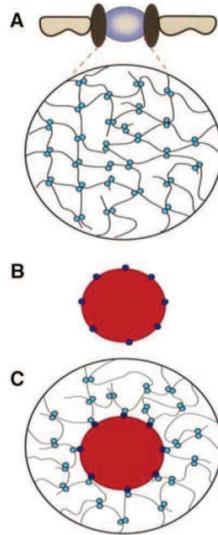
L'importine  $\beta$  liée au complexe d'import va se lier aux nucléoporines Nup358, Nup62 et Nup153. Ces interactions ont été montrées comme ne se faisant pas avec la même affinité. Plus la nucléoporine est nucléaire, plus l'importine  $\beta$  va se lier fortement à elle.

Ce modèle n'explique pas comment l'importine  $\beta$  passe d'une nucléoporine à l'autre. Deux hypothèses ont été émises, la première étant que l'importine  $\beta$  se lie aux nucléoporines présentes entre celles étudiées ici. La deuxième hypothèse est que la dynamique des chaînes permet par exemple au filament de Nup358 d'amener mécaniquement le complexe au niveau de la Nup62. Cette dernière hypothèse est confortée par le fait que les importines  $\beta$  possèdent au minimum 2 sites d'interactions avec les nucléoporines (Kutay, 1997).

#### Selective phase model :

Ce modèle de translocation au niveau du NPC date lui aussi de 2001, il a été proposé par Ribbeck et Görlich (Ribbeck, 2002). Ce modèle s'appuie sur la présence d'un maillage au centre du canal composé des chaînes de répétitions FG. Ce maillage est décrit comme étant assez relâché pour permettre le passage des petites molécules par diffusion passive tout en retenant le passage des macromolécules.

Il serait assez similaire à une bicouche lipidique mais à une échelle plus importante. Il serait donc constitué d'une phase semi-liquide dans laquelle les transporteurs peuvent passer facilement alors que les macromolécules inertes ne pourraient passer. Cela signifie donc que les transporteurs vont effectuer la translocation des cargos en augmentant simplement leurs solubilités à travers le maillage (Figure 30).



**Figure 30:** Selective phase model (Ribbeck, 2002):

(A) canal central où l'on observe un maillage composé des interactions entre les répétitions FG des nucléoporines, (B) Macromolécules capables de translocation facilitée grâce au site de liaison avec les répétitions FG, (C) Le cargo interagit avec les répétitions du maillage et devient une part de celui-ci tout en gardant intact sa fonction de barrière.

L'élément clef de ce modèle est l'interaction des répétitions FG entre elles, ces liaisons se produisant très vraisemblablement par des interactions hydrophobes entre les domaines riches en phénylalanine. Ces liaisons assurent l'intégrité structurale du canal central. Cependant afin d'éviter l'effondrement de celui-ci des domaines hydrophiles sont nécessaires entre les domaines hydrophobes. Ces interactions sont donc nécessaires pour maintenir un maillage sélectif qui permette le passage des petites molécules mais qui inhibe la translocation des plus grosses.

En effet, la translocation des macromolécules ne peut se faire sans une rupture transitoire dans le maillage. Cette cassure est réalisée par les transporteurs entrant en compétition localement avec les interactions FG-FG des différentes nucléoporines en interagissant directement avec les répétitions FG. Le cargo va alors devenir une partie intégrante du maillage qui va se refermer derrière celui-ci, conservant ainsi intacte la fonction de barrière du NPC (Ribbeck, 2001).

Cependant, des expériences ont montré que la taille du cargo se répercute sur la vitesse de translocation même en présence des transporteurs (Ribbeck, 2002). De plus leurs expériences ont également montré que l'utilisation de plusieurs transporteurs sur un même cargo peut augmenter la vitesse de passage à travers le NPC.

Ces résultats sont cependant en contradiction avec le "Brownian affinity gate model" et le "affinity gradient model" car ces modèles ne peuvent expliquer pourquoi l'utilisation de plusieurs transporteurs augmente la vitesse de translocation.

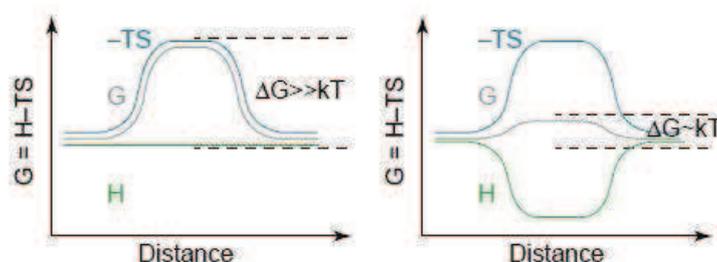
### Virtual gating model :

Ce modèle (Rout, 2003) est basé sur des considérations thermodynamiques relatives au processus de transport. Il établit une analogie entre un processus de transport et une réaction chimique du point de vue des variations d'énergie libre survenant au cours du processus ou de la réaction. De la même manière qu'une réaction chimique se produit lorsque l'état de transition est atteint, une macromolécule sera transportée dans le NPC si elle est capable d'atteindre "l'état de transition" du transport. Dans ce modèle, cette capacité à atteindre cet "état de transition" est assuré par les transporteurs grâce à leur capacité à se lier au NPC.

Une macromolécule diffusant librement dans le cytosol possède une entropie élevée (grande liberté des directions et du type de mouvement) alors que la même macromolécule confinée dans le tube central du NPC va posséder une entropie beaucoup plus basse (liberté de mouvement restreinte). Le NPC présente donc les propriétés d'une barrière entropique.

Le prix entropique à payer pour placer une macromolécule dans le tube central est d'autant plus élevé que la macromolécule est de grande taille, ce qui fait que la probabilité de passage décroît.

En représentant la variation d'énergie libre  $G$  et de ses deux composantes, enthalpiques ( $H$ ) et entropiques ( $-TS$ ) au cours du processus de transport dans le cas d'une macromolécule ne présentant pas d'interaction avec le NPC (à gauche, Figure 31), et dans le cas capable d'interaction avec les transporteurs (à droite, Figure 31), on voit que l'interaction s'accompagnant d'une diminution de l'enthalpie, la variation d'énergie libre ( $\Delta G$ ) au cours de la réaction est diminuée suffisamment pour rendre la réaction de transport thermodynamiquement possible, le  $\Delta G$  étant alors de l'ordre de  $kT$ , l'énergie de diffusion d'une macromolécule.



**Figure 31:** Virtual gating model (Rout, 2003).

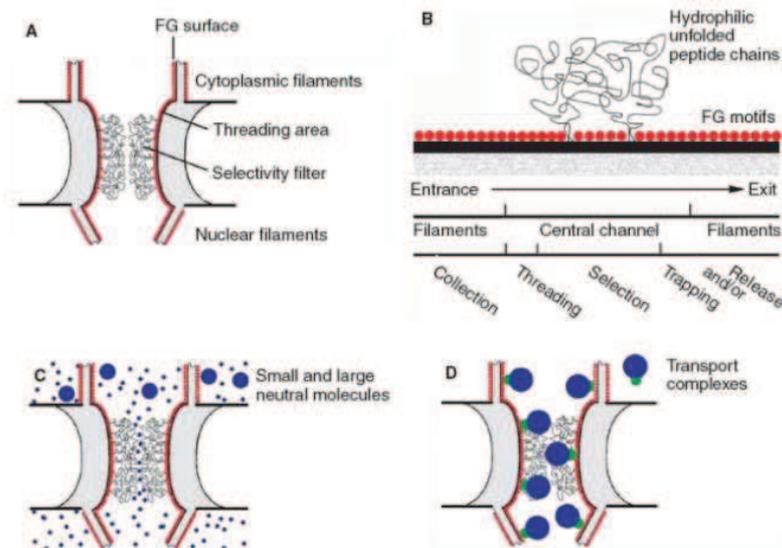
Energie de translocation pour une molécule, le  $\Delta G$  étant la variation d'énergie libre, le  $kt$  est l'énergie de diffusion. Pour une molécule seule (à gauche) : le  $\Delta G > kt$ , il n'y a donc pas d'import. Pour une molécule avec un transporteur (à droite) : le  $\Delta G = kt$ , il y a donc import nucléaire.

Pour que le transport soit efficace, les interactions doivent être transitoires, donc possédant des vitesses de dissociation élevées ce qui implique des interactions assez faibles (sinon il y aurait accumulation, encombrement et finalement obstruction du canal). C'est effectivement une caractéristique observée pour les interactions entre les répétitions FG des nucléoporines et les transporteurs.

*Dimentionality reduction model :*

Ce modèle a été décrit à la suite de résultats montrant que si les nucléoporines des filaments cytoplasmiques sont retirés ou permutés avec ceux du noyau, on observe toujours une translocation du cargo à travers le NPC (Walther, 2002) (Zeitler, 2004). De plus, des expériences conduites sur la levure ont montré que la délétion des nucléoporines périphériques n'induisait pas de létalité, alors que celle des répétitions FG du canal central est létale pour la levure (Strawn, 2004).

Ce modèle présente donc le NPC comme un canal recouvert d'une surface de répétitions FG organisée et cohérente, présentant ainsi un filtre sélectif qui restreint le passage des macromolécules grâce à un réseau de chaîne peptidiques hydrophiles (Figure 32 (A)) (Peters 2005).



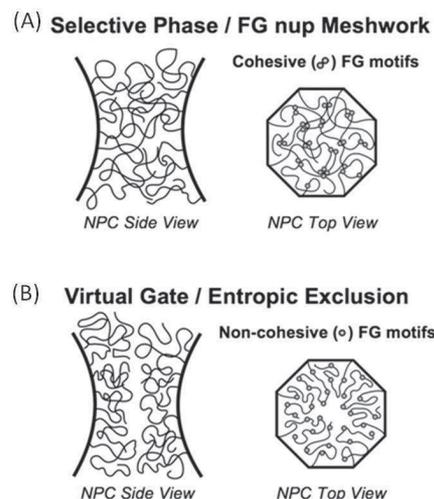
**Figure 32:** Dimensionality reduction model (Peters 2005).

A : le passage central est restreint par un filtre sélectif constitué de chaînes peptidiques hydrophiles. B : la surface des nucléoporines est organisée en différentes sections. C : les petites molécules peuvent passer par diffusion et les plus grandes vont rester bloquées. D : en présence de transporteurs, les molécules vont se lier aux nucléoporines et vont rapidement s'orienter vers la sortie.

Ce modèle postule que la surface des nucléoporines est organisée en différentes sections : la première du côté cytoplasmique correspond aux filaments qui servent d'antenne pour attraper les complexes d'import. Puis les répétitions FG du canal central sont divisées en trois parties, qui sont, celle de l'entrée qui vont emmener les complexes vers les répétitions de la deuxième partie qui servent de filtre sélectif. Les autres servent à envoyer le complexe vers la sortie du NPC (Figure 32 (B)). Ce système permet aux petites molécules de passer par diffusion passive car elles ne se lient pas aux nucléoporines. Les plus grosses molécules, elles, sont retenues car le pore ne fait qu'un diamètre ouvert de 8 nm de diamètre (Figure 32 (C)). Cependant les transporteurs liés au cargo vont s'attacher aux répétitions FG des filaments cytoplasmiques ou du canal central ils vont rapidement s'orienter vers la sortie grâce à des sites de haute affinité (Figure 32 (D)). La libération du complexe pourra ensuite finalement être réalisée par l'action du RanGTP.

### Two gate model

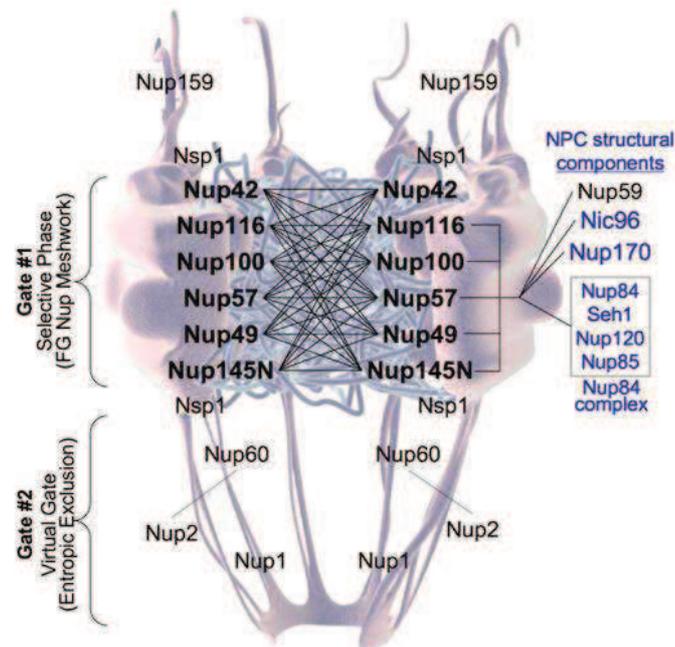
Ce modèle combine les deux modèles de translocation nucléaire déjà décrits précédemment, le "selective phase model" et le "virtual gate model". Le "selective phase model" fonctionne sur le principe que les répétitions FG des nucléoporines interagissent ensemble pour constituer un maillage cohésif, alors que le "virtual gate model" est présenté comme une barrière hydrophobe de type non cohésif (Figure 33).



**Figure 33:** Two gates model (Patel, 2007).

A : le selective phase model propose que les répétitions FG interagissent entre elles par des interactions hydrophobes ce qui forme un maillage. B : le virtual gate model propose que les répétitions FG soient non-cohésives entre elles et que cela forme une barrière entropique.

En effet, des expériences pratiquées chez la levure ont montré que les nucléoporines du canal central interagissent entre elles à la manière du “selective phase model” alors que les nucléoporines des périphéries ne sont pas cohésives et ressemblent plus au “virtual gate model” (Figure 34). Cela signifie que les macromolécules qui rentrent dans le NPC peuvent encore être arrêtées au niveau de cette deuxième barrière. Ces deux barrières sont connectées via la Nup170 (Patel, 2007).



**Figure 34:** Two gate model (Patel, 2007): le canal central est représenté comme étant le 1<sup>er</sup> portail montrant un “selective phase model” et le panier nucléaire représente le “virtual gate model”.

## **VI. Import nucléaire de la capsidie du VHB :**

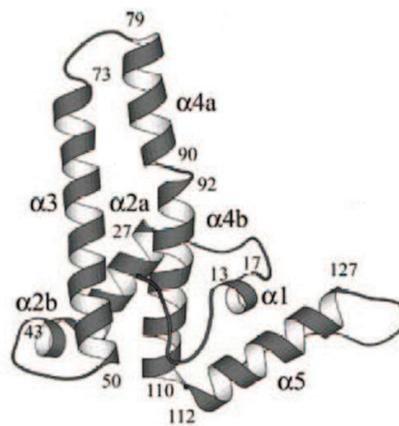
De très nombreux virus répliquent leur génome dans le noyau des cellules infectées :

- Tous les virus à ADN, excepté les Poxviridae
- Les Orthomyxoviridae et les Bornavirus pour la famille des virus à ARN.

Tous ces virus doivent donc posséder un moyen de transporter leurs génomes dans ce compartiment. Pour cela, différentes modalités sont utilisées par les virus (Cohen, 2011). En effet, certains virus accèdent au noyau durant la mitose lorsque l'enveloppe nucléaire est momentanément désassemblée comme le virus de la leucémie murine (MLV) (Roe, 1993). D'autres virus comme le VIH ou celui de la grippe se désassemblent dans le cytoplasme, certains de leurs composants contiennent des NLS et sont donc capables d'être acheminés jusqu'au noyau en utilisant la machinerie cellulaire (Martin, 1991). Le troisième cas rencontré, correspond à quelques capsides capables de s'attacher aux NPC du côté cytoplasmique, cette interaction permettant le désassemblage et le génome viral souvent associé à des protéines virales traverse le NPC. Cette stratégie est utilisée par le virus de l'herpes qui utilise les importines pour se lier au NPC et par l'adénovirus qui lui se lie directement au NPC (Greber, 1997). Une autre possibilité est employée par le parvovirus qui lui n'utilise pas le NPC pour emmener la capsidie entière ainsi que son génome dans le noyau mais effectue des cassures dans l'enveloppe nucléaire et entre donc par les trous qu'il a formés (Cohen, 2011). La dernière méthode utilisée est celle qu'emprunte la capsidie du VHB et qui correspond à un import de la capsidie entière dans le noyau.

### **1. La capsidie :**

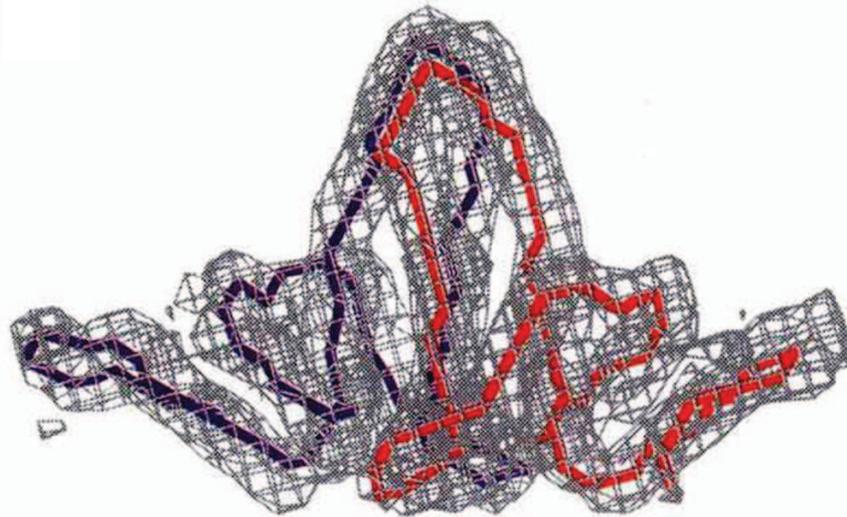
La capsidie est composée de plusieurs sous-unités appelées protéine Core, c'est une protéine de 21,5 kDa constituée de 183-185 acides aminés selon les génotypes. La partie N-terminale (résidus 1 à 149) est organisée en plusieurs régions arrangées en hélices  $\alpha$  (Figure 35) (Wynne, 1999).



**Figure 35:** Représentation schématique du domaine N terminale de la protéine core (Wynne, 1999)

La première est l'hélice  $\alpha 1$  localisée entre les acides aminés 13-17, la deuxième est l'hélice  $\alpha 2$  située entre les acides aminés 27-43 mais elle est interrompue au niveau du résidu 37. Puis après une boucle, on retrouve l'hélice  $\alpha 3$  (résidus 50 à 73) qui est plus longue et constitue une partie de la pointe visible lors de la formation du dimère. Cette pointe est aussi constituée de l'hélice  $\alpha 4$  (résidus 79 à 110 avec une interruption entre les acides aminés 90 et 92). La dernière des hélices est l'hélice  $\alpha 5$  composée des acides aminés 112 à 127. Dans la région N-terminale, à la suite des hélices, on trouve une boucle riche en prolines entre les résidus 128-136. Ce domaine N terminal sert dans la formation des capsides. En effet, les monomères de la protéine core vont se lier entre eux pour former des dimères. Des ponts disulfures qui se créent après la sécrétion des virions entre les cystéines en position 48 de chaque monomère ainsi que celle en position 61, stabilisent la forme dimère.

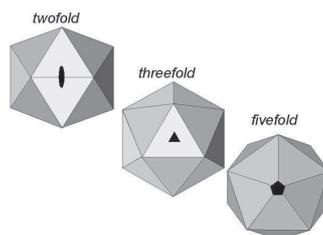
L'association de deux monomères va former une structure en épingle à cheveux qui est composée d'hélice  $\alpha$  antiparallèles (Figure 36) (Bottcher, 1997). Cette structure forme les pointes protubérantes que l'on observe sur la capsid et elle constitue le principal site antigénique de la capsid. En effet la capsid possède 2 sites antigéniques, un situé au niveau de la pointe de l'épingle à cheveux et un autre situé à sa base (Salfeld, 1989) (Steven, 2005).



**Figure 36:** Structure du dimère (Bottcher, 1997).

Les dimères vont ensuite s'assembler en trimère de dimères, soit des hexamères, qui vont eux-mêmes s'assembler afin de former la capsid. La capsid est décrite comme possédant une structure icosaédrique.

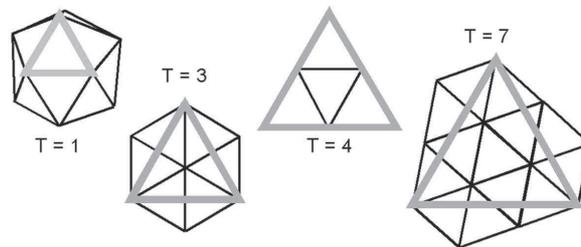
Un icosaèdre est une forme géométrique à 20 facettes triangulaires. En fonction de l'axe observé, différentes symétries sont révélées. En effet, on peut observer plusieurs axes de symétries, l'axe de symétrie d'ordre 2 qui est le plus simple, l'axe de symétrie d'ordre 3 et l'axe de symétrie d'ordre 5 (Figure 37).



**Figure 37:** Différentes vues des axes symétriques des capsides icosaédriques (Katen, 2009).

De plus les triangles composant les facettes peuvent être composés de plusieurs sous-unités (figure 38). La forme la plus simple appelée T1, est constituée d'une seule sous-unité, ce qui signifie qu'une capsid de forme T1 est constituée de 60 monomères ( $20 \text{ triangles} \times 3 \text{ côtés} \times 1 \text{ sous-unité}$ ). La forme T3, elle, est constituée de 180 sous-unités, une facette de la capsid

contenant 9 monomères. Il existe aussi la forme T4 qui est composée de 240 sous-unités, un triangle étant composé de 12 monomères. Enfin la forme T7 où un triangle est formé de 21 monomères ce qui signifie que la capsidie serait composée de 420 sous-unités.

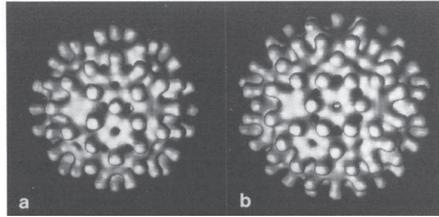


**Figure 38:** Différentes facettes possibles des capsides icosaédriques.

La forme T1 peut être retrouvée chez le virus de la marbrure chlorotique de la cornille (“Cowpea chlorotic mottle virus ou CCMV”) (Khayat, 2005). La forme T7, elle, est retrouvée chez les papillomavirus (Mukherjee, 2008). Quand au VHB, il possède une capsidie qui peut être présente sous 2 formes, la forme T3 et la forme T4 (Figure 39) (Crowther, 1994).

La forme T3 est la forme minoritaire de la capsidie du VHB, en effet après infection, elle ne représente qu’environ 15 % de la quantité des capsides formées. La forme T3 est donc constituée de 180 monomères de la protéine core et possède un diamètre d’environ 30 nm. La deuxième structure adoptée par la capsidie du VHB est la forme T4, c’est la forme majoritaire car elle représente environ 85 % de la population des capsides et possède une taille de 36 nm de diamètre. Des études ont montré que le ratio entre la forme T3 et T4 peut varier. En effet, plus le domaine C-terminal de la protéine core est réduit, plus le pourcentage de forme T4 va être diminué. Les 149 acides aminés du domaine N-terminal de la protéine core vont s’assembler et former des capsides dont la forme T4 sera représentée à 85 %. En revanche les 140 premiers résidus vont eux s’assembler en capsidie où la forme T4 sera minoritaire et représentera seulement 15 % de la population. Il a aussi été montré que la protéine core composée des 138 premiers acides aminés ne s’assemble plus en capsidie (Zlotnick, 1996).

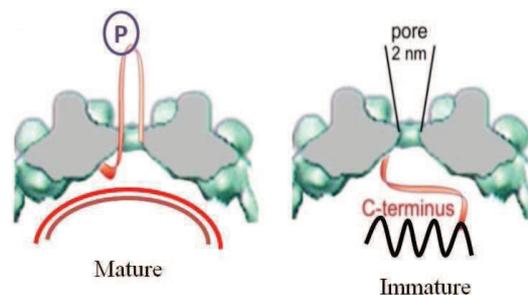
L’analyse en 3 dimensions de la structure de la capsidie a aussi montré que celle-ci possède à sa surface des pointes protubérantes (“protruding spikes”), ainsi que des trous (Figure 39).



**Figure 39:** Structure en 3 dimensions de la capsid du VHB (Crowther, 1994). La capsid (a) est une forme T3 et la (b) est une forme T4, les deux types de capsid sont représentées sur leur axe de symétrie d'ordre 2.

La capsid de forme T3 possède 90 pointes alors que celle de de forme T4 en présente 120. De plus dans cette structure, des trous sont visibles. Les plus gros (2 nm de diamètre environ), sont localisés au centre de 3 dimères, on en retrouve 80 sur la forme T4 et 60 sur la forme T3. Il existe aussi des trous plus petits (1,3 nm de diamètre environ) qui sont localisé au centre de 6 dimères. Ces trous plus petits sont moins nombreux, environ 30 sur la forme T4 et 20 sur la forme T3 (Crowther, 1994).

Si le domaine C-terminal de la protéine core n'est pas impliqué dans la formation ni dans la structure de la capsid, ce domaine qui comprend les résidus 149 à 183 a cependant plusieurs autres rôles. En effet, il est nécessaire pour l'encapsidation de l'ARN pré-génomique et de la polymérase. Il contient aussi les séquences NLS qui sont nécessaires à l'import de la capsid dans le noyau. Le domaine C-terminal de la capsid est de plus impliqué dans la maturation du génome de l'ARNpg en ADNrc.



**Figure 40:** Hypothèses des principales différences entre les capsides matures et immatures.

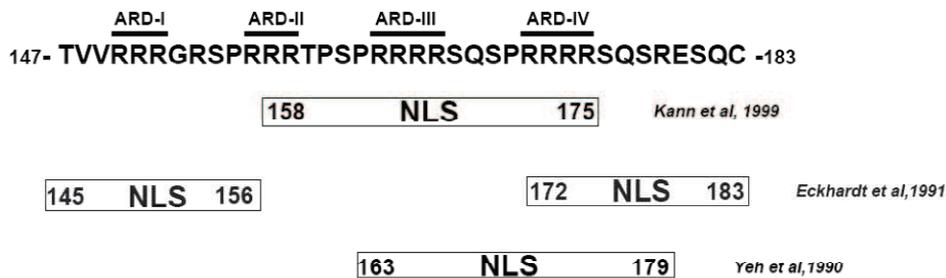
Cette maturation est nécessaire pour l'enveloppement des capsides, en effet le changement dans la structure de la capsid, associé avec la synthèse de l'ADN, va permettre l'interaction du domaine C-terminal de la capsid avec le domaine pré-S1 de la protéine de surface L (Roseman, 2005).

Cependant, le phénomène déclenchant la maturation des capsides n'est pas encore déterminé. Plusieurs modifications s'effectuent au même moment au niveau de la capsidie :

- La synthèse de l'ADNrc à partir de l'ARNpg
- Le changement de conformation du domaine C-terminal de la protéine core qui se retrouve exposé à l'extérieur de la capsidie
- La phosphorylation de ce domaine.

La phosphorylation se fait majoritairement sur 3 sérines, en position 157, 164 et 172 (Lan, 1999). Nous avons montré dernièrement que cette phosphorylation était effectuée par la protéine kinase C (PKC) (Wittkop,2010). Ces phosphorylations ont des rôles importants pour le virus, car la mutation des sérines 164 et 172 inhibe l'encapsidation de l'ARNpg (Kann, 1994) (Gazina, 2000).

La maturation de la capsidie induit une autre modification qui est le changement de conformation du domaine C-terminal. En effet celui-ci reste enfoui à l'intérieur de la capsidie puis lorsque celle-ci devient mature, le domaine C-terminal ou une partie de celui-ci devient exposé à l'extérieur de la capsidie (Figure 40). Ce changement de conformation permet ainsi au NLS de devenir accessible aux protéines de l'import seulement lorsque la capsidie possède un génome mature.



**Figure 41:** Localisations des NLS rapportés dans la littérature (Li, 2010).

Le domaine C-terminal possède 4 clusters d'arginine qui sont similaires aux séquences des NLS. Cependant plusieurs NLS ont été décrits dans la littérature et la localisation exacte du NLS reste encore indéterminée (Figure 41).

## 2. Les transporteurs impliqués

### a. Importine alpha 2:

L'importine  $\alpha 2$  est une protéine de 529 acides aminés qui est codée par le gène KPNA2. Cette protéine humaine, de 58 kDa, est aussi appelée Rch1 (pour Rag Cohort 1), karyopherine  $\alpha 2$ . Chez la levure, cette protéine est appelée Spr1 (pour Suppressor of temperature-sensitive mutation of RNA polymerase I).

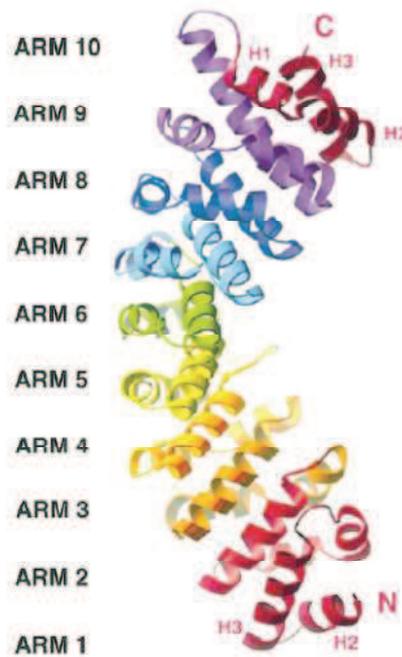
L'importine  $\alpha 2$  est impliquée dans l'import nucléaire des molécules présentant un NLS monopartite ou bipartite. Cependant elle n'est qu'une molécule adaptatrice et nécessite l'interaction avec l'importine  $\beta$  pour effectuer l'import de macromolécules (Gorlich, 1996).



*Figure 42:* Schéma des domaines de l'importine  $\alpha$  (Goldfarb, 2004).

L'importine  $\alpha 2$  possède 3 domaines distincts (Figure 42), le domaine N-terminal (2-60) riche en résidus basiques et impliqué dans l'interaction avec l'importine  $\beta$ . Il est dénommé domaine IBB pour "Importin  $\beta$  binding domain". Le domaine central constitué de 10 répétitions armadillos, ARM. Les ARM sont composés de 40 acides aminés formant des hélices alpha, la succession de ces motifs s'organisant en une super hélice (Figure 43) (Lott, 2011).

Ce sont ces motifs ARM qui vont permettre l'interaction avec le NLS des protéines. Puis on retrouve en C-terminal, le domaine de liaison à la protéine d'export CAS (cellular apoptosis susceptibility protein), cette protéine va permettre de recycler l'importine  $\alpha$  vers le cytoplasme (Goldfarb, 2004).



**Figure 43:** Structure des domaines armadillos de l'importine  $\alpha$  (Conti, Uy et al. 1998).

Des études de cristallographie ont montré que seulement certains ARM sont importants pour la reconnaissance des NLS. En effet, les ARM 1 à 4 reconnaissent les NLS monopartites, et la deuxième partie des NLS bipartite est reconnue par les ARM 7 à 8 (Fontes, 2000). Les motifs armadillos ont aussi été retrouvés chez d'autres protéines comme la  $\beta$ -caterine, et il semblerait que les ARM aident à l'interaction avec les protéines G comme Ran.

Le domaine IBB a aussi été très analysé, ce domaine interagit avec l'importine  $\beta$  mais il possède aussi une fonction auto-inhibitrice. Il est vrai que le domaine IBB est constitué à 40 % de résidus basiques et qu'il possède à son extrémité un NLS interne qui va bloquer le domaine central en absence de l'importine  $\beta$  ou en absence d'un NLS (Harreman, 2003). Il n'a pas encore été déterminé laquelle de ces protéines relâche le domaine IBB et libère le site pour le NLS. Ce système diminue donc l'affinité de l'importine  $\alpha$  seule pour le NLS comparé à l'affinité de l'hétéro dimère  $\alpha/\beta$  pour le même NLS (Catimel, 2001).

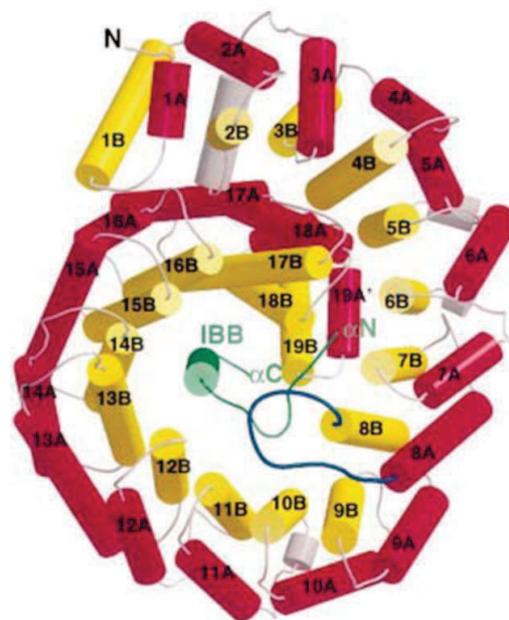
#### b. Importine beta

L'importine  $\beta$  est une protéine de 876 résidus qui forment une protéine de 97 kDa. Cette protéine est codée à partir du gène KPMB1. Cette protéine est un des membres les plus étudiés de la famille des karyophérines béta. Elle possède cependant plusieurs nom comme Importin

90, Karyopherin subunit beta 1, ou Nuclear factor 97. Son rôle dans le mécanisme d'import est d'emmener les cargos du cytoplasme vers le noyau. Pour cela il peut soit utiliser des protéines adaptatrices, soit effectuer le transport des protéines directement.

L'adaptateur le plus connu est l'Importine  $\alpha$  qui va reconnaître les cargos portant des NLS dits "classique". Cependant, l'Importine  $\beta$  peut aussi utiliser comme protéine adaptatrice la snuportine pour l'import des ARNs, ou l'importine 7 pour l'import des histones H1 (Gorlich, 1999).

L'importine  $\beta$  possède une structure très flexible, elle est constituée de 19 répétitions en tandem de 40 acides aminés hydrophobes appelés domaines HEAT. Les domaines HEAT comportent 2 hélices antiparallèles, l'hélice A qui est courbe et l'hélice B qui est droite, ces 2 hélices sont connectées par un coude (Andrade, 2001). L'étude cristallographique de cette molécule a montré que les 19 domaines HEAT créent une super-hélice de forme concave où les hélices A sont situées à la surface externe et les hélices B sont sur la surface interne (Figure 44) (Conti, 1998). Cette étude a aussi montré que la boucle entre l'hélice A et B du domaine HEAT 8 est plus longue ce qui donne plus de flexibilité à la protéine.



**Figure 44:** Structure de l'importine  $\beta$  (Conti, 1998).

Les hélices A sont en rouge et les hélices B sont en jaunes. Le domaine IBB de l'importine  $\alpha$  est en vert.

Cette flexibilité est nécessaire car l'interaction avec le domaine IBB de l'importine  $\alpha$  se fait avec les domaines HEAT 7 à 19 ce qui implique que l'Importine  $\beta$  s'enroule autour de la région IBB. En effet lorsque l'importine  $\beta$  est attachée au domaine IBB, la protéine devient

moins sensible aux protéases ce qui montre un changement de conformation en une structure plus compacte (Cingolani, 1999).

L'Importine  $\beta$  possède aussi 2 domaines de liaison au FxFG des nucléoporines (Figure 45), liaisons importantes car ce sont elles qui permettent à la protéine d'effectuer son rôle de transporteur nucléaire. Le premier domaine, localisé en N-terminal de la protéine, présente 2 sites de liaison avec les hélices A des HEAT 5-6 et des HEAT 6-7.

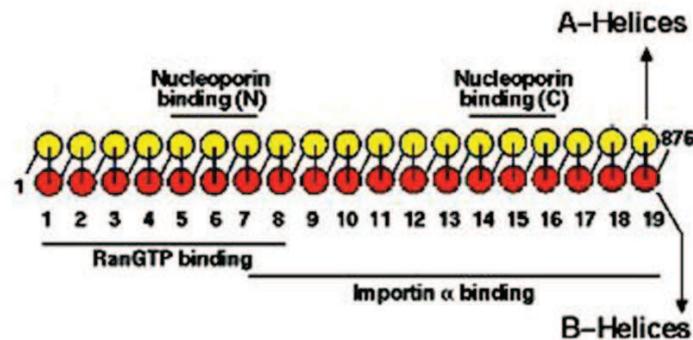


Figure 45: Schéma des domaines de l'importine  $\beta$ .

Le deuxième domaine, localisé du côté C-terminal de la protéine, implique les HEAT 14 à 16. Ces 2 domaines qui interagissent avec les nucléoporines permettent de comprendre un peu mieux comment l'Importine  $\beta$  passe le pore nucléaire (Bednenko, 2003).

Il a aussi été montré que l'Importine  $\beta$  possède un domaine d'attachement au RAN GTP, qui se situe sur les HEAT 1-2, ainsi que la boucle du HEAT 8. Cette interaction avec RAN GTP change la conformation de l'Importine  $\beta$  dans une structure différente de celle observée avec le domaine IBB. Il existe donc 2 conformations mutuellement exclusives, qui explique la dissociation du domaine IBB par l'ajout de RAN GTP (Conti, 2001). De plus son interaction avec la protéine RAN GTP, lui permet d'être recyclée dans le cytoplasme. En effet, quand RAN GTP est supprimé, l'importine  $\beta$  reste bloquée dans le noyau (Hartmann, 1995).

### 3. Nup153 :

La Nup 153 est appelée ainsi d'après son poids moléculaire, comme la majorité des autres nucléoporines. Nup153 est une glycoprotéine de 1475 acides aminés, enrichie en sérine/thréonine et qui comme plusieurs autres nucléoporines possèdent de multiples copies du penta-peptide FxFG.

Le NPC ayant une structure octogonale, la Nup153 est présente en  $n \times 8$  copies. Des études de microscopie électronique ont révélé que cette protéine est principalement localisée au niveau du panier nucléaire, et plus précisément au niveau de l'anneau distal (Pante, 1994). Cependant certaines études ont décrit la Nup153 comme une protéine mobile, en effet la présence de 2 populations de Nup153 a été montrée (Fahrenkrog, 2002) (Stoffler, 2003), la première qui est ancrée dans le panier nucléaire, la deuxième qui est libre dans le nucléoplasme. Des échanges se font régulièrement entre ces 2 populations.

La Nup153 possède plusieurs domaines distincts (Figure 46). En N-terminal, on retrouve le domaine NPAR pour "Nuclear pore associating region" qui est situé entre les acides aminés 39 à 339. Puis on retrouve le domaine NETC pour "Nuclear envelope targeting cassette" entre les résidus 2 à 144. Il y a ensuite entre les acides aminés 250 à 400, le RBD pour "RNA binding domain".



*Figure 46:* Nup153 et ces différents domaines (Ball, 2005).

Dans la région centrale, est localisé le domaine en doigt de zinc de type Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>2</sub>, en opposition du type Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>. Les domaines en doigt de zinc de type Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>2</sub> sont caractéristiques des protéines interagissant avec l'ADN. Nup153 possède 4 de ces motifs en doigt de zinc (Sukegawa, 1993). Et finalement, le domaine C-terminal qui n'est pas structuré et qui est une région flexible, contient la majorité des répétitions FxFG. En effet, Nup153 contient 29 de ces répétitions.

La Nup153 est une protéine importante du NPC, et est impliquée dans différents procédés cellulaires qui sont très importants pour la cellule. En effet, un de ses rôles est de participer à la formation des NPC. Il est vrai que la déplétion de Nup153 dans des pores nucléaires

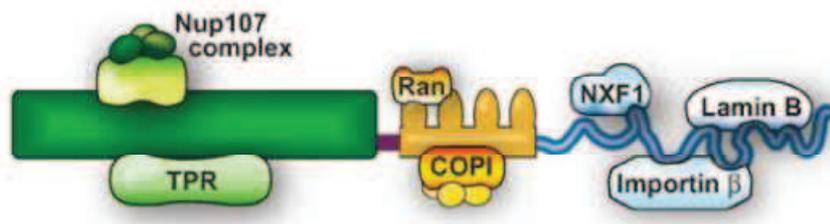
d'ovocyte de xénope reconstitués montre l'absence de la protéine Tpr, qui est liée à la Nup153 dans la structure du NPC, ainsi qu'une mauvaise localisation des protéines Nup98 et Nup95 (Figure 23) (Walther, 2001). La Nup153 est aussi nécessaire à l'ancrage des NPC dans l'enveloppe nucléaire, lorsque celle-ci est absente les NPC deviennent mobile sur l'enveloppe nucléaire. Cet ancrage est du à la liaison de la Nup153 avec la lamine B (Smythe, 2000). De plus la Nup153 interagit avec la chromatine et est impliqué dans les étapes tardives de l'anaphase et les étapes précoces de la télophase. Nup153 aide aussi à coordonner les fonctions mitotiques des protéines du complexe COPI au niveau de l'enveloppe nucléaire. Le complexe COPI a été caractérisé comme ayant un rôle dans la formation des vésicules au niveau de l'appareil de Golgi, et est recruté grâce au domaine en doigts de zinc la Nup153 (Liu, 2003). Ce recrutement va permettre un dispersement rapide de la membrane nucléaire durant la mitose. Il a aussi été montré que la Nup153 possède un rôle dans les étapes de l'apoptose. En effet, Nup153 est clivé par la caspase 3 entre les résidus 36 à 391 (Ferrando-May, 2001). La Nup153 interagissant avec la lamine, ce clivage va contribuer à la perte de la morphologie du noyau.

Cette protéine est aussi impliquée dans les étapes de l'export et de l'import de macromolécules au niveau du noyau. Il a été montré que Nup153 joue un rôle dans l'export des ARNm (Ullman, 1999), cependant il n'est pas encore très clair si la liaison aux ARNm se fait grâce au domaine RBD, qui se lie directement aux ARNs et plus particulièrement aux ARNs simple brin, ou si l'export se fait grâce au transporteur NXF1 qui peut se lier sur le domaine C-terminal de Nup153 (Bachi, 2000). De plus, cette protéine est aussi impliquée dans les étapes d'import, en effet, étant situé aux niveaux de l'anneau distal du panier nucléaire, elle est l'une des dernières protéines du NPC avec lesquels les transporteurs peuvent interagir lors de l'import. En effet, la Nup153 interagit avec beaucoup de partenaires (Figures 47 et 48), cependant les interactions qui nous intéressent sont celles qui ont lieu lors de l'import nucléaire.

<b>Protein transport</b>	
Importin- $\beta$	(Shah et al. 1998; Moroianu et al. 1995)
RanGTPase	(Nakielny et al. 1999; Saitoh et al. 1996)
Importin- $\alpha$ 2	(Moroianu et al. 1997)
Kap $\beta$ 3/RanBP5	(Yaseen and Blobel 1997)
Transportin-1	(Shah and Forbes 1998; Nakielny et al. 1999)
Crm1/Exportin-1	(Nakielny et al. 1999)
Importin-7/RanBP7	(Walther et al. 2003a)
Nup50/Npap60	(Smitherman et al. 2000)
NTF2	(Cushman et al. 2004)
<b>RNA transport</b>	
NXF1/TAP	(Bachi et al. 2000)
Exportin-t	(Kuersten et al. 2002)
Exportin-5	(Brownawell and Macara 2002)
eIF5A	(Hofmann et al. 2001)
<b>NPC/lamina</b>	
Nup160 complex	(Vasu et al. 2001; Walther et al. 2003a)
Tpr	(Hase and Cordes 2003)
Lamin B	(Smythe et al. 2000)
<b>Membrane remodeling</b>	
COPI	(Liu et al. 2003)
<b>Transcription factors</b>	
Smad2	(Xu et al. 2002)
Stat1	(Marg et al. 2004)
PU.1	(Zhong et al. 2005)
<b>Cellular regulation</b>	
Caspase-3 (inferred)	(Buendia et al. 1999; Ferrando-May et al. 2001)
SEN2 (SUMO protease)	(Hang and Dasso 2002; Zhang et al. 2002)
<b>Nucleic acid</b>	
DNA	(Sukegawa and Blobel 1993)
RNA	(Ullman et al. 1999; Dimaano et al. 2001; Ball et al. 2004)

**Figure 47:** Protéines interagissant avec la Nup153 (Ball, 2005).

Dans la littérature, il a été rapporté que l'importine  $\beta$  se lie avec les répétitions FxFG du domaine C-terminal (Moroianu, 1995) (Shah, 1998). Il a aussi été montré que la déplétion de la Nup153 entraînait une diminution drastique de l'import induit par le complexe importine  $\alpha$  / importine  $\beta$ , alors que l'import induit par les transportines ne subit aucun changement (Shah, 1998).



**Figure 48:** Interactions protéiques avec la Nup153 (Ball and Ullman 2005).

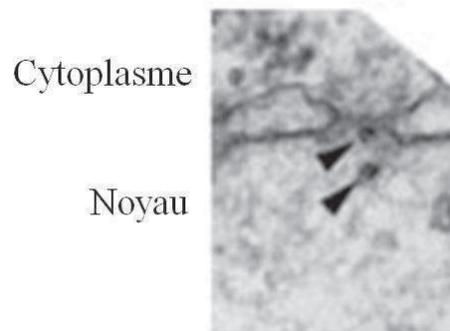
De plus, les structures en doigts de zinc du domaine central ont été montrées comme se liant à la protéine RAN GTP (Nakielny, 1999). Il semblerait donc que la Nup153 soit une des protéines qui joue un rôle important dans l'import des cargos possédant un NLS dont l'import serait réalisé par le complexe importine  $\alpha$  / importine  $\beta$ .

## VII. L'hypothèse de l'import :

Le virus de l'hépatite B possède un génome ADN ce qui signifie que ce dernier doit être importé dans le noyau pour que le virus puisse se répliquer. La capsidite qui contient le génome est donc transporté dans le cytoplasme jusqu'au noyau. Puis, il a été montré que la capsidite importe elle-même le génome dans le noyau, c'est-à-dire qu'elle traverse le NPC sans se désassembler jusqu'au panier nucléaire.

En effet, la capsidite possède sur chaque protéine core, dans leurs domaines C-terminal plusieurs régions riches en arginine qui ont été décrites comme des NLS (Li, Huang et al. 2010). Cependant seules les capsidites matures exposent ces NLS à leurs surfaces.

Il a aussi été montré que le NPC pouvait être traversé par un complexe d'import faisant une taille maximum d'environ 39 nm (Pante and Kann 2002). La capsidite faisant une taille de 36 nm au maximum pour la forme T4, celle-ci peut donc traverser le NPC, comme cela a été montré par des expériences de micro-injection des capsidites dans le cytoplasme des oocytes de xénope analysés par microscopie électronique (Figure 49).

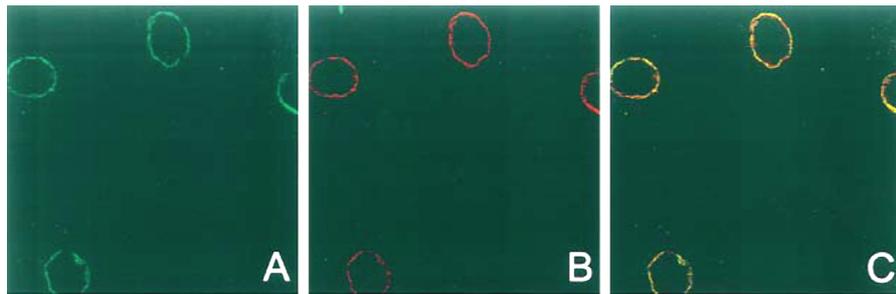


**Figure 49:** Image de microscopie électronique : vue de l'enveloppe nucléaire d'ovocyte de xénope micro-injecté avec de la capsidite immature (localisé par les flèches noires) (Rabe, 2003).

L'étude de l'import nucléaire de la capsidite est difficilement réalisable *in-vivo* sur des cellules après infection, c'est pourquoi la majorité des analyses sont réalisées soit sur des cellules perméabilisées avec de la digitonine, soit après lipofection des capsidites ou encore micro-injection de celles-ci.

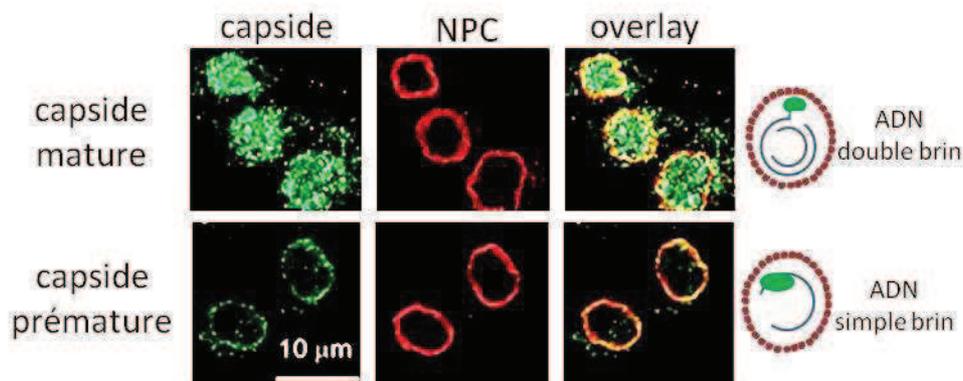
Les premiers tests d'import ont été réalisés, en 1999, sur des cellules perméabilisées avec des capsidites recombinantes exprimées chez *E. coli*. Ces capsidites possèdent une structure semblable aux capsidites matures, mais ne possèdent pas de génome à l'intérieur, seulement de

l'ARN bactérien encapsidé de façon aléatoire. Ces capsides n'ont pas leurs domaines C-terminal exposés à leurs surfaces. Cependant une phosphorylation *in-vitro* de celle-ci peut imiter la maturation et permettre au domaine contenant le NLS d'être exposé à la surface. Ainsi l'import des capsides recombinantes ne montre aucun signal, alors que l'import des mêmes capsides ayant subi une phosphorylation *in-vitro* montre un attachement à la membrane nucléaire (Figure 50) (Kann, 1999).



**Figure 50:** Test d'import nucléaire des capsides recombinantes phosphorylés (Kann, 1999): (A) marquage de la capside, (B) marquage des NPC et (C) Superposition des 2 images.

D'autres tests d'imports réalisés avec des capsides matures, et prématures ont montré que les capsides prématures se comportent de la même manière que les capsides recombinantes phosphorylées. Alors que les capsides matures qui contiennent un génome ADN double brin et sont phosphorylées montrent une fluorescence localisée dans le noyau (Figure 51) (Rabe, 2003).



**Figure 51:** Test d'import nucléaire des capsides Matures et Immatures (Rabe, 2003) : (vert) marquage de la capside, (rouge) marquage des NPC

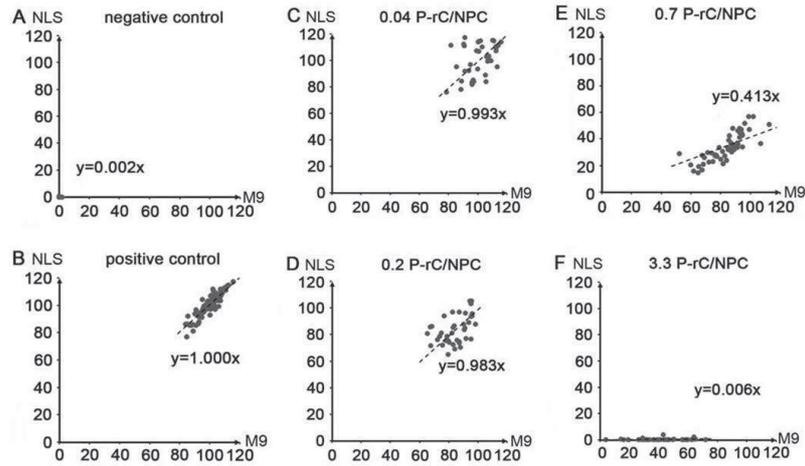
Des expériences de phosphorylation *in-vitro* avec du phosphate radioactif ont montré que seulement 12-24 protéines core sont phosphorylées lors de cette réaction. Cela est donc suffisant pour permettre à quelques domaines NLS d'être exposés à la surface.

Le NLS de la capsid est composé majoritairement d'arginine mais il va fonctionner comme un NLS dit "classique" qui lui comporte généralement des lysines. En effet, il a été montré que la capsid mature est importée dans le noyau grâce aux importines  $\alpha$  et  $\beta$ , et en présence de la protéine Ran (Rabe, 2003).

Une des questions auxquelles on a cherché ensuite à répondre est pourquoi les capsides qui présentent un NLS à la surface, comme les capsides recombinantes phosphorylées ou les capsides prématures, restent bloquées au niveau du panier nucléaire (Figure 48) ? L'une des hypothèses est que la capsid interagit avec une protéine du panier nucléaire. Une expérience d'immuno-précipitation, réalisée avec des billes saturées de capsid placées dans un extrait nucléaire, a permis de voir que la capsid se liait fortement à la Nup153 (Schmitz, 2010). Cette interaction se fait grâce au domaine C-terminal de la Nup153 qui est aussi le domaine se liant à l'importine  $\beta$ . Des expériences de compétition entre la capsid, l'importine  $\beta$  et la Nup153 montrent que la capsid possède beaucoup plus d'affinité pour la Nup153 que pour l'importine  $\beta$ . En effet, une fois que la capsid est liée à la Nup153, un excès important de l'importine  $\beta$  n'est pas suffisant pour détruire cette interaction.

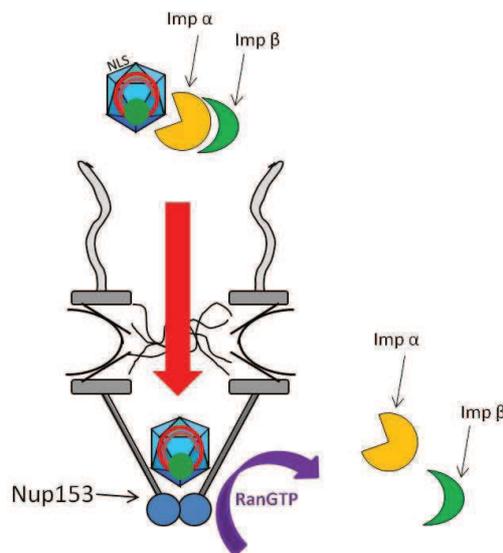
Des tests réalisés avec des SiRNA, qui permettent la diminution de 80 à 90 % de la fluorescence de la Nup153 obtenue par Immunofluorescence, permettent aussi une légère augmentation de la présence des capsides recombinantes phosphorylées dans le noyau, de l'ordre de 20 %.

Il a aussi été montré que cette interaction de la capsid avec la Nup153 peut inhiber l'import des NLS classiques alors que l'import réalisé par d'autres protéines comme la transportine fonctionne encore correctement (Figure 52) (Schmitz, 2010).



**Figure 52:** Concentration relative (en %) de la quantité de BSA-NLS (vertical) et de BSA-M9 (horizontal) par noyau en présence de différente quantité de P-rC (en  $\mu\text{g}$ ) (Schmitz, 2010.)

Un modèle a donc été proposé pour expliquer l'import de la capside du VHB. Celui-ci propose que les capsides matures, ou celles qui possèdent leurs domaines C-terminal à l'extérieur, soient prises en charge aux alentours du NPC par les importines  $\alpha$  et  $\beta$ . L'importine  $\beta$  va alors emmener tout le complexe au niveau du panier nucléaire où elle va se lier à la Nup153. A ce niveau, il est postulé que le complexe importé va être dissocié grâce à l'action de RAN GTP. Les protéines d'import vont être recyclées vers le cytoplasme, alors que la capside va se lier directement à la Nup153 (Figure 53).

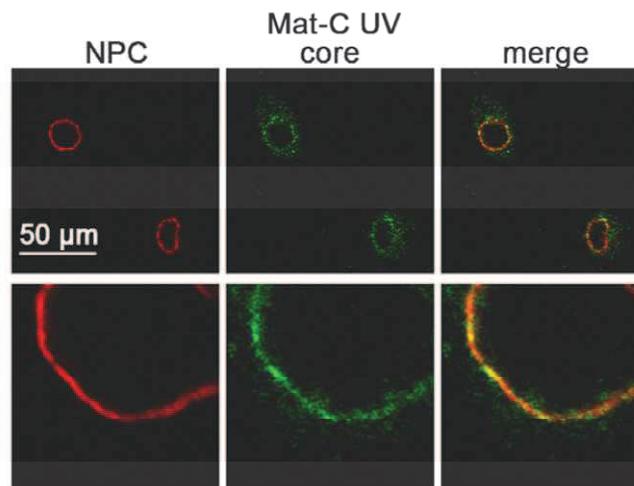


**Figure 53:** Modèle de l'import nucléaire de la capside du VHB

La capside possédant des NLS à sa surface est prise en charge par les importines  $\alpha$  et  $\beta$ , ce complexe va être importé jusqu'au panier nucléaire. Le complexe est dissocié par la protéine RanGTP et la capside va être stoppée en se liant à la Nup153.

## VIII. Désassemblage de la capside et libération du génome :

Le désassemblage de la capside permet à celle-ci de libérer son génome dans le noyau. Il semblerait que le désassemblage ait lieu dans le panier nucléaire au niveau de la Nup153. En effet des tests réalisés avec des capsides matures qui ont été cross-linkées par un traitement UV et qui ne peuvent donc plus se désassembler, restent bloquées au niveau des NPC alors qu'elles sont normalement importées dans le noyau (Figure 54).



**Figure 54:** Import nucléaire de capsides matures ayant subi un traitement au UV (Schmitz, 2010). En rouge : le NPC, en vert : la capside.

Ceci indique que le désassemblage de la capside a bien lieu au niveau du NPC et non dans le noyau, et que les capsides retrouvées dans le noyau sont issues d'un désassemblage.

L'hypothèse que nous avons émise pour ce mécanisme de désassemblage se base sur la stabilité de la capside, en effet, il a été décrit que les capsides recombinantes tronquées en C-terminus sont sujettes au phénomène de "capsid breathing", soit la respiration de la capside. Ce phénomène nécessite des interactions faibles entre les protéines Core qui constituent la capside. Pour respirer, la capside va se désassembler de façon transitoire et se reformer, les contacts entre sous-unités de la capside vont se rompre et du fait que la concentration est localement forte, il y a une reformation (Ceres, 2002).

Notre hypothèse est que ce phénomène de "capsid breathing", lorsqu'il a lieu au sein du panier nucléaire va déstabiliser la capside et permettre à un facteur nucléaire l'accès à l'ADNrc. Ce facteur permettra alors la libération du génome.

Nous pensons que ce facteur protéique impliqué dans la libération du génome peut être une des protéines impliqués dans l'étape qui suit la libération du génome et qui est la réparation / reconversion du génome (Figure 17).

De plus sachant que la capsid interagit avec la Nup153 dans le panier nucléaire (Schmitz, 2010), il nous a semblé logique de regarder le rôle de cette protéine dans l'étape de libération du génome.

# **Matériel et méthodes**

# I. Matériel

## 1. Anticorps :

Dénomination	Cible	Type	Source	Vendeur	Référence
anti-glutathionne S-transférase	GST	monoclonal	souris	BD Biosciences	554805
anti-polyhistidine	étiquette histidine	monoclonal	souris	Sigma	H11029
anti-karyophéine $\beta$	Importine $\beta$	monoclonal	souris	BD Biosciences	610559
anti-karyophéine $\alpha$ /Rch-1	Importine $\alpha$	monoclonal	souris	BD Biosciences	610485
anti-HBcAg	capside du VHB	polyclonal	Lapin	DAKO	BO586
Fab3105	capside du VHB	monoclonal	Souris	Institute of Immunology Co., LTD.	2AHC21
Mab414	Nucléoprotéine 62, 90 et 153	monoclonal	Souris	Abcam	ab24609
anti-glutathionne S-transférase	GST		Chèvre		
Streptavidine peroxydase	Biotine			Sigma	S2438
Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG	IgG de chèvre		Ane	Invitrogen	A11055
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG	IgG de lapin		Ane	Invitrogen	A21206
Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG	IgG de souris		Ane	Invitrogen	A21203
Peroxydase conjugated anti-mouse	IgG de souris			Jackson ImmunoResearch	715-035-151
Peroxydase conjugated anti-rabbit	IgG de lapin			Jackson ImmunoResearch	715-035-152
True blot anti IgG	IgG de souris			eBioscience	18-8817-33

## 2. Enzymes et Réactifs:

### a. Enzymes :

Enzymes	Fournisseurs	Références
Alcaline phosphatase	Promega	M1821
Créatine phosphate	Biochemika	27920
Créatine phospho kinase	Calbiochem	2384
DNase	Roche	104 159
Lysozyme	MP Biomedical	100834
Nucléase S7	Roche	10 107 921 001
Protéinase K	Roche	03 115 879 001
Protéine kinase C	Promega	V5261
T4 Ligase	Promega	M1801
T4 Polynucléotide Kinase	Promega	M4101

### b. Nucléotides :

Nucléotides	Fournisseurs	Références
ATP	Roche	11 140 965 001
ATP $\gamma^{32}\text{P}$	Perkin Elmer	BLU00225UC
dCTP $\alpha^{32}\text{P}$	Perkin Elmer	BLU013A250UC
GDP	Sigma	G7127
GTP	Sigma	G3776-25UMO
GTP $\gamma\text{S}$	Sigma	G8634

c. Autres :

Produits	Fournisseurs	Références
BSA	Sigma	A7906
Collagène	BD Bioscience	354236
Dabco	Sigma	D2522
Digitonine	Calbiochem	300410
DTT	MP Biomedical	856126
DMSO	Sigma	41639
IPTG	MP Biomedical	2102101
Mowiol	Sigma	35,459.0
PFA	MP Biomedical	150146
Phosphatidyl serine	Fluka	79405
Protéase inhibitor complete EDTA free	Roche	11 873 580 001
Protéase inhibitor complete mini EDTA free	Roche	11 836 170 001
Psoralène	Sigma	P8399

**3. Kits :**

Pour la purification de l'ADN :

- Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification system de chez Promega (réf : A1460)
- Quifilter Plasmid Midi Kit de chez Quiagen (réf : 12243)
- Endofree Plasmid Maxi Kit de chez Quiagen (réf : 12362)
- GeneJET™ Gel Extraction Kit de chez Fermentas (réf : K0691)
- QIAquick Nucleotide Removal Kit de chez Quiagen (réf : 28304)

Pour le marquage des capsides ou des Importines :

- EZ-Link NHS-PEG4 Biotinylation Kit de chez Pierce (réf : 21455)
- Alexa Fluor® 488 Microscale Protein Labeling Kit \*for 20-100 µg protein de chez Invitrogen (réf : A30006)
- Alexa Fluor® 594 Microscale Protein Labeling Kit \*for 20-100 µg protein de chez Invitrogen (réf : A30008)

#### **4. Plasmides :**

Dénomination	protéine exprimée	provenance
pGex	GST	
pGex-NLS	GST-NLS	
pGex2T-IBB	GST-IBB	Aurélia Cassany
pQE60	His-Importine $\beta$	Gorlich
pQE 70	His-Importine $\alpha$	Gorlich
pET11d	Ran	Harald Wodrich
pGex2T-Nup153	GST-Nup153	
pGex-Nup153N	GST-Nup153-N	Katie Ullman
pGex-Nup153Z	GST-Nup153-Z	Katie Ullman
pGex-Nup153C1	GST-Nup153-C1	Katie Ullman
pGex-Nup153C2	GST-Nup153-C2	Katie Ullman
pUC19-991	génomome VHB	

#### **5. Milieux cellulaires et antibiotiques :**

##### a. Pour les bactéries :

- Luria Broth (LB) : pour 1 L : 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl. Ce milieu doit être autoclavé avant son utilisation.
- Tryptone Yeast (TY) : Pour 1 L : 16 g de tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl. Ce milieu doit être autoclavé avant son utilisation
- LB agar + ATB : pour 1 L, 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl et 15 g d'agar. Ce milieu doit être autoclavé avant son utilisation et lorsque la température a suffisamment diminué (vers 55°C), on rajoute les antibiotiques souhaités, puis on coule le milieu dans des boîtes de Petrie à raison de 20 ml de milieu par boîte de 9 cm de diamètre.

##### b. Pour les cellules :

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de chez Gibco (réf : 31 966 021)
- Milieu complet : DMEM, Penicilline streptomycine (5 ml / 500 ml) (Gibco : 15140) et 5 % de sérum de veau fœtal (SVF)
- Trypsine de chez Gibco (réf : 25300)
- SFV de chez Gibco (réf : 10270-106)

## **6. Lignées cellulaires et espèces bactériennes :**

### **a. Lignées cellulaires :**

- HeLa, ce sont des cellules utilisé couramment au laboratoire
- HepG2.2.15, ce sont les cellules utilisé pour la production de virions
- Huh7, ce sont des cellules du foie

### **b. Espèces bactériennes**

- BL21 DE3 : ce sont des bactéries utilisées pour la surexpression des protéines, elles possèdent le lambda DE3 lysogen.
- Dh5 $\alpha$  : ce sont des bactéries utilisé pour l'amplification des plasmides, elles possèdent la mutation EndA1 qui diminue la dégradation des plasmides en inhibant l'action d'une endonucléase.
- Rosetta : ce sont des bactéries utilisées pour la surexpression des protéines possédant des codons rares.

## **7. Solutions utilisés :**

### **a. Solution communes :**

- PBS 1X: 137 mM de NaCl (8 g/L), 2.7 mM de KCl (0.2 g/L), 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.44 g/L) et 1.76 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.24 g/L). Le pH de la solution est ajusté à 7.4.
- Tampon de transport : 20 mM de HEPES, 2 mM de Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 110 mM de CH<sub>3</sub>COO<sub>2</sub>K, 5 mM de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, 1 mM d'EGTA et 2 mM de DTT

### **b. Solution pour la préparation de bactéries compétantes :**

- Tampon 1 : 100 mM de ClRb (chlorure de rubidium), 50 mM de MnCl<sub>2</sub> (chlorure de manganèse), 30 mM de CH<sub>3</sub>COOK (acétate de potassium), 10 mM de CaCl<sub>2</sub> (chlorure de calcium) et 15 % de glycérol. Ce tampon doit posséder un pH de 5,8.
- Tampon 2 : 10 mM de MOPS, 10 mM de ClRb (chlorure de rubidium), 75 mM de CaCl<sub>2</sub> (chlorure de calcium) et 15 % de glycérol.

c. Solutions pour purification des protéines :

Pour la purification des protéines GST

- Tampon de lyse GST : 50 mM de Tris HCL, 2 mM d'EDTA, 10 µg/ml de Lysozyme et 0,1 % de Triton X100. Le pH de la solution est ajusté à 8.
- Tampon de lyse GST-IBB : 5 % glycérol, 50 mM de Tris pH 8, 0.5 M de NaCl, 1 mM de Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (magnésium acétate), 2 mM de DTT, 0.1 % de Triton X100, 1 mg/ml de lysozyme et une tablette d'anti-protéase. (ces 2 derniers doivent être rajoutés au dernier moment)
- Elution buffer GST: 50 mM de Tris HCL, 10 mM de Glutathion réduit et à pH 8.
- Solution de dialyse GST: 50 mM de Tris HCL, 50 mM de NaCl, 5 % de Glycérol, 2 mM de DTT et 250 mM de Sucrose. Le pH de la solution est ajusté à 7,5.

Pour la purification de l'Importine α :

- Tampon de lyse Imp α : 200 mM de Tris HCL, 500 mM de NaCl et 5 mM de β-mercaptoéthanol, ainsi qu'une tablette d'anti-protéase à rajouter juste avant utilisation (1 pour 50 ml ou 1 mini pour 10 ml).
- Tampon de lavage Imp α: 500 mM de NaCl et 30 mM d'imidazole
- Tampon d'éluion Imp α: 500 mM de NaCl et 500 mM d'imidazole

Pour la purification de l'Importine β :

- Tampon de lyse Imp β: 50 mM de Tris HCL à pH 7,5, 200 mM de NaCl, et 5 mM de β-mercaptoéthanol, 1 mM de PMSF ainsi qu'une tablette d'anti-protéase à rajouter juste avant utilisation.
- Tampon Urée Imp β: 50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 M d'Urée, 10 mM d'imidazole, 300 mM de NaCl et 5 mM de β-mercaptoéthanol ainsi que 1 mM de PMSF à rajouter juste avant utilisation.
- Refolding Buffer Imp β: 50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM d'imidazole, 300 mM de NaCl et 5 mM de β-mercaptoéthanol ainsi que 1 mM de PMSF à rajouter juste avant utilisation.
- Elution buffer Imp β: 50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM d'imidazole, 300 mM de NaCl
- Solution de dialyse Impβ: 50 mM de Tris HCL, 50 mM de NaCl, 5 % de glycérol, 2 mM de DTT et 250 mM de sucrose.

Pour la purification de Ran :

- Tampon de lyse Ran: 50 mM de Tris HCL à pH 8,5, 75 mM de NaCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 1 mg/ml de lysozyme, 10 µg/ml de DNase I et une tablette d'anti-protéase.

Pour la purification de GST-Nup153 humaine :

- Tampon de lyse GST-Nup153: PBS1X, 10 mM de DTT, 1 pastille de cocktail antiprotéase
- Tampon de dialyse GST-Nup153: 50 mM de NaCl, 50 mM de Tris HCl, 2 mM de DTT, 250 mM de sucrose et 50 % de glycérol. Le pH de la solution est ajusté à 7,5.

Pour la purification des fragments GST-Nup153-C2 :

- Tampon de lyse GST-fragment de Nup153: 50 mM de Tris à pH8, 500 mM de NaCl, 2 mM de DTT, 5 % de glycérol, 1 mg/ml de lysozyme, 10 µg/ml de DNase, 0.1 % de Triton X100 et une pastille de cocktail antiprotéases.

d. Solution pour la purification des capsides extracellulaire et intracellulaire

- TNE-NP40-Sucrose : 10 mM de Tris ajusté à pH 8, 100 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 25 % de sucrose et 0.75 % de NP40.

e. Solutions pour SDS-PAGE, PAGE et Transfert :

Pour les gels d'agarose :

- TAE : 40 mM de Tris-Acétate et 1 mM d'EDTA
- Bromure d'éthidium : solution à 4 µg/ml

Pour les gels SDS PAGE :

- Tris-Glycine-SDS : 250 mM de Tris HCL, 1,92 M de glycine et 1 % de SDS. Le pH de la solution doit être ajusté à 8,3.
- Tampon de concentration 2X : 250 mM de Tris HCl et 0.2 % de SDS. Le pH doit être ajusté à 6,8.

- Tampon de migration 2X : 750 mM de tris HCl et 0.2 % de SDS
- Bleu de charge dénaturant : 200 mM de Tris à pH 6,8, 8 % de SDS, 40 % de glycérol et 0,2 % de Bleu de bromophénol.
- Solution de Coloration au Bleu de Coomassie : 0,25 % de bleu de Coomassie, 45 % de méthanol et 10 % d'acide acétique.
- Solution de décoloration : 20 % de méthanol et 5 % d'acide acétique

Pour les Western Blot :

- Solution de transfert pour Western Blot en milieu liquide : 10 % de la solution stock 10X (30 g de Tris et 144 g de glycine ajuster à pH 8,5) et 15 % de méthanol.
- Solutions pour le transfert semi-sec :
  - Tampon Anode I : 0,3 M de Tris Base à pH 10,4 et 20 % d'éthanol
  - Tampon Anode II : 25 mM de Tris Base à pH 10,4 et 20 % d'éthanol
  - Tampon Cathode : 25 mM de Tris Base à pH 9,4, 40 mM de Glycine et 20 % d'éthanol.
- 10X SSC : 1,5 M de chlorure de sodium et 150 mM de citrate de sodium
- Solution de Blocage : PBS 1X, 5 % de lait ou 2,5 % de BSA
- Solution de lavage : PBS 1X et 0.1 % de Tween 20

Pour le séchage des gels :

- Solution de séchage pour les gels : 12 % d'éthanol et 3 % de glycérol

f. Solution pour la modification des capsides :

- Tampon de polymérisation 2X : 100 mM de Tris à pH 8, 200 mM de MgCl<sub>2</sub> et 100 mM de NH<sub>4</sub>Cl
- Tampon PKC 2X : 40 mM Hepes à pH 8, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3,4 mM de CaCl<sub>2</sub> et 2 mM de DTT.

g. Solution pour l'essai d'import nucléaire :

- Collagène : 50 µg/ml de collagène dilué dans de l'eau, 0,02 M d'acide acétique

- Digitonine : 10 % dans DMSO
- Solution de lavage : 1X du tampon de transport, 2 mM de DTT, 0,5 % de BSA et 5 % de sérum de veau fœtal.
- PFA 4 % : 4 g de PFA sont dilués dans 50 ml d'eau et chauffés à 60°C. La solubilisation du PFA est aidée par quelques gouttes de NaOH à 1 M. Lorsque le PFA est totalement solubilisé, 10 ml de PBS10X sont ajoutés et la solution est ajustée à 100 ml. Le pH de la solution doit être de 7,2.
- Solution de blocage : 1X de PBS, 0,5 % de BSA et 5 % de sérum de veau fœtal.
- DAPI : 1/1000<sup>ème</sup> de la solution stock à 1mg/ml diluée dans du PBS
- Mowiol : Dans un récipient en verre, on mélange 2,4 g de mowiol, 6 g de glycérol et 6 ml d'eau avec un barreau magnétique durant 2 heures à température ambiante, puis cette solution est chauffée 10 minutes à 56°C. On ajoute ensuite 6 ml de Tris à 200 mM avec un pH de 8,5. On mélange encore pendant 15 minutes à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée 10 minutes à 4000g pour retirer les bulles. Puis la solution est aliquotée en tube de 1 ml.

h. Solution pour le marquage du génome des capsides matures :

- Psoralène : solution à 50 pmol/μl, 1 mg de psoralène repris dans 100 μl de DMSO

## 8. Colonne

Colonne d'affinité :

- GSTrap<sup>TM</sup> FF Column (1 ml) de chez GE Healthcare (réf : 17-5130-01)
- HisTrap<sup>TM</sup> FF Columns (1 ml) de chez GE Healthcare (réf : 17-5319-01)

Colonne d'exclusion de taille :

- Superose<sup>TM</sup> 12 10/300 GL Columns de chez GE Healthcare (réf : 17-5173-01)
- Superdex 75 PC 3.2/30 de chez GE Healthcare (réf : 17-0771-01)

Colonne d'échange d'ions :

- Colonne DEAE : réalisée avec la matrice : DE52 Pre-swollen Microgranular Anion Exchanger de chez Whatman (réf : 4057-050)

Colonne pour pour la purification de l'ADN :

- Illustra Microspin™ G-50 Columns de chez GE Healthcare (réf : 27-5330-01)
- Illustra Microspin™ G-25 Columns de chez GE Healthcare (réf : 27-5325-01)

Colonne de désalage:

- Zeba™ Spin desalting Columns 7K MWCO, 5 ml, de chez Thermo Scientific (réf : 89891)
- Zeba™ Spin desalting Columns 7K MWCO, 0,5 ml, de chez Thermo Scientific (réf : 89882)

## **9. Machines :**

Les HPLC :

- AKTA purifier de GE Healthcare
- ETTAN™ LC de GE Healthcare

Spectrophotomètre :

- NanoDrop 1000 de Thermo scientific
- Spectrophotomètre de Thermo Electron Corporation, Spectronic Genesys 10 Bio

Centrifugeuse :

- Centrifugeuse de paillasse Heraeus Pico 17
- Centrifugeuse Sigma 4K15, avec le rotor 11150
- Centrifugeuse Sorwall RC5B avec le rotor SLC4000
- Ultracentrifugeuse Beckman Coulter Optima L-100XP avec le rotor SW55Ti
- Ultracentrifugeuse Beckman du P3

Incubateur :

- Agitateur/Incubateur de bactériologie : HT Infors Minitron
- Incubateur de bactériologie de chez Jouan
- Bloc chauffant de chez Stuart (réf : SBH130D)

Sonicateur :

- Sonicateur : Microson Ultrasonic cell disruptor XL de Misonix

Migration et transfert :

- Générateur Fisher Scientific FB30 Apelex PS202
- Cuve agarose de chez Biorad
- Cuve pour les gels SDS-PAGE de chez Biorad
- Système de transfert liquide Invitrogen
- Système de transfert semi-sec Biorad
- Système de transfert sous-vide : Appligen vaccum blotter

Lecteur de gel :

- Gel Doc de chez Biorad
- Chemidoc de chez Biorad
- Pharos de chez Biorad

Microscope confocal :

- Confocal SP5 Leica

Lecture des films :

- Développeuse Curix 60 de chez Agfa

Lampe UV :

- Lampe UV de chez Bioblock Scientific avec 2 longueurs d'excitation (254 nm et 365 nm)

## II. Méthodes

### 1. Transformation des bactéries

#### a. Préparation de bactérie compétente :

Un clone bactérien estensemencé dans 30 ml de LB qui sont ensuite incubés une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, 5ml de la suspension bactérienne sont ajoutés aux 200 ml de LB nécessaires pour préparer les bactéries compétentes. La culture de 200 ml est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> de 0,5. Lorsque cette DO est obtenue, les 200 ml sont répartis en quatre tubes de 50 ml et placés dans de la glace pendant 15 minutes. Puis les bactéries sont récupérées par centrifugation 5 minutes à 3000g et à 4°C. Les quatre culots récupérés sont regroupés et resuspendus dans 16 ml de tampon 1. Cette suspension est alors incubée dans la glace pendant 15 minutes. Les bactéries sont ensuite récoltées par centrifugation 5 minutes à 3000g et à 4°C. Le culot est cette fois repris dans 16 ml de tampon 2 puis rapidement distribué en aliquotes de 100µl qui sont conservées à -70°C.

#### b. Transformation des bactéries :

Une aliquote de bactéries compétentes est décongelée sur la glace. Puis le vecteur d'ADN que l'on souhaite introduire dans la bactérie est ajouté dans le tube fraîchement décongelé. La quantité de vecteur varie en fonction du type de vecteur, généralement 1 µl d'une solution contenant entre 100 ng/µl à 1 µg/µl. Ce mélange est ensuite incubé 30 minutes dans la glace avant d'effectuer le choc thermique qui va permettre à l'ADN de rentrer dans la bactérie. Le choc thermique correspond à une incubation de 45 secondes à 42°C suivi de 2 minutes dans la glace. Une fois cette étape effectuée, 1ml de LB est rajouté au mélange qui est ensuite incubé 1 heure à 37°C sous agitation. Cette étape va permettre de restaurer le métabolisme et la croissance de la bactérie, ce qui va permettre aussi l'expression de la résistance aux antibiotiques utilisés ensuite pour sélectionner les bactéries ayant incorporé le vecteur. En effet, après l'heure d'incubation, les bactéries sont isolées sur une gélose LB contenant l'antibiotique choisit pour la sélection des bactéries transformées. Cette gélose est incubée dans une étuve toute la nuit à 37°C. Les colonies trouvées correspondent donc à des clones bactériens comportant le plasmide désiré.

## **2. Amplification et purification des plasmides :**

Afin d'augmenter la quantité d'un plasmide souhaité, nous effectuons une transformation de ce plasmide dans des bactéries de souche DH5 $\alpha$ . Cette souche bactérienne est fréquemment utilisée en biologie moléculaire car elle possède des mutations favorisant l'amplification des plasmides. Après la transformation de ces bactéries avec le plasmide souhaité, nous avons isolé les bactéries sur une gélose LB contenant l'antibiotique nécessaire à la sélection. Puis une colonie de ces bactéries transformées est ensuite récupérée et placée dans du milieu LB liquide avec l'antibiotique approprié. Cela va permettre la croissance des bactéries et ainsi l'amplification du plasmide. Le volume de culture nécessaire va dépendre de la quantité de plasmide voulue. En effet, la purification du plasmide se fait grâce à des kits qui nécessitent des volumes de culture différents. Par exemple, pour obtenir environ 20 $\mu$ g de plasmide, nous inoculons 5ml de LB puis nous effectuons la purification grâce au kit de Promega Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification system. Cependant pour obtenir de plus grande quantité nous utilisons les kits Quiagen, Quiafilter Plasmid Midi Kit pour 100 $\mu$ g de plasmide à partir d'une culture de 50ml, le kit Endofree Plasmid Maxi Kit pour 500 $\mu$ g de plasmides à partir de 100ml de culture.

Une fois le plasmide récupéré, nous déterminons sa concentration par spectrophotométrie (NanoDrop), et il est vérifié par digestion avec des enzymes de restriction coupant à des localisations précises et donnant des fragments de taille connue qui pourront ensuite être visible sur gel d'agarose marqué au bromure d'éthidium.

## **3. Clonage des plasmides :**

La majorité des plasmides présentés par la suite était déjà présent au laboratoire, cependant certaines protéines ne possédait pas la bonne étiquette pour la suite des expériences. C'est pour cette raison qu'il a fallut effectuer le clonage de nouveaux plasmides (effectué par Dominique Bégu).

### a. Core et Core C183S

Les séquences des gènes codant pour la protéine Core et Core C183S ci-dessous (Figures 55 et 56), contiennent 552 bases, qui ont été optimisées pour la surexpression de ces protéines en bactéries.

```
ATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCGTTTTTGCCCTTCTGACTTCTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTA
TCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATACTGTGCTGGGGGGAATAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGGTA
ATTTGGAAGATCCAATATCCAGGGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAAATTCAGGCAACTATTGTGGTTTACATTCTTGTCTCACTTTTGGAA
GAGAAACAGTTATAGAGTATTGGTGTCTTTGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGT
TCGTCGTCGTGGCCGTTCCCTCGTCGTCGTAATCCCTCGCTCGCCGTCGTCGTTCTCAATCGCCGTCGCCGTCGTTCTCAATCTCGTGAATCTCAATGTTAG
```

**Figure 55:** Séquences de l'ADN codant pour la protéine Core

La séquence de l'ADN codant pour la protéine Core C183S est identique à l'exception du codon codant pour la cystéine en position 183 qui a été remplacé par celui codant pour une sérine.

```
ATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCGTTTTTGCCCTTCTGACTTCTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTA
TCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATACTGTGCTGGGGGGAATAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGGTA
ATTTGGAAGATCCAATATCCAGGGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAAATTCAGGCAACTATTGTGGTTTACATTCTTGTCTCACTTTTGGAA
GAGAAACAGTTATAGAGTATTGGTGTCTTTGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGT
TCGTCGTCGTGGCCGTTCCCTCGTCGTCGTAATCCCTCGCTCGCCGTCGTCGTTCTCAATCGCCGTCGCCGTCGTTCTCAATCTCGTGAATCTCAAAGTTAG
```

**Figure 56:** Séquence de l'ADN codant pour la protéine Core C183S

Ces ADN étaient disponibles au sein du laboratoire dans le plasmide pI826. Nous avons donc souhaité les insérer dans un plasmide pGex, ce qui permettra de fusionner la protéine GST en N-terminal des protéines Core mutée ou non.

L'ADN codant pour les protéines Cores et Core C183S ont donc été amplifiées par PCR grâce aux amorces suivantes :

- Core(+/- C183S) sens : 5'- CCATGGACATTGATCCTTAT - 3'
- Core(+/- C183S) antisens 5'- CCCGGGCGTAGAGGATCCTTACTA - 3'

Puis ces amplifiats ont été insérés entre les sites NcoI et SmaI du pGex.

Ces constructions ont été vérifiées par séquençage.

### b. Core ΔCter

Nous souhaitons obtenir une protéine Core dépourvue de la partie C-terminale qui contient les différents NLS de la protéine. Donc, à partir du plasmide pGex-Core, nous avons effectué 2 coupures par les enzymes de restriction BspEI et XmaI qui génèrent des bouts cohésifs, qui

vont donc être compatibles. Après avoir effectué une purification sur gel grâce au kit de gel extraction, le vecteur pourra ensuite être religué par la ligase T4. Ce plasmide servira ensuite à transformer des bactéries Dh5 $\alpha$  ce qui permettra l'amplification de celui-ci. Cette construction sera ensuite vérifiée par séquençage.

#### c. GSTS-Nup153 C-terminal humaine

La séquence codant pour la Nup153 C-terminal humaine est composée de 2601 bases. Cette séquence est présente dans le vecteur pET28a, ce qui signifie que la protéine exprimée possèdera une étiquette histidine en C-terminal.

Cependant, pour la suite de nos expériences, une étiquette GST est nécessaire. C'est pour cette raison que ce cadre de lecture après avoir été amplifié par PCR a été inséré dans un vecteur pGex. Les amorces utilisées pour la PCR sont les suivantes:

- Nup153C-terH sens 5'-CCATGGCTAGCATGACTGGTGG-3'
- Nup153C-terH antisens 5'-CCCGGGCACCAGCTGTTGTTAA-3'

Ce plasmide nouvellement créé a bien sûr été séquençé afin de vérifier que la protéine exprimée par la suite correspond bien au C-terminal de la Nup153 humaine.

## **4. Surexpression et Purification des protéines :**

#### a. GST et GST-NLS:

Les bactéries BL21(DE3) sont transformées avec le plasmide pGEX-NLS ou pGEX, déjà présents au sein du laboratoire. Puis les bactéries sont cultivées dans le milieu LB avec 100 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Pour cela 1 L de la culture bactérienne est incubé à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> de 0,6. Lorsque cette absorbance est atteinte, la production des protéines est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG. Cette induction est réalisée à 37°C sous agitation pendant 3 heures. La concentration d'IPTG et le temps d'induction ont été déterminés avant en effectuant des tests d'induction de la protéine. Par la suite, les bactéries sont finalement récupérées par centrifugation (5 min à 5000 g). Si la purification ne se fait pas directement après, le culot bactérien peut être stocké à -20°C.

Afin de commencer la purification de GST ou GST-NLS, le culot bactérien est repris dans 15 mL de solution de lyse (GST tampon de lyse) puis il est soniqué pendant 6 secondes et cela 6 fois de suite à une puissance de 7 sur le sonicateur. Ces étapes doivent être effectuées dans la

glace pour limiter l'action des protéases bactériennes. Le lysat bactérien est ensuite centrifugé 15 minutes à 12000 g et à 4°C, pour séparer la fraction soluble de la fraction insoluble.

La purification des protéines GST ou GST-NLS est réalisée à partir de la fraction soluble par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap<sup>TM</sup> FF installée sur une chaîne FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), l'AKTA Purifier de GE Pharmacia, le PBS est utilisé pour le lavage pendant 5 volumes de colonne et l'élution se fait grâce au GST élution buffer. Le flux est réglé à 1 ml/min et l'élution se fait grâce à une augmentation de 10 mM de glutathion réduit. La pureté des fractions obtenues est vérifiée par SDS PAGE et par WB grâce aux anticorps anti-GST (dilution au 1/3000). La protéine GST fait une taille de 26 kDa et la GST-NLS est une protéine de 28 kDa.

Les fractions choisies sont ensuite rassemblées et dialysées dans la solution de dialyse (GST tampon de dialyse).

#### b. GST IBB :

Le plasmide pGex2T-IBB a été construit par insertion du domaine N-terminal de l'importine  $\alpha 1$  humaine (des résidus 1 à 65) entre les sites de restriction pour les enzymes BamHI et EcoRI.

La surexpression de cette protéine se fait dans 1 L de culture, en milieu LB avec ampicilline, incubé à 37°C sous agitation. Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0.6, l'induction est alors initiée par addition d'IPTG à 50  $\mu$ M final. L'induction se poursuit 2 heures toujours à 37°C. Puis les bactéries sont récoltées par centrifugation 5 minutes à 5000 g. Les culots bactériens obtenus peuvent être stockés à -20°C (Cassany, 2009).

Les culots sont ensuite repris dans la solution de lyse à raison de 15 ml pour 1 L de culture. Cette solution va ensuite subir une étape de congélation / décongélation, suivie par une étape de sonication de 4 fois 10 secondes dans la glace. Le lysat bactérien résultant est centrifugé pendant 20 minutes à 15000 g. La purification se fait sur colonne GSTrap<sup>TM</sup> FF sur le système HPLC (AKTA). La purification se fait de la même manière que pour la protéine GST seule.

Les fractions obtenues sont par la suite analysées en gel SDS PAGE coloré au Coomassie. La protéine GST-IBB possède une taille d'environ 36 kDa. Les fractions les plus pures et les plus concentrées sont rassemblées et dialysées dans la solution de dialyse pour les protéines GST. Les protéines obtenues sont donc quantifiées (voir partie correspondant) et stockées à -80°C.

c. Importine  $\alpha$  :

La surexpression de l'importine  $\alpha$  se fait dans les bactéries *E. coli* XL1-blue qui ont été transformées avec le plasmide RCH1 qui exprime l'importine  $\alpha$  avec une étiquette histidine en C terminal. La production de l'importine  $\alpha$  se fait dans 1 L de culture en milieu LB, qui est incubé à 37°C sous agitation. L'induction avec 2 mM d'IPTG se fait lorsque la DO<sub>600</sub> atteint 0,9 d'absorbance et se prolonge pendant 3 heures à 37°C sous agitation. A la fin de l'induction, on ajoute 2 mM de PMSF et la culture est placée dans la glace pendant 10 minutes. Puis on récupère le culot bactérien en centrifugeant 10 minutes à 4000 g. Ce culot bactérien est ensuite repris dans 10 mL de solution de lyse (Imp $\alpha$  tampon de lyse) et les bactéries seront cassées par une succession de congélations et de décongélations alternées. Cela correspond à 15 minutes à -70°C, suivie d'une étape de 15 minutes à 37°C dans un bain-marie et cela est répété deux fois. Le lysat bactérien obtenu est alors placé dans la glace et est soumis à une étape de sonication (puissance 7) pendant 1 minute et cela 4 fois de suite. La solution est ensuite centrifugée 20 minutes à 20000g et à 4°C. La fraction soluble est ensuite récupérée et on ajoute 10 mM final d'imidazole à pH 7,6.

Cette fraction soluble est ensuite injectée sur une colonne de nickel, HisTrap™ FF, sur le système FPLC avec un flux de 1ml/min. Les lavages se font avec cinq volumes de colonne de la solution de lavage pour l'importine  $\alpha$ . Puis l'élution se fait avec un gradient linéaire d'imidazole (de 30 mM – 500 mM) grâce à la solution d'élution pour l'importine  $\alpha$ .

Les fractions obtenues sont ensuite analysées sur gel SDS PAGE coloré au coomassie ou transféré sur membrane afin de visualiser la protéine grâce aux anticorps anti-polyhistidine ou anti-karyopherine  $\alpha$ /Rch-1 (dilué au 1/3000<sup>ème</sup>).

Les fractions contenant le plus d'importine  $\alpha$  sont soumis à une chromatographie d'exclusion de taille, sur la colonne Superose 12. Cette colonne est équilibrée avec un volume de colonne de PBS1X filtré, soit 24 ml. Le flux utilisé est à 0.2 ml/min et la récupération des fractions se fait environ 7 ml après le début de l'injection. Les fractions ainsi récupérées sont bien sûr analysées et celles qui conviendront le mieux sont rassemblées et aliquotées. Ces aliquotes sont stocker à -80°C.

#### d. Importine $\beta$ :

Les bactéries M15 sont transformées avec le plasmide pQE60-Imp $\beta$ . A partir d'un stock glycérol provenant du laboratoire du Professeur Görlich, nous préparons 100 ml de culture dans du milieu TY auquel nous avons rajouté 2 % de glucose ainsi que les antibiotiques kanamycine (50  $\mu\text{g/ml}$ ) et ampicilline (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Cette culture est incubée toute la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain matin, nous ajoutons 400 ml de milieu TY préchauffé, auquel nous rajoutons 0.2 % glucose ainsi que les antibiotiques. Puis nous laissons les bactéries se développer jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm soit égale à 1. Lorsque cette densité optique est obtenue nous effectuons l'induction pour la production des importines  $\beta$ . Pour cela nous rajoutons à la culture 500 ml de LB, 4 % éthanol, 0.2 % glucose et 1 mM d'IPTG final. L'induction se fait pendant 3 heures à 18°C sous agitation.

Finalement les bactéries sont centrifugées pendant 5 minutes à 5000 g et le culot bactérien est lavé avec du PBS1X puis il est conservé pour la purification de la protéine.

Le culot est ensuite repris dans la solution de lyse pour l'importine  $\beta$ , puis la solution est soniqué 10 secondes à une puissance de 7, 6 fois toutes les 50 secondes dans la glace. Afin de récupérer la fraction insoluble, les lysats bactériens sont centrifugés 20 minutes à 20000 g et à 4°C. Le culot est resuspendu dans le tampon urée (10 ml). Une deuxième étape de centrifugation est réalisée pendant 10 minutes à 13000 g. Le surnageant est ensuite passé sur une colonne de Nickel HisTrap™ FF. Les tampons utilisés pour la colonne sont le tampon urée pour l'injection et les lavages, puis on diminue la concentration en urée afin que les protéines reprennent leur forme native grâce au refolding buffer. Lorsque la concentration d'urée est totalement descendue, nous effectuons un autre gradient avec le tampon d'élution qui contient une forte quantité d'imidazole afin de décoller les protéines de la matrice de nickel.

Les fractions les plus intéressantes seront ensuite analysées puis rassemblées afin de les dialyser. La concentration est ensuite déterminée et la solution protéine est aliquotée et stockée à -80°C.

#### e. Ran

Le vecteur utilisé pour la production de Ran est un pET11d où la séquence codant pour la protéine Ran a été insérée entre les sites de restriction des enzymes NcoI et BamHI. Le plasmide est ensuite utilisé pour transformer des bactéries E.coli de la souche BL21 (DE3).

Les bactéries ainsi transformées sont ensemencées dans 2 L de milieu LB contenant de l'ampicilline qui est incubé à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,6. Lorsque cette absorbance est atteinte, l'induction est effectuée par 0,5 mM d'IPTG pendant 2 heures à 37°C et sous agitation. A la fin de l'induction, la culture est centrifugée 15 minutes à 5000 g et à 4°C. Le culot bactérien peut être stocké à -20°C en attendant la purification.

Le culot correspondant à 1L de culture est repris dans 50 mL de tampon de lyse et est placé dans la glace afin d'éviter l'action des protéases. Le culot est resuspendu en vortexant la solution puis on laisse incubé 30 minutes dans la glace pour permettre la lyse des bactéries.

Afin de récupérer la fraction soluble, le lysat bactérien est centrifugé à 25000 rpm pendant 2 heures et à 4°C avec le rotor SWA641. Le surnageant est récupéré puis il est chargé sur une colonne de DEAE.

Cette colonne doit être préparée pendant la lyse ou la veille, 5 g de DE52 sont resuspendus dans 50 mL d'eau et lavés 3 fois en centrifugeant à 4000 g pendant 10 min. La matrice est ensuite lavée avec du Tris 1 M à pH 8, puis avec le tampon de lyse. La matrice est ensuite placée dans la colonne et doit correspondre à 10 ml une fois tassée.

Donc le surnageant est passé sur la colonne, la fraction non retenue est récupérée ainsi que les 10 ml du lavage effectué avec le tampon de lyse. On obtient donc un volume d'environ 65 ml que l'on sature avec 65 % d'ammonium de sulfate solide (soit 26.26 g pour 65 ml), on laisse la solution se mélanger avec un barreau magnétique pendant une nuit à 4°C. Pour récupérer les protéines précipitées on centrifuge le mélange à 25000 rpm pendant 20 minutes à 4°C dans le rotor Sorwall A641. Les culots sont repris dans 2ml de tampon de transport puis filtrés sur un filtre de 0.22 µm. Ce filtrat est ensuite injecté sur une colonne d'exclusion de taille, la Superdex 75. Les fractions contenant du Ran sont rassemblées et stockées à -80°C (Cassany, 2009).

f. Fragment de la Nup153 : GST-Nup153-C2 et GST-Nup153-C

Le fragment de la Nup153 C2 (992-1219) est dérivé de la Nup153 du Xénope. Les acides aminés indiqués correspondent au clone partiel de la protéine tel qu'il est enregistré dans Genbank sous le nom [gi: 3047240]. La Nup153 C terminal humaine correspond aux acides aminés 609 à 1475 de la Nup153 WT humaine. Les fragments ont été fusionnés à une étiquette GST. Ces plasmides sont donc introduits dans la souche Rosetta. Pour la surexpression de ces protéines, 1 Litre de culture est ensemencé pour chaque fragment, auquel

nous avons rajouté l'ampicilline et le chloramphénicol. La culture est incubée à 37°C jusqu'à obtention d'une absorbance à 600 nm de 0,6. A ce moment, l'induction est lancée grâce à l'ajout de 1 mM d'IPTG et la culture est incubée à 37°C pour encore 3 heures. Les bactéries sont ensuite récupérées par une centrifugation de 15 minutes à 5000 g. Les culots sont stockés à -20°C avant la purification.

Chaque culot est repris dans 10 ml de la solution de lyse puis placé dans la glace. Ces lysats sont soniqués pendant 10 secondes puis placés dans la glace pendant 50 secondes et cette étape est répétée 4 fois. La fraction soluble est ensuite récupérée en centrifugeant le lysat pendant 20 minutes à 20000 g et à 4°C.

Les lysats sont ensuite injectés sur la colonne GSTrap FF 1 ml. (voir la purification de GST et GST-NLS).

Les échantillons sont ensuite analysés en Coomassie et en Western Blot avant de rassembler les fractions et de les dialyser dans de la solution de transport, plus 15 % de glycérol.

Les protéines sont ensuite aliquotées et stockées à -80°C.

#### g. GST-Core, GST-Core C183S et GST-Core $\Delta$ Cter :

Les bactéries de souche Rosetta doivent être transformées fraîchement avec les plasmides, car les stocks glycérolés repartent très difficilement avec cette construction. Les bactéries sontensemencées dans 1 L de LB avec de l'ampicilline et du chloramphénicol et sont incubés à 37°C. Lorsque l'absorbance à 600nm atteint 0,8, l'induction est lancée avec l'ajout de 1 mM d'IPTG puis la culture est placée à 16°C pendant 3 jours sous agitation. A la fin de l'incubation, le milieu est centrifugé 15 minutes à 5000 g et à 4°C. Les bactéries situées dans le culot sont récupérées et stockées à -20°C.

La suite de la purification s'effectue de la même manière que pour les fragments de la Nup153.

## **5. Préparation des capsides extracellulaires et intracellulaires**

### a. Culture des cellules au P3 :

La production des capsides virales s'effectue grâce aux cellules HepG2.2.15 que nous cultivons au sein du laboratoire de niveau de sécurité 3 (P3).

Afin de commencer la culture des cellules nous décongelons rapidement (par incubation au bain-marie à 37°C) un tube de 1ml de cellule stocké au -115°C qui sera ensuite mélangé à 20 ml de DMEM, 5 % de sérum de veau fœtal ainsi que la pénicilline/streptomycine (milieu complet). Ce mélange est ensuite placé dans une boîte de 75 cm<sup>2</sup> qui a été préalablement collagénisée, puis cette boîte est incubée toute la nuit à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Le collagène va aider les cellules à adhérer au plastique des boîtes et éviter leur croissance en amas, c'est pour cette raison que toutes les boîtes utilisées seront préalablement collagénisées. Pour cela le plastique est recouvert de collagène 10 % durant 5 minutes, puis il est retiré et la boîte est laissée ouverte afin que l'excès de collagène sèche, si cela prend trop de temps l'excès de collagène peut être lavé avec du PBS stérile. Le lendemain la majorité des cellules ont adhéré à la boîte et les cellules qui ne sont pas réparties sont retirées. En effet le milieu est changé par 15 ml de milieu complet.

Les cellules sont replacées dans l'incubateur jusqu'à obtention d'une boîte avec des cellules confluentes (environ 5 jours plus tard).

Lorsque les cellules sont confluentes, on sépare les cellules dans plusieurs boîtes, afin d'amplifier le nombre de cellules avant la production massive de virus. Pour cela on enlève le milieu et le tapis cellulaire de la première boîte est lavé avec 10 ml de PBS1X. Le PBS doit être mis sur les cellules sans perturber le tapis cellulaire, aussi faut-il le déposer sur les parois de la boîte. Le PBS va servir à retirer le sérum qui gênera l'action de la trypsine que nous rajoutons sur les cellules afin de détacher les cellules du plastique. Le volume à rajouter doit être suffisant pour recouvrir les cellules, dans une boîte de 75 cm<sup>2</sup>, 3 ml suffisent. On incube la boîte pendant 5 minutes à 37°C, puis lorsque les cellules sont décollées, l'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de 7 ml de milieu complet contenant du sérum. On centrifuge les cellules pendant 5 minutes à 500 g puis on retire le surnageant qui contient la trypsine. Les cellules sont reprises dans 10 ml de milieu complet qui sont ensuite répartis en 2. En effet, dans deux boîtes de 150 cm<sup>2</sup>, contenant 30ml de milieu complet on ajout 5 ml de cellules. On incube ces 2 boîtes à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>, jusqu'à ce que les cellules soit confluentes. Puis on amplifie les cellules de la même façon jusqu'à obtenir au minimum 6 boîtes de 150 cm<sup>2</sup> confluentes.

Le milieu de ces boîtes est ensuite remplacé par du DMEM, gentamycine, avec seulement 1 % de sérum. Ce passage en milieu appauvri en sérum va permettre une meilleure production de virus. Ces boîtes vont être placées dans l'incubateur à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> pendant 5 jours. Puis les surnageants vont être récupérés pour la purification des capsides extracellulaires dites

matures et les cellules vont être gardées pour la purification des capsides intracellulaires dites immatures.

b. Purification des capsides extracellulaires dites matures

Pour purifier les capsides extracellulaires, on part de 6 surnageants préparés précédemment que l'on peut garder à -20°C avant de faire la purification.

Le début de la purification s'effectue bien entendu au sein du P3 car les virions présents dans le surnageant sont infectieux.

La première étape est de centrifuger les surnageants pendant 15 minutes à 4000 rpm afin de retirer les débris de cellules mortes qui pourraient être présentes dans les surnageants cellulaires.

Ces surnageants sont ensuite récupérés et déposés sur 3 ml de coussin de TNE-NP40-sucrose dans des tubes d'ultracentrifugation de 38 ml Beckman Ultra-clear (25×89mm). Les 6 tubes sont équilibrés et placés dans les godets oscillants du rotor Beckman SW28Ti. La centrifugation s'effectue à 28000 rpm pendant 22 heures et à 10°C. Le lendemain, les surnageants sont jetés dans la poubelle adéquate et chaque culot est repris dans 1 ml de PBS1X contenant 0.75 % de NP40. Les culots ont un aspect translucide et caoutchouteux. Ils sont ensuite placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml, et incubés 1 heure à 37°C afin de supprimer les protéines de surface qui rendent le virus infectieux. Après cette incubation, les tubes peuvent être sortis du P3 après une décontamination importante de l'extérieur des tubes. Les culots qui ne se reprennent pas doivent être dilacérés avec un Potter et on incube les culots qui sont toujours dans le PBS1X avec 0,75 % de NP40 à 4°C pendant toute une nuit sous rotation.

Le lendemain ces tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 13000rpm et à 4°C. Les surnageants sont récupérés et rassemblés en 2 tubes de 3 ml, qui vont être déposés sur 1 ml de TNE-NP40-sucrose dans des tubes d'ultracentrifugation Beckman de 5 ml. On équilibre les 2 tubes avec du PBS1X et on les place sur le rotor Beckman SW55Ti. La centrifugation se fait à 50000 rpm pendant 2 heures et à 10°C. Les culots sont ensuite récupérés et les 2 culots sont repris dans 100 µl de PBS. Les culots ne se reprennent pas facilement, il faut donc les dilacérer avec le cône. Afin d'éviter tout agrégat, on centrifuge ces 100 µl pendant 15 minutes à 13000 rpm et à 4°C. Puis le surnageant est aliquoté en tubes de 10 µl qui sont stockés à -20°C.

### c. Purification des capsides intracellulaires dites immatures

Les capsides immatures sont purifiées à partir des cellules HepG2.2.15 qui ont servi à produire les capsides matures. En effet, après avoir gardé le surnageant des cellules pour les capsides matures, nous avons 6 boîtes de 150 cm<sup>2</sup> avec des cellules confluentes.

Ces cellules sont lavées avec 10 ml de PBS afin de retirer les virions excrétés, puis elles sont grattées avec un grattoir de cellules stérile dans 2 ml de PBS et rassemblées dans 2 tubes de 15 ml. Ces tubes sont centrifugés à 2000 rpm pendant 2 minutes et les cellules sont reprises dans 5 ml de PBS afin de les laver. Cette étape sera réalisée 3 fois de suite. Après la dernière centrifugation, les culots cellulaires des 2 tubes sont chacun repris dans 4 ml de PBS avec 0.1 % de NP40.

Les tubes peuvent alors être sortis du P3, après que l'extérieur des tubes est été correctement décontaminé.

Les 8 ml obtenus sont séparés en 8 tubes de 1 ml qui sont soniqués 6 fois pendant 15 secondes à une puissance de 7, afin de casser les cellules. Les tubes sont placés dans la glace entre chaque étape de sonication. Puis on ajoute à chaque tube du MgCl<sub>2</sub> pour une concentration finale de 15 mM, ainsi que de la DNase I à 20 U/ml et de la RNase A à 20 µg/ml. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 15 minutes. Une étape de centrifugation est réalisée à 12000 rpm et à 4°C pendant 20 minutes. Les surnageants sont récupérés et on ajuste à 0,75 % de NP40, à 20 U/ml de Nucléase S7 et à 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Les tubes sont alors incubés pendant 15 minutes à 37°C pour laisser la nucléase agir. A la fin des 15 minutes l'action de la nucléase est stoppée grâce à l'addition de 15 mM d'EDTA. On centrifuge à 15000 rpm pendant 10 minutes et à 4°C afin de récupérer les surnageants qui vont être rassemblés en 2 tubes de 4 ml. Ceux-ci vont être déposés sur un coussin de 1 ml de TNE-NP40-Sucrose dans des tubes d'ultracentrifugation de 5 ml Beckman. Ces tubes sont ensuite placés sur le rotor Beckman SW55Ti. La centrifugation se fait à 50000 rpm pendant 2 heures et à 10°C. Les 2 culots sont récupérés et repris ensemble dans 200 µl de PBS et sont dilacérés avec le cône de la pipette, puis on centrifuge à 13000 rpm pendant 15 minutes et à 4°C. Le surnageant est ensuite aliquoté en tubes de 20 µl et conservé à -20°C.

## **6. Capsides recombinante :**

Les capsides WT et C183S recombinantes produites dans les bactéries *E. coli* ont été purifiées et préparées comme décrit dans la publication de Crowther (Crowther, 1994). Ces capsides nous ont été fournies par le laboratoire de Paul Pumpens (Latvian Biomedical Research and Study Centre, Ratsupites 1, 1067 Riga, LETTONIE). Ces préparations de capsides présentent une pureté de 90 %.

## **7. Electrophorèses et transferts**

### **a. Gel d'agarose :**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique bien connue en biologie moléculaire, elle permet de séparer des fragments d'ADN ou d'ARN en fonction de leur taille. Au laboratoire, ce système est ainsi souvent utilisé pour l'analyse des capsides du VHB qui sont chargées négativement et vont migrer vers la borne positive.

Les gels d'agarose sont réalisés avec de l'agarose que l'on dissout selon le pourcentage souhaité (de 0.8 à 2.5 %) dans du tampon TAE. Le pourcentage d'agarose utilisé sera dépendant de la taille de la molécule que l'on veut observer. Pour dissoudre l'agarose, ce mélange doit être porté à ébullition, puis lorsque la température du mélange est redescendue, le gel peut être coulé dans le montage adéquat. Lorsque le gel a polymérisé, et que les échantillons mélangés au bleu de charge non dénaturant sont chargés dans les puits, la migration peut alors se faire à un voltage d'environ 100 volts. La migration est arrêtée en fonction de ce que l'on souhaite observer. Le front de migration qui est marqué par le bleu de bromophénol migre par exemple dans un gel à 1 % d'agarose comme un fragment d'ADN de 400 paires de bases.

La révélation pour la migration de l'ADN se fait grâce au bromure d'éthidium qui est un intercalant de l'ADN ou de l'ARN. Le gel est incubé pendant 5 à 15 minutes dans un bain de bromure d'éthidium à 4 µg/ml. Puis il est placé dans le système Gel Doc qui va permettre de prendre le gel en photo grâce à une lampe UV et une caméra spécifique.

Pour les protéines, il faut transférer les protéines du gel vers une membrane afin de réaliser par la suite un Western Blot (voir chapitre correspondant).

b. Gel d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes ou SDS PAGE

Le SDS PAGE, ou sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, permet de séparer des protéines en fonction de leurs tailles, ou poids moléculaires, grâce à un courant électrique. Le SDS va dénaturer les protéines et les charger de façon négative. Leur séparation ne se fera alors que par la taille de la protéine, et en fonction du pourcentage d'acrylamide utilisé.

La première étape de cette technique est donc de préparer le gel. Pour cela on effectue le montage pour couler le gel dans des plaques de 10 cm × 8 cm × 1,5 mm, il faut vérifier avant qu'il n'y ait pas de fuite.

Puis on prépare le gel de migration à 12 % d'acrylamide (pour 2 gels):

- 7,5 ml de tampon de migration 2X (soit une concentration finale à 1X)
- 4,5 ml d'acrylamide : Bis acrylamide (37,5 : 1) à 40 % (12 % final)
- 2,8 ml d'eau
- 200 µl d'ammonium persulfate (APS) à 10 %
- 20 µl de Tetra-méthyl-éthylène-di-amine (TEMED)

L'APS et le TEMED doivent toujours être ajoutés en dernier car ils catalysent le début de la polymérisation de l'acrylamide. De plus aussitôt après avoir coulé le gel de migration, il faut placer de l'éthanol au dessus pour que le gel polymérise avec une surface plane pour pouvoir couler ensuite le gel de concentration à 4 % d'acrylamide (pour 2 gels) :

- 5 ml de tampon de concentration 2X (1X au final)
- 1 ml d'acrylamide : Bis acrylamide (37,5 : 1) à 40 % (4 % final)
- 3,8 ml d'eau
- 200 µl d'APS à 10 %
- 20 µl de TEMED

Lorsque le gel de migration est polymérisé, il faut retirer l'éthanol et couler le gel de concentration en plaçant le peigne correspondant au nombre de puits nécessaires.

Lorsque le gel de concentration est prêt, on retire le peigne puis on place le gel dans la cuve de migration avec du tampon Tris-Glycine-SDS, en vérifiant bien que les puits formés par le peigne soient totalement immergés dans le tampon.

Lorsque les gels sont prêts, la dernière étape est de préparer les échantillons à analyser. Pour cela on mélange les protéines à analyser avec du bleu de charge dénaturant 4X pour obtenir

une concentration finale à 1X auquel nous rajoutons 100 mM de DTT ce qui va casser les ponts disulfures. Ce mélange est ensuite chauffé à 95°C pendant 5 minutes afin de terminer la dénaturation des protéines. Après le chauffage, le mélange est placé dans les puits puis la migration se fait à 90 volts lorsque les protéines sont encore dans le gel de concentration puis on augmente à 115 volts lorsque les protéines passent dans le gel de migration.

Lorsque le bleu de charge qui correspond au front de migration, atteint le bas du gel, la migration du gel est arrêtée. Puis celui-ci est retiré des plaques de verre afin d'effectuer la révélation. Celle-ci peut se faire de différentes manières en fonction de ce que l'on souhaite observer.

#### c. Marquage au bleu de Coomassie :

Les gels SDS PAGE ou d'agarose peuvent être marqués avec le bleu de coomassie, c'est un colorant qui va s'attacher aux acides aminés aromatiques et basiques et qui va permettre de visualiser toutes les protéines. Sa sensibilité est d'environ 100 ng. Le gel est incubé pendant 30 minutes à température ambiante et sous agitation dans la solution de Coomassie puis on place le gel dans un bain de solution de décoloration pendant la nuit à température ambiante et sous agitation.

#### d. Western Blot et marquage avec des anticorps :

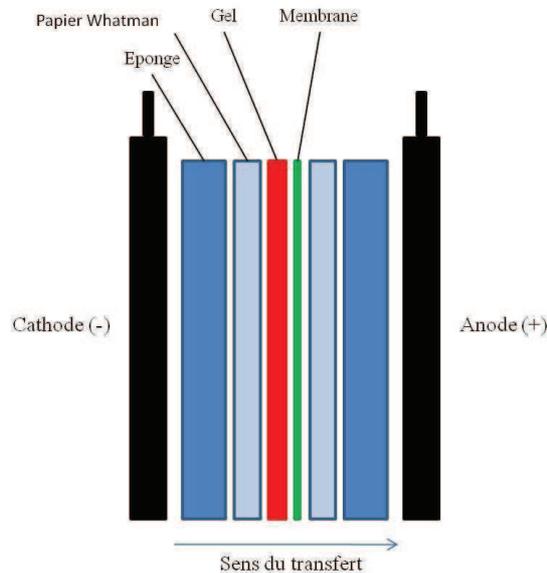
Le Western Blot est une technique permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques. En effet, après avoir réalisé un gel, lorsque la migration est terminée, le gel est tout de suite utilisé afin que les protéines séparées par celui-ci soient transférées sur une membrane. Cette membrane est ensuite exposée à un anticorps spécifique de la protéine que l'on recherche.

Le transfert des protéines sur la membrane peut se faire de différentes façons :

##### - Transfert liquide :

Après la migration du gel celui-ci est placé dans la solution de transfert 1X pour que celui-ci puisse s'équilibrer. Pendant ce temps, 6 papiers whatman de la taille du gel sont découpés ainsi qu'une membrane de PVDF ou de Nitrocellulose. La membrane devra être activée avant son utilisation : pour la nitrocellulose il suffit de placer la membrane dans la solution de transfert 1X ; pour la membrane PVDF, il faut la placer dans un bain de méthanol ou

d'éthanol pendant 2 minutes, puis dans un bain d'eau distillée et finalement dans la solution de transfert 1X. Lorsque tout est prêt on effectue le montage dans le système de transfert approprié (Figure 54).



**Figure 57:** Montage du transfert liquide.

C'est-à-dire que l'on place des éponges préalablement imbibées de tampon de transfert 1X, puis on place 3 papiers Whatman qui seront imbibés également. Tout ce montage doit se faire en retirant les bulles qui pourraient se former entre les différentes épaisseurs, car cela pourrait inhiber localement le transfert des protéines. On place ensuite le gel, puis la membrane et on termine en remettant 3 feuilles de papier Whatman, ainsi que des éponges.

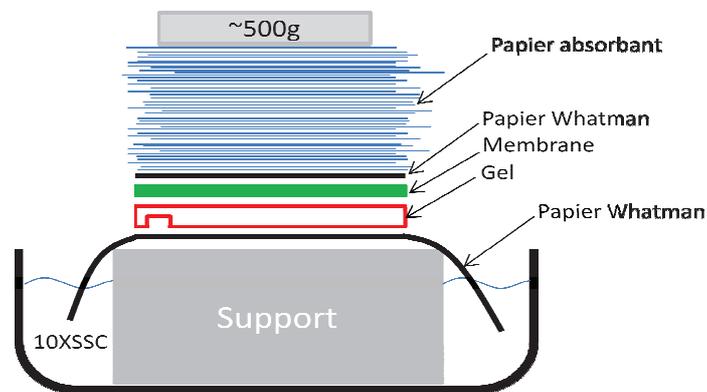
Le montage est ensuite fermé puis on le remplit de tampon de transfert afin que tout soit dans le liquide. La migration se fait ensuite à 400 mA pendant 1 heure 30 minutes.

- Transfert Semi-sec :

Le principe du transfert semi-sec est le même que le transfert liquide. Cependant le tampon utilisé et l'appareil sont différents. En effet, le montage se fait sur l'anode, où l'on place 2 papiers Whatman imbibés du tampon Anode I, puis on place dessus le troisième papier Whatman et la membrane préalablement incubés dans le tampon Anode II. On place finalement le gel suivi de 3 papiers Whatman qui ont eux été imprégnés de tampon Cathode. Ce montage doit être réalisé en retirant correctement les bulles qui auraient pu se former. Lorsque le montage est fini, on place la cathode sur le dessus, et on lance le transfert pendant 30 minutes à 20 Volt constants. Ce transfert peut être réalisé avec de la membrane de nitrocellulose ou de PVDF.

- Transfert passif :

Cette technique est surtout utilisée au laboratoire pour le transfert des capsides après migration de celles-ci dans un gel d'agarose. Cette technique utilise la capillarité pour entrainer les protéines du gel sur la membrane. Le transfert se fait grâce au tampon 10X SSC que nous plaçons dans un bac assez grand. Au centre du bac, nous posons un support qui va servir à poser le papier Whatman qui devra être en contact avec le tampon, puis nous empilons sans faire de bulles, le gel, la membrane activée, un autre papier whatman et une pile de papier absorbant d'environ 5 cm de hauteur (Figure 55). Le contact de toutes ces épaisseurs est maintenu par un poids d'environ 500 g. Ce poids devra être correctement réparti sinon le transfert ne sera pas homogène.



**Figure 58:** Transfert passif

De plus, le transfert se fait sur la nuit, il faut donc mieux recouvrir le bac avec un cellophane afin d'éviter l'évaporation du tampon.

- Transfert sous vide :

Ce type de transfert utilise le vide effectué par la machine Appligene Vaccum Blotter pour emmener les protéines du gel vers la membrane. Il est plus rapide que le transfert passif car il se fait en 1 heure et 30 minutes. Le tampon utilisé est, comme pour le transfert passif, le 10X SSC. Le gel d'agarose est placé dans un bain de la solution de transfert ainsi que la membrane préalablement activée.

Le montage pour ce système se fait très rapidement, la membrane est placée sur la surface poreuse de la machine, puis on place le cache plastique avec un trou de la bonne taille. Ce

cache permet à l'air de passer seulement au niveau de la membrane. Puis on place le gel d'agarose sur le cache en vérifiant que le gel soit légèrement plus grand que le trou du cache. La machine est ensuite mise en route et le transfert s'effectue à une pression de 60 mbar.

- Dot Blot :

Ce système de transfert est un peu différent car il se fait à partir d'une solution de protéine sans migration préalable sur gel. Pour cela on prend une membrane de Nitrocellulose non activée que l'on place dans le système avec une feuille de papier Whatman par-dessus. Puis on dépose le volume de protéine à analyser directement sur la membrane.

Ce principe peut se faire sans appareillage mais le volume que l'on dépose est plus important grâce au système sous vide. De plus les signaux obtenus sont plus nets car la force appliquée par le vide diminue l'effet buvard de la membrane.

Par la suite, lorsque les protéines ont été transférées sur la membrane, il faut effectuer la détection des protéines grâce à des anticorps spécifiques des protéines analysées. Le protocole reste assez similaires pour chaque anticorps, cependant les dilutions utilisées pour les anticorps primaires varient et doivent être déterminés avant l'utilisation.

Premièrement lorsque le transfert est fini, la membrane est placée dans la solution de blocage toute la nuit à 4°C et sous agitation, ce blocage peut aussi se faire 30 minutes à température ambiante sous agitation. Le blocage se fait pour la majorité des anticorps avec du lait, cependant pour certains anticorps il doit être fait avec de la BSA.

Après avoir bloqué la membrane, celle-ci est incubée pendant 1 heure et 30 minutes, à température ambiante et sous agitation, avec l'anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement la protéine souhaitée. Cet anticorps est dilué dans la solution de blocage à la dilution optimum qui a été déterminée préalablement. On rajoute aussi 0.1 % de tween 20 au mélange contenant l'anticorps primaire.

Lorsque l'incubation est finie, on effectue 4 lavages de 5 minutes chacun sous agitation, avec du PBS1X contenant 0.1 % de tween 20. Après les lavages, la membrane est alors incubée avec l'anticorps secondaire qui est couplé avec une peroxydase et qui va permettre la révélation de la membrane. La dilution de ces anticorps sont aussi à déterminer préalablement en fonction du réactif utilisé pour la révélation ainsi que du mode de lecture. L'anticorps secondaire est donc dilué dans la solution de blocage avec 0.1 % de tween 20, puis la membrane est incubée avec celui-ci pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation.

Afin de retirer l'excès d'anticorps, la membrane est lavée 4 fois pendant 5 minutes avec la solution de lavage.

Puis la révélation de la membrane est réalisée avec du réactif ECL que l'on place sur la membrane puis les signaux sont révélés grâce au système de film ou au système Chemidoc. Il existe plusieurs réactif ECL que nous utilisons en fonction de l'intensité des signaux (ECL plus, pico ou femto).

#### e. Séchage des gels :

Le séchage des gels se fait en utilisant 2 feuilles de cellophane (Biorad, réf : 165-1779) qui vont être maintenus par 2 cadres en plastique rigide et par des pinces.

Lorsque le gel d'agarose ou d'acrylamide est prêt à être séché, celui-ci est incubé pendant 20 minutes dans la solution de séchage. Après ces 20 minutes, le gel est placé entre les 2 feuilles de cellophane en évitant très soigneusement la présence de bulles. Les 2 cellophanes contenant le gel vont ensuite être coincées entre les 2 cadres et maintenus par les pinces. Ce montage est ensuite placé sous la Sorbonne sous aspiration durant toute la nuit. Lorsque le gel est sec, les cellophanes doivent être tendues et le gel doit être translucide et non opaque.

### **8. Détermination des concentrations protéiques :**

#### a. Au NanoDrop :

Cette technique est très rapide, il faut cependant que la protéine soit pure et il faut aussi connaître le poids moléculaire de la protéine ainsi que son coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ). Ce dernier peut être déterminé grâce à la séquence en acides aminés de la protéine sur le site atchimiebiologie qui propose plusieurs logiciels de conversion ou de calcul (<http://atchimiebiologie.free.fr/proteinecalc/proteinecalc.html>).

Sur le système de NanoDrop, après avoir rentré les informations nécessaires, la détermination de la concentration des protéines s'effectue avec 2  $\mu$ l de la solution. La mesure s'effectue contre un blanc qui est réalisé avec la solution dans laquelle les protéines sont diluées ou contre de l'eau.

b. Avec la méthode de Bradford :

La méthode de Bradford permet de mesurer la concentration en protéine dans une solution, c'est un dosage colorimétrique où le bleu de Coomassie va changer de couleur après sa liaison aux acides aminés aromatiques. La lecture d'effectue sur un spectrophotomètre, en utilisant une longueur d'onde de 595 nm.

La détermination de la concentration en protéine se fait grâce à une gamme de standard réalisé avec la protéine BSA, généralement de 0 à 10 µg. Les résultats obtenus permettent par la suite de tracer une droite représentant l'absorbance en fonction de la concentration. Une droite de régression est tracée, et l'équation va nous permettre à calculer la concentration de protéines dans nos solutions où la concentration est inconnue.

c. Détermination sur gel SDS PAGE :

La méthode sur gel SDS-PAGE est moins précise mais à l'avantage de pouvoir déterminer la concentration d'une protéine dans une solution où d'autres protéines sont présentes. Le principe est de faire migrer sur un gel SDS-PAGE différentes concentrations connues d'une protéine qui peut être la BSA, mais les résultats sont plus exacts lorsque l'on utilise comme standard la même protéine que celle que l'on souhaite quantifier. Puis on met dans les puits restant la solution contenant la protéine à quantifié.

La migration est réalisée normalement, puis on effectue la révélation avec du Sypro ruby qui est beaucoup plus linéaire que le Coomassie. Puis lorsque le marquage est effectué, la lecture se fait sur le système Chemidoc ce qui va nous donner une photo du gel. Cette photo est ensuite utilisée pour quantifier l'intensité des signaux obtenus et de pouvoir les comparer à ceux des standards afin de déterminer les concentrations en protéines des solutions analysées. La détermination de l'intensité des signaux se fait à l'aide du logiciel ImageJ.

d. Determination après un Blot (quantification des capsides) :

Le principe décrit si dessus peut aussi être appliqué après révélation grâce à des anticorps, ce qui est le cas lors de la quantification des capsides. En effet, au laboratoire, les capsides sont

quantifiées grâce à une gamme de standard déposé sur un gel agarose ou après un DotBlot. La révélation est effectuée grâce à l'anticorps primaire anti HBcAg (Dako) et l'anticorps secondaire anti IgG de lapin conjugué à une peroxydase. Puis la lecture se fait sur le système Chemidoc, et l'image obtenue permet la quantification grâce au logiciel ImageJ qui va nous permettre de mesurer les intensités des signaux et de pouvoir grâce à la gamme étalon de déterminer la concentration des capsides.

### **9. Traitement à la protéinase K :**

Le traitement à la protéinase K va nous permettre de se débarrasser des protéines, afin de ne garder que le génome marqué avec la radioactivité. Pour cela on incube les capsides radiomarquées avec :

- 2  $\mu$ l d'EDTA à 50 mM
- 5  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  à 0,1 mM
- 5  $\mu$ l de SDS 10 %
- 3  $\mu$ l d'eau
- 5  $\mu$ l de Protéinase K à 20 mg/ml

Puis le mélange est incubé pendant 1 heure à 56°C.

### **10. Phénol/Chloroforme :**

La méthode du phénol/chloroforme est utilisée afin de retirer les protéines de l'ADN. Le protocole est le suivant, on ajoute à la solution :

- 1 volume de Phénol à pH 7,9
- Puis on vortexe pendant environ 1 minute
- Le tube est ensuite centrifugé pendant 1 minute à 13000 g et à 4°C
- La phase aqueuse supérieure est récupérée et placée dans un autre tube auquel on ajoute
- 1 volume de chloroforme
- Le mélange est vortexé et centrifugé pendant 1 minute à 13000 g et à 4°C
- La phase aqueuse supérieure est de nouveau récupérée
- Et on ajoute : 1/10V d'acétate de sodium 3 M, 1/100V de Glycoblué et 2,5V d'éthanol absolu.

- Ce mélange est incubé 30 minutes dans un bain de carboglace/éthanol contenu dans un Dewar (environ -70°C).
- Puis on centrifuge 30 minutes à 14000 g et à 4°C
- Le surnageant est jeté et le culot est lavé avec 100 µl d'éthanol à 70 %
- Une dernière centrifugation est réalisée durant 15 minutes à 14000 g et à 4°C
- Les culots sont ensuite séchés

Lorsque les culots sont secs, ils sont repris dans de l'eau, le volume va dépendre de la concentration que l'on souhaite avoir pour la suite des expériences.

## **11. Marquage des marqueurs de tailles radioactif :**

Les marqueurs de tailles sont réalisés avec le plasmide pUC19-991, digéré par 3 enzymes différentes :

- BamH1 qui donne des fragments des tailles suivantes : 4059 pb et 1848 pb
- Hind III qui ne donne qu'un seul fragment : 5901 pb
- EcoRI qui donne aussi 2 fragments : 3221 pb et 2686 pb

Après la digestion les fragments sont purifiés par phénol/chloroforme puis ils sont repris dans 87 µl d'eau.

On ajoute ensuite dans chacun des tubes contenant les 87 µl de pUC19-991 digérées par une des enzymes :

- 10 µl du tampon 10X pour la phosphatase
- 3 µl de l'Alcaline phosphatase à 10000U/ml

La réaction est faite pendant 1 heure à 37°C. Puis l'action de la phosphatase alcaline est stoppée par l'addition de 20 µl d'EGTA à 100 mM, ainsi que par une incubation de 10 minutes à 56°C.

Une autre purification par phénol/chloroforme est effectuée mais cette fois le culot est repris dans 35,5 µl d'eau.

De ce volume seulement 18 µl est utilisé pour le marquage avec l'ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P, en effet dans un tube on mélange :

- 18 µl du plasmide digéré et déphosphorylé
- 4 µl d'ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P (6000 Ci/mmol)
- 2,5 µl du tampon 10X de la T4 polynucléotides Kinase
- 1 µl de T4 polynucléotide kinase

Ce mélange est incubé 15 minutes à 37°C, puis on ajoute 2 µl d'EDTA 0,5 M pour arrêter l'action de la kinase.

Les fragments sont ensuite purifiés avec le kit "Quiaquick Nucleotide Removal", et finalement récupéré dans 50 µl du tampon d'élution (10 mM tris-HCl pH 8) fourni dans le kit.

## **12. Modification des capsides :**

### a. Polymérisation endogène:

La polymérisation endogène est une technique qui nous permet de marquer radioactivement le génome des capsides produite dans les cellules HepG2.2.15. Ce système utilise la polymérase endogène qui est présente dans les capsides afin de finir la synthèse du brin d'ADN positive. La réaction de polymérisation se fait de la manière suivante, dans un tube Eppendorf, on place :

- 10 µl de la capside mature (15 ng/µl) ou immature (5 ng/µl)
- 40 µl du tampon de polymérisation 2X
- 25 µl d'eau stérile
- 1 µl de dATP à 1 mM
- 1 µl de dTTP à 1 mM
- 1 µl de dGTP à 1 mM
- 2 µl de dCTP α 32P (800 Ci/mM et 10 Ci/ml)

Ce mélange est incubé 2 heures à 37°C, puis on rajoute 1 µl de dCTP froid à 1mM et on laisse incuber encore 1 heure à 37°C. Après ces incubations, le volume est ajusté à 100 µl en rajoutant 10 µl de Tampon de polymérisation 2X et 10 µl d'eau stérile.

Afin de retirer les nucléotides non incorporés qui pourraient nous gêner par la suite, nous effectuons une purification de la capside sur des spin-colonnes Sephadex™ G-50 (colonnes G-50). Pour une meilleure purification nous faisons passer les capsides sur 2 colonnes consécutives. Les colonnes ont bien sur été préparées selon les consignes données par le fabriquant.

Lorsque les colonnes sont prêtes, 50 µl de capside sont déposées sur la matrice sans perturber celle-ci. Le volume total de la réaction de polymérisation étant de 100 µl il faut donc 4 colonnes pour une réaction. En effet, les 2 premières colonnes sont chargées avec 50 µl de la

réaction, et placé dans des tubes propres, puis elles sont centrifugées 2 minutes à 700g. Après la centrifugation, les colonnes sont jetées dans les poubelles adéquates (radioactives) et les solutions retrouvées dans le tube sont récupérées et déposées sur 2 nouvelles colonnes. On effectue la même chose pour ces colonnes.

Après cette étape de purification, les éluats sont rassemblés et stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

L'incorporation du dCTP radioactif peut être vérifiée grâce à un compteur à scintillation, pour cela on récupère 1µl de la réaction avant la purification sur colonne G-50 et 2 µl du mélange après la purification. On place la solution sur des papiers filtres Whatman GF/C :

- 1 filtre avec 1 µl de solution avant purification
- 2 filtres avec 1 µl de solution après purification
- 2 filtres sans solutions qui serviront de témoins négatifs

On laisse sécher les filtres pendant environ 10 minutes, puis on prend 1 des filtres témoin et 1 des filtres après purification que l'on place dans un bain de TCA 5 %, 1 % PPI pendant 15 minutes. Cette solution de TCA va permettre de précipiter les capsides dans le filtre alors que les oligo-nucléotides qui ne se sont pas incorporés vont aller dans la solution de TCA liquide. Après ce premier bain on change la solution de TCA par une nouvelle et on incube pendant 10 minutes, on effectue cela 3 fois. Puis on place les filtres dans une solution d'éthanol à 70 % pendant 2 minutes et on laisse sécher les filtres. Pour aller plus vite, une lampe infrarouge peut-être utilisée. Lorsque les filtres sont secs, on les place dans les tubes adaptés au compteur à scintillation, on rajoute ensuite le réactif de scintillation. Les tubes sont ensuite placés dans le compteur et l'on lance le programme adapté, soit pour le P32 un comptage de 2 minutes. Les résultats obtenus peuvent ainsi nous renseigner sur la pureté de nos échantillons ainsi que sur l'efficacité d'incorporation.

#### b. Biotinylation des capsides :

La biotinylation des capsides se fait grâce au kit de chez Pierce, le kit "EZ-Link NHS-PEG4 Biotinylation Kit". Ce kit permet de lier de façon stable des molécules de biotine sur les groupements d'amine primaire des protéines.

Avant toute chose, il faut s'assurer que les protéines que l'on souhaite marquer ne sont pas dans un tampon contenant des groupements amines, comme le Tris par exemple. Dans un tel

cas il faut préalablement dialyser les protéines contre un tampon approprié (ex PBS, tampon de transport).

La première étape est de d'abord calculer la quantité de biotine nécessaire pour le marquage, qui va dépendre de la concentration ainsi que du poids moléculaire de la protéine à marquer. Le calcul s'effectue simplement selon les formules du kit.

$$ml\ protéine \times \frac{mg\ protéine}{ml\ protéine} \times \frac{1mmol\ protéine}{mg\ protéine} \times \frac{20mmol\ biotine}{1mmol} = mmol\ de\ biotine$$

$$mmol\ de\ biotine \times \frac{589mg}{1mmol} \times \frac{170\mu l}{2mg} = \mu l\ de\ la\ solution\ de\ biotine$$

Lorsque le volume de la solution de biotine nécessaire a été déterminé, la biotine lyophilisé d'un des micro-tubes est reprise avec 170  $\mu$ l d'eau autoclavée. La solution est homogénéisée par pipetages répétés, puis on ajoute le volume calculé de biotine à la solution de protéine. Ce mélange de protéines (dans notre cas la capsid) et de biotine est ensuite placé pendant 2 heures dans la glace.

Puis on effectue une étape de purification qui va servir à retirer les biotines qui ne se sont pas liées à la capsid. Pour cela on utilise les "Zeba desalting columns" de 5 ml, fourni dans le kit, que l'on place dans un tube de 15 ml et que l'on centrifuge à 1000 g pendant 2 minutes et à 4°C. Après cette première centrifugation, trois autres sont effectuées avec 2,5 ml de PBS afin d'équilibrer la colonne. Lorsque la colonne est équilibrée, elle est placée dans un nouveau tube et la solution de capsid avec la biotine est déposée sur la résine. La colonne est laissée 5 minutes afin que la solution pénètre la résine, puis on ajoute 100  $\mu$ l d'eau sur le dessus de la résine et on lance la centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes à 4°C. L'éluât est ensuite récupéré puis aliquoté afin de stocker la capsid marquée à -20°C.

### c. Phosphorylation des capsides :

La phosphorylation de la capsid peut être utilisée comme une méthode de marquage radioactive de la capsid, cette technique utilise de l'ATP $\gamma$ P32. Cependant cette méthode est aussi utilisée avec de l'ATP froid pour modifier la capsid et permettre son import nucléaire.

Le protocole est le suivant :

- x µl de capsid (mature, immature ou recombinante)

La capsid est préalablement incubée 15 minutes à température ambiante, puis on ajoute :

- du tampon de PKC 2X pour obtenir une concentration finale de 1X
- 0,6 mg/ml de phosphatidyle sérine

Ce mélange est ensuite incubé pendant 10 minutes à 42°C, pour favoriser l'ouverture de la capsid et permettre l'accès de la protéine kinase C aux sites de phosphorylation. On ajoute alors :

- 0,15 mM d'ATP $\gamma$ P32 (10 Ci/mM et 2 Ci/ml)
- x µl de PKC

La solution est incubée à 37°C pendant 1 heure pour que la PKC agisse. Ce temps peut être ajusté selon l'efficacité de phosphorylation obtenue. Finalement, on ajoute au mélange réactionnel.

- du PBS 10X pour obtenir une concentration de 1X final.

Le mélange est incubé toute la nuit à 4°C, pour permettre aux capsides de se refermer.

Afin de retirer les nucléotides non incorporés qui pourraient nous gêner par la suite, nous effectuons une purification de la capsid sur des spin-colonnes Sephadex™ G-50 (colonnes G-50). Pour une meilleure purification nous faisons passer les capsides sur 2 colonnes consécutives.

Dans ce protocole, les quantités de capsid et de PKC à utiliser sont à déterminer préalablement, en fonction de la quantité de capsid et du temps de la réaction.

#### d. Préparation de capsides vides :

A partir de capsid recombinante wild type :

- 10 µl de capsid recombinante (60 µg)
- 9 µL de PBS

On effectue une incubation de 10 minutes à 42°C afin que la capsid s'ouvre.

- 1 µl de RNase A à 20 mg/ml

L'incubation est cette fois de 30 minutes à 37°C

Puis on laisse la capsid toute la nuit à 4°C pour qu'elle se referme.

### **13. Marquage des importines :**

L'étude des interactions lors de l'import de la capsid dans le noyau, a nécessité l'emploi d'importines  $\alpha$  et  $\beta$  marquées avec des molécules fluorescentes. Ces marquages ont été réalisés grâce au kit Invitrogen "Alexa Fluor® 488 (ou 594) Microscale Protein Labeling Kit". Ce kit permet d'attacher des molécules d'Alexa sur une protéine par liaison covalente aux amines primaires des acides aminés. Les protéines ne doivent donc pas être en solution dans un tampon contenant des amines tels que le Tris.

Les marquages se font de la façon suivante, dans un tube :

- 50  $\mu$ g d'Imp  $\alpha$  ou  $\beta$  (environ 100  $\mu$ l)
- 10  $\mu$ l de Bicarbonate de Sodium 1 M et pH 8,3 disponible dans le Kit (1/10 du volume de protéine)
- 5  $\mu$ l de la molécule Alexa (488 ou 594)

Ce mélange est incubé pendant 60 minutes à température ambiante, sous agitation et dans le noir. Lorsque cette incubation est terminée, il faut purifier les protéines marquées des molécules Alexa libre qui non pas été incorporées. Pour cela on utilise les colonnes "Zeba" de 0,5 ml préalablement équilibrées avec du PBS contenant 10 % de glycérol. Pour cela les colonnes sont centrifugées à 1500g pendant 1 minute, puis on ajoute sur les résines 300  $\mu$ l de PBS, 10 % glycérol et on centrifuge à nouveau. Cette étape est répétée 3 fois, puis les colonnes sont placées dans de nouveaux tubes, et les protéines sont déposées sur les résines sans perturber celles-ci. Puis on centrifuge mais cette fois 2 minutes à 1500 g. Les protéines sont ensuite aliquotées et stockées à -20°C.

La qualité du marquage est vérifiée, en migrant les protéines sur un gel SDS PAGE (dépôt de 10  $\mu$ l de chaque protéine marquée). Après la migration, le gel est fixé avec la solution de décoloration pendant 10 minutes puis la lecture est effectuée directement sur le système Pharos grâce aux lasers à 488 nm et 536 nm.

### **14. Préparation de RAN GTP et RANGDP :**

La protéine RAN peut se lier aux molécules de GTP, GDP. Pour cela on utilise le protocole suivant :

Dans un tube, on place :

- RAN

- 1 mM de GTP ou GDP
- 10 mM d'EDTA
- 2,5 mM de DTT
- 2 mM d'ATP

Ce mélange est incubé pendant 30 minutes à 30°C, puis on ajoute du magnésium d'acétate pour obtenir une concentration finale de 10 mM, ce qui va permettre de bloquer le GTP ou le GDP sur la protéine Ran.

## **15. Essai d'import nucléaire :**

### a. Préparation des cellules :

Les essais d'import nucléaire sont réalisés sur des cellules Hela déposées soit sur des lamelles de 15 mm de diamètre disposées au fond des puits des boîtes 24 puits, soit sur des lames multi-puits (de chez ICN Biomedicals, réf: 6041805). Lammelles ou lames doivent être préalablement collagénisées afin d'augmenter l'adhérence des cellules. Cette étape consiste à recouvrir le puits d'une solution stérile de collagène et incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Puis on retire la solution et on laisse sécher les lamelles sous la hotte à flux laminaire. Le séchage accompli, les cellules peuvent être déposées, les cellules d'une boîte de 75 cm<sup>2</sup> confluente sont trypsinées puis reprises dans 10 ml de milieu DMEM complet : 30 µl de la suspension cellulaire sont déposés sur chaque lamelle dans les plaques 24 puits que l'on recouvre de 500 µl de DMEM complet. Dans ces conditions, environ 50000 cellules sont déposées par lamelles.

Cependant, pour les lames en multi-puits, on place dans les puits 100 µl d'une dilution au 1/10<sup>ème</sup> des 10 ml obtenus à partir de la boîte de 75 cm<sup>2</sup>. Cela correspond approximativement à 10000 cellules.

Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit dans l'incubateur à cellules, c'est-à-dire à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Toute cette première partie est réalisée sous la hotte de culture cellulaire et de façon stérile.

## b. Perméabilisation des cellules :

Afin de permettre aux protéines que l'on veut tester de rentrer dans la cellule, il faut pratiquer des ouvertures dans la membrane cytoplasmique. Pour cela on utilise la digitonine qui est un détergent qui perméabilise les membranes contenant du cholestérol, comme la membrane plasmique à la différence de la membrane nucléaire.

Lorsque les cellules cultivées depuis la veille sont à environ 70 % de confluence, on réalise leur perméabilisations de la manière suivante :

- Lavage des cellules avec 500  $\mu$ l de DMEM par lamelles (100  $\mu$ l sur les lames en téflon), ce lavage est effectué 3 fois de suite en laissant 10 minutes entre chaque lavage.

Les lavages doivent être réalisés très doucement, car s'ils sont effectués trop rapidement les cellules ont tendance à se détacher des lamelles. Pour éviter cela, il est préférable d'utiliser un compte goutte à poire plutôt que des pipettes automatiques.

- Ajout de 400  $\mu$ l de digitonine diluée au 1/5000 dans du DMEM (1/5000 pour les lamelles, 1/7000 pour les lames en téflon). Cette incubation se fait à température ambiante pendant 5 minutes
- Les cellules sont ensuite placées dans la glace
- Puis elles sont lavées 3 fois avec 300  $\mu$ l de la solution de lavage en laissant 10 minutes entre les lavages.

Cependant, il est préférable avant de commencer l'essai d'import, de déterminer la dilution de digitonine à utiliser. Pour cela on prépare des lamelles supplémentaires contenant la même quantité de cellules. Ces lamelles sont lavées 3 fois avec 500  $\mu$ l de DMEM chaque lavage durant 10 minutes, puis on place 400  $\mu$ l de digitonine à différentes dilutions. Pour 50000 cellules par lamelles, on utilise une dilution de 1/4000 de la solution stock à 10 % de digitonine, alors que sur les lames de téflon, où il y a environ 10000 cellules, la dilution utilisée est de 1/7000. La perméabilisation s'effectue durant 5 minutes à température ambiante. Lorsque les 5 minutes sont terminées les cellules sont placées dans la glace et on effectue les 3 lavages de 10 minutes avec la solution de lavage. Puis on place sur les cellules du bleu trypan, en quantité suffisante pour recouvrir toutes les cellules. On place ensuite la lamelle sur une lame et l'on observe au microscope. Les cellules non perméabilisées apparaissent blanches, car le bleu trypan est rejeté à l'extérieur des cellules, alors que les cellules

perméabilisées apparaissent bleues, le bleu trypan rentre beaucoup plus facilement car la membrane ne possède plus la fonction de barrière et la cellule ne peut plus rejeter le bleu trypan. La dilution de digitonine la plus appropriée pour effectuer un import nucléaire, est celle où l'on observe une majorité de cellules bleues et environ 10 % de cellules blanches.

### c. Import nucléaire

Après avoir réalisé la perméabilisations des cellules et leurs lavages afin de retirer le cytoplasme des cellules, il faut effectuer l'essai d'import nucléaire.

Pour cela il faut préparer le mix de transport, pour un essai :

- 5 mM de créatine phosphate
- 20 U/ml de créatine phosphokinase
- 1 mM d'ATP
- 2 mM de DTT
- 1X de tampon de transport
- Protéine à importer (15  $\mu$ l ou environs 300 pmol)
- Protéines de l'import (0,8  $\mu$ M d'Imp  $\alpha$ , 0,5  $\mu$ M d'Imp  $\beta$ , 3,3 mM de GTP et 8,2  $\mu$ M de RanGDP) ou bien 8  $\mu$ l de RRL qui contient toute les molécules nécessaires à l'import.

Ce mix de transport est placé sur du parafilm dans une chambre humide qui est réalisée avec une boîte de Pétri où du papier Whatman imbibé d'eau recouvre le fond. Donc les 30  $\mu$ l sont déposés sur une feuille de parafilm placée dans la chambre humide et une lamelle est ensuite placée sur cette goutte, les cellules en contact avec le mix de transport. Puis la chambre humide est placée pendant 10 minutes dans un bain-marie à 37°C.

Après ces 10 minutes les lamelles sont replacées dans leurs puits respectif. Et on effectue 3 lavages de 10 minutes avec 300  $\mu$ l de solution de lavage.

Après avoir effectué les lavages, il faut fixer les cellules, pour cela on utilise du PFA 4 % que l'on incube 30 minutes à température ambiante, ou selon convenance toute la nuit à 4°C.

### d. Immunofluorescence :

Lorsque les cellules sont fixées, il faut laver les cellules pour retirer le PFA puis on perméabilise les membranes nucléaires avec du Triton X100 pour permettre par la suite aux anticorps qui vont effectuer le marquage de pouvoir rentrer dans le noyau. Le marquage est

réalisé avec un anticorps primaire qui va reconnaître la protéine importée dans le noyau, puis l'anticorps secondaire reconnaît l'anticorps primaire et est couplé avec une molécule fluorescente, le plus souvent des molécules Alexa.

L'expérience se fait à température ambiante et de la façon suivante :

- Les lamelles sont lavées avec 500 µl de PBS et cela 4 fois de suite.
- Les cellules sont incubées pendant 10 minutes à température ambiante avec 0,1 % de Triton X100 dilué dans du PBS1X.
- Afin de retirer le Triton, on effectue 4 lavages avec 500 µl de PBS
- Puis on place de la solution de blocage sur les lamelles et on incube les cellules pendant 15 minutes à 37°C.
- Après le blocage on incube directement les lamelles 1 heure à 37°C avec 30 µl de la solution d'anticorps primaire.

Cela est réalisé dans la chambre humide où l'on place les gouttes sur une feuille de parafilm. Les cellules sont ensuite placées sur la goutte et on laisse incuber pendant 1 heure à 37°C dans un bain-marie. Généralement, les anticorps utilisés sont l'anti pore nucléaire, le Mab414 qui est utilisé au 1/300<sup>ème</sup>. Puis on utilise l'anticorps anti Hbc-Ag (Dako) au 1/200<sup>ème</sup> et l'anticorps anti GST de chèvre au 1/300<sup>ème</sup>. Ces anticorps sont préparés dans la solution de blocage.

- Après le marquage avec les anticorps primaire, on effectue 4 lavages de 500 µl de PBS afin de retirer les anticorps qui ne se sont pas fixés aux protéines.
- Les lamelles sont ensuite placées dans la chambre humide sur 30 µl de la solution d'anticorps secondaires. Celle-ci est ensuite placée pendant 30 minutes à 37°C.

Les anticorps sont préparés dans la solution de blocage, et sont souvent utilisés à une dilution de 1/200<sup>ème</sup>.

- Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, les cellules sont encore lavées 4 fois avec 500 µl de PBS
- Puis on place les cellules pendant 10 minutes à température ambiante avec du DAPI ce qui va permettre de marquer le noyau des cellules.
- On effectue encore 4 lavages avec le PBS
- Puis on effectue le montage des lamelles sur les lames grâce au milieu de montage Dabco/Mowiol.

Le milieu de montage doit être préparé 30 minutes avant son utilisation, pour cela on prend une aliquote de Mowiol de 1 ml que l'on mélange à 100 mg de DABCO. Ce milieu est incubé à 37°C jusqu'à son utilisation.

e. Observation des lames au microscope confocal :

Le microscope utilisé au sein du laboratoire est le Leica SP5 et les lasers utilisés sont les lasers Diode 405 pour le DAPI, l'Argon pour l'Alexa 488, et le laser pour l'Alexa 594. Les réglages d'intensité des lasers et du gain sont déterminés pour chaque expérience.

**16. Localisation des Importines  $\alpha$  et  $\beta$  endogène dans les cellules Hela :**

A partir de cellules Hela préparées comme pour les essais d'import nucléaire, on effectue un marquage par immunofluorescence des importines  $\alpha$  et  $\beta$  endogène des cellules. Pour cela les cellules sont lavées 4X avec du PBS, puis elles sont fixées avec du PFA 4 % pendant 20 minutes à température ambiante. Par la suite, l'immunofluorescence s'effectue de la même manière que décrit précédemment, excepté que les anticorps utilisés sont les anticorps anti Imp  $\alpha$  (au 1/500) et l'anticorps anti Imp  $\beta$  (au 1/15).

Les images sont ensuite prises au microscope confocal en effectuant le maximum de tranches d'une cellule. Puis ces images sont utilisées pour reconstituer une cellule en 3D grâce au logiciel Imaris. Ces reconstitutions 3D vont alors nous permettre de découper une tranche verticale au sein de la cellule et d'effectuer un "Plot Density" horizontal sur cette tranche. Cela va donc nous donner la localisation des importines  $\alpha$  et  $\beta$  endogènes dans les cellules Hela.

**17. Analyse des interactions avec les Importines  $\alpha$  et  $\beta$  :**

Pour ces expériences nous utilisons des billes sépharoses couplés avec du glutathion qui vont nous servir à lier les protéines possédant une étiquette GST que nous allons utiliser.

Le protocole pour l'utilisation des billes est le suivant, dans un tube :

- 5 µl de bille /protéines à tester (ex : GST, GST-NLS, GST-IBB...)
- Ces billes sont lavées 5 fois de suite avec 100 µl d'une solution de PBS à 500 mM de NaCl et 0,1 % de BSA et centrifugée à 500 g pendant 1 minute
- Puis on ajout 25 µg de la protéine souhaitée et possédant une étiquette GST sur les billes. En effet, en théorie les billes ont une capacité de 5 mg par mL de bille.
- Les billes et les protéines sont donc incubées ensemble à 4°C et sous rotation, toute la nuit cependant le temps d'incubation peut être réduit jusqu'à 2 heures.
- Après cette incubation, les billes sont lavées 5 fois avec 100 µl de PBS à 500 mM de NaCl et 0,1 % de BSA et en centrifugent à 500 g pendant 1 minute.
- Lorsque les lavages ont été réalisés, on effectue une dernière centrifugation qui va nous servir à reprendre les billes dans 50 µl. Ces 50 µl vont être répartis en 3 tubes de 15 µl :
  - 1 tube avec 2,5 µg d'Imp α (normal ou fluorescente)
  - 1 tube avec 2,5 µg d'Imp β (normal ou fluorescente)
  - 1 tube avec 2,5 µg d'Imp α et 2,5 µg d'Imp β
- Ces mélanges sont incubés pendant 2 heures à 4°C et sous rotation.
- Après cette incubation, les billes sont lavées 5 fois de suite avec la même solution.

Lorsque le dernier lavage est réalisé, il faut soit aller lire le résultat au microscope confocal lorsque l'on a utilisé des protéines fluorescentes, soit déposer les billes sur un gel SDS PAGE et effectuer un Western Blot après avec les anticorps anti Imp α et β.

## **18. Centrifugation sur gradient de Nycodenz :**

Ces expériences ont été réalisées par Birgit Rabe (Institute of Virology, Justus Liebig University, Giessen, Germany).

Les Capsides ou les lysats cellulaires sont déposés sur 3,6 ml de gradient Nycodenz/TN (1,11-1,32 g/ml). Ces gradients sont ensuite centrifugés dans le rotor SW60 et la centrifugation est réalisée durant 22 heures à 10°C et 36000 rpm. Des fractions de 220 µl sont récupérées et leurs densités sont déterminées grâce à un réfractomètre en utilisant la formule  $d = (\sigma \times 3,287) - 3,383$ .

La préparation des lysats cellulaires est réalisée après l'incubation pour l'import nucléaire. Les cellules sont lysées grâce à une incubation de 1 heure à 37°C dans la solution de 1 % NP-40/

PBS/ 5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Puis du Triton X-100 est rajouté afin d'obtenir une concentration finale de 0,2 %, ce mélange est par la suite incubé 10 minutes à 37°C, puis une étape de sonification est réalisée (6×15 secondes). Puis ces échantillons de 200 µl sont déposés sur le gradient de Nycodenz.

Les traitements à la RNase A sont réalisés durant 15 minutes à 37°C et à une concentration finale de 4 mg/ml.

## **19. Fractionnement des capsides sur les Colonnes**

### **Superdex75 :**

La colonne Superdex 75 PC 3,2/30 est une colonne d'exclusion de taille dont le domaine de fractionnement est entre 3 et 70 kDa. La colonne est équilibrée avec du tampon de transport avant son utilisation. Puis on injecte la capsid, le volume pour l'injection est de 50 µl, la capsid est ensuite éluée à un flux de 40 µl/min et l'absorbance à 280 nm est constamment suivie.

Préalablement à l'injection des capsides, la colonne a été calibrée avec différents standards : l'ovalbumine (43 kDa, 1,13 ml), le chymotrypsinogène A (25 kDa, 1,26 ml), la RNase A (13,7 kDa, 1,36 ml) et le volume d'exclusion a été déterminé grâce au Bleu Dextran (2000 kDa, Volume mort)

## **20. Cinétique de dégradation du génome dans les capsides par la nucléase S7 :**

Pour réaliser cette expérience, nous effectuons une cinétique inverse, c'est-à-dire que nous commençons les incubations à différents temps choisis pour que toutes les incubations se terminent au même moment.

Par exemple pour le temps 6<sup>h</sup> on met dans un tube :

- 5 µl de capsid
- 1 µl de CaCl<sub>2</sub> à 0,1 M
- 1 µl de Nucléase S7 à 15 U/µl
- 8 µl de TBS 1X

Ce tube est donc incubé 6 heures à 37°C, puis la même chose est réalisée pour les temps 4<sup>h</sup>, 2<sup>h</sup>, 1<sup>h</sup> et 0<sup>h</sup>. Lorsque les incubations se finissent, 10mM d'EDTA est rajouté au mélange afin de stopper l'action de la Nucléase S7.

Les différents temps sont ensuite chargés sur un gel d'agarose 1 %, cependant la lecture se fera en fonction du type de capsid utilisée. En effet, pour les capsides recombinantes, dont la quantité utilisée est 5 µg, le gel sera révélé aux UV après incubation dans un bain de BET.

En revanche pour les capsides matures et immatures, les quantités utilisées sont beaucoup plus faibles, de l'ordre de 10 ng. C'est pour cette raison que la radioactivité est utilisée, les capsides qui sont donc placées dans le tube ont donc subi une polymérisation endogène avant la cinétique. Le gel est donc par la suite fixé grâce à une incubation de 20 minutes dans une solution de TCA 5 %, puis séché toute la nuit sous la hotte, et finalement placé contre un écran photostimulable possédant une mémoire au phosphore (FujiScreen) qui sera ensuite révélé au Phoros.

De plus cette cinétique a aussi été réalisée afin de visualiser la dissociation de la capsid, c'est pourquoi des Western Blot ont été réalisés. Après migration des différents temps de la cinétique sur gels d'agarose de 1 %, on effectue un transfert des protéines sur membrane afin de pouvoir visualiser grâce à l'anticorps anti HBcAg (Dako) si la capsid est toujours sous sa forme assemblée.

## **21. Effet de différentes protéines sur la dissociation de la capsid mature :**

Afin d'analyser l'action des différentes protéines et particulièrement l'action de la Nup153 sur la dissociation de la capsid, nous utilisons des capsides matures radiomarquées par polymérisation endogène, de la Nup153-C2 fixée sur des billes glutathion et de la Nucléase S7 afin de visualiser l'accessibilité au génome et donc la dissociation de la capsid.

Généralement, l'expérience est effectuée de cette manière, dans un tube :

- 10 µl de bille saturée de Nup153-C2
- 10 µl de capsid mature (environ 15ng)
- 2 µl de CaCl<sub>2</sub> à 0,1 M
- 1µl de Nucléase S7 à 15 U/µl

Cet essai est ensuite incubé pendant 2 heures à 37°C, puis l'incubation est suivie d'un traitement à la protéinase K. Le mélange est ensuite chargé sur gel d'agarose à 1 % puis il est

séché et mis contre un écran durant au minimum 1 journée. La lecture s'effectue ensuite au Pharos.

## **22. Marquage du génome des capsides matures grâce à différentes sondes :**

Les sondes choisies sont les suivantes :

- HBV 1 : ATC TTC TTT TCT
- HBV 2 : AAC CTA GCA G
- HBV 3 : CTG GAT AAT AAG
- HBV 4 : TGT AAA TAG TGT

### a. Marquage radioactif des sondes :

Afin de visualiser lors de l'attachement au génome des capsides matures, les sondes sont radiomarquées :

- 1  $\mu$ l de sonde à 10 pmol/ $\mu$ l
- 1  $\mu$ l d'ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P (10 Ci/mM et 2 Ci/ml)
- 1  $\mu$ l de T4 polynucléotide kinase
- 1  $\mu$ l de tampon pour la T4 polynucléotide kinase
- 6  $\mu$ l d'eau stérile

Ce mélange est incubé pendant 30 minutes à 37°C, puis les sondes sont purifiées de l'ATP non incorporé grâce aux colonnes G25, en ajustant le volume de la réaction à 50  $\mu$ l.

### b. Hybridation sur le génome des capsides matures :

Dans un tube :

- 2  $\mu$ l de capside (environ 30 ng)
- 15  $\mu$ l de sonde 1, 2, 3, ou / et 4

Le tube est ensuite laissé toute la nuit à 25°C. Cependant étant donné que les T<sub>m</sub> des sondes sont très bas, il est nécessaire de cross-linker les sondes sur le génome. Pour cela on utilise du Psoralène (10  $\mu$ l) que l'on ajoute à la capside avec les sondes. Puis le mélange est placé dans

une plaque 96 puits afin d'être irradié au UV (365 nm) pendant 15 minutes en plaçant la lampe à environs 10 cm des échantillons.

Les capsides sont ensuite passées sur une colonne de G-50 afin de retirer les sondes qui ne se sont pas hybridées. Les capsides ainsi marquées pourront être déposées sur gel d'agarose afin de voir si le marquage c'est bien passé.

Cependant l'utilisation de sondes fluorescentes va aussi permettre l'injection de ces capsides dans le cytoplasme de cellules afin de suivre le devenir du génome.

# Résultats

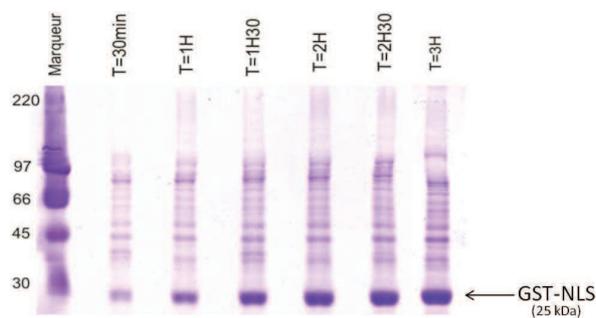
## I. Purification des protéines :

L'une des parties de ma thèse a été d'analyser les interactions qui ont lieu lors de l'import de la capsid du VHB, pour cela les différentes protéines mises en jeu dans cet import ont été surexprimées et purifiées afin de pouvoir étudier les interactions qui ont lieu lors de cette étape du cycle.

### 1. Purification des protéines GST et GST-NLS :

Les protéines GST et GST-NLS, sont des protéines qui nous ont servi de contrôle dans l'étude des interactions avec les transporteurs de l'import. En effet, la protéine GST est utilisée dans les témoins négatifs car elle ne doit interagir avec aucune protéine, alors que la protéine GST-NLS qui contient le NLS du SV40 sert de contrôle positif pour les interactions avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$ .

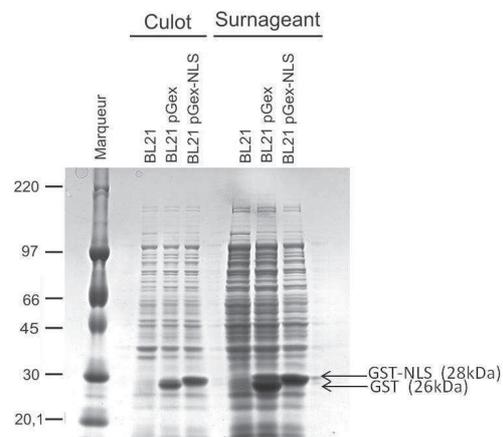
Afin de déterminer le temps utilisé pour l'induction pour la surexpression des protéines GST et GST-NLS, un test d'induction a été effectué. Pour cela des échantillons de 1 ml de la culture ont été prélevés toutes les 30 minutes après le début de l'induction réalisée avec 1 mM d'IPTG. Après centrifugation, le culot bactérien est repris dans du bleu de charge dénaturant (200  $\mu$ l). Ces échantillons sont chargés sur un gel SDS PAGE (Figure 59) où l'on peut observer, après coloration du gel au bleu de Coomassie, que l'expression de la protéine GST-NLS augmente en fonction du temps. La quantité la plus importante est obtenue pour le temps 3 heures.



**Figure 59:** Test d'induction de la protéine GST-NLS

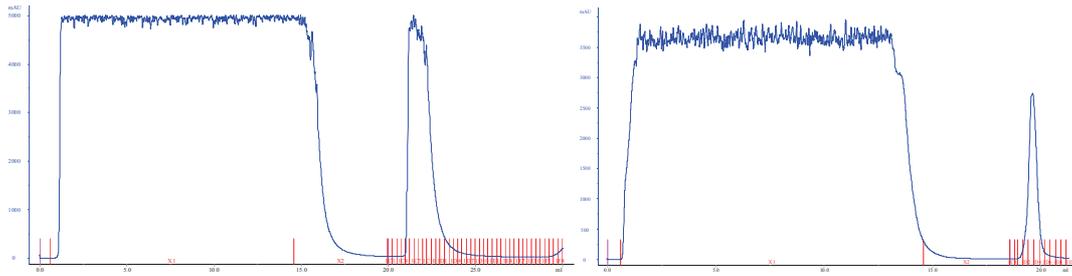
Les échantillons prélevés à différents temps sont chargés sur un gel SDS-PAGE (15  $\mu$ l), puis le gel est coloré au bleu de Coomassie

Pour analyser la solubilité de la protéine GST-NLS, les fractions solubles ou insolubles du lysat bactérien après surexpression des protéines ont été analysées sur un gel SDS PAGE. Cela a été effectué pour les fractions de la souche BL21, qui correspond à la bactérie sans plasmide (T-), ainsi que de la souche BL21 transformée avec le plasmide pGex qui va permettre l'expression de la protéine GST, et encore de la souche BL21 transformée avec le plasmide pGex-NLS qui va permettre la production de la protéine GST-NLS (Figure 60). Ce gel montre que les protéines, GST et GST-NLS, sont retrouvées dans la fraction insoluble (culot) ainsi que dans la fraction soluble (surnageant). Ce qui signifie que pour la suite, la purification peut se faire directement sur la fraction soluble, ce qui est plus simple que la purification des protéines dans la fraction insoluble.



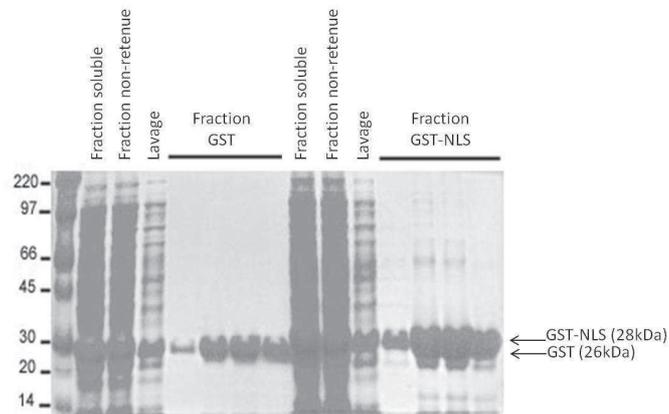
**Figure 60:** Analyse des fractions solubles et insolubles pour le T-, GST et GST-NLS  
Les échantillons sont chargés sur un gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie.

Une fois ces paramètres déterminés, la purification peut être entreprise et la fraction soluble est injectée sur la colonne GST installée sur la chaîne de chromatographie FPLC de l'AKTA Purifier. Les étapes de la purification sont suivies grâce à la mesure de l'absorbance à 280 nm au cours du temps. Ainsi les premiers pics de la figure 3 correspondent aux fractions non-retenues sur la colonne lors de l'injection. Puis un lavage de 5 volumes de colonne est effectué, suivi de l'étape d'élution avec la solution d'élution contenant du glutathion et permettant de détacher les protéines contenant une étiquette GST. Cette élution correspond au deuxième pic observé sur les chromatogrammes (Figure 61).



**Figure 61:** Chromatogramme de la purification des protéines GST (à gauche) et GST-NLS (à droite). Obtenue sur le système AKTA Purifier par mesure de l'absorbance à 280 nm.

Les différentes fractions obtenues après la purification sont analysées sur un gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 62). Sur ce gel SDS-PAGE, différents échantillons de la purification sont comparés avec un extrait de la fraction soluble. L'échantillon correspondant à la fraction non-retenue présente encore de la protéine GST (à gauche) et GST-NLS (à droite). Les fractions GST et GST-NLS sont les différentes fractions d'éluion correspondant au 2<sup>ème</sup> pic des chromatogrammes (Figure 61). On peut observer que l'on obtient les protéines GST et GST-NLS en grandes quantités avec un pourcentage de pureté qui est supérieur à 95 % pour la protéine GST et qui est environ 80 % pour la protéine GST-NLS. Cette pureté est calculée à partir de l'intensité des signaux obtenus sur le gel.



**Figure 62:** Analyse des différentes fractions obtenue après la purification de GST (à gauche) et de GST-NLS (à droite). Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

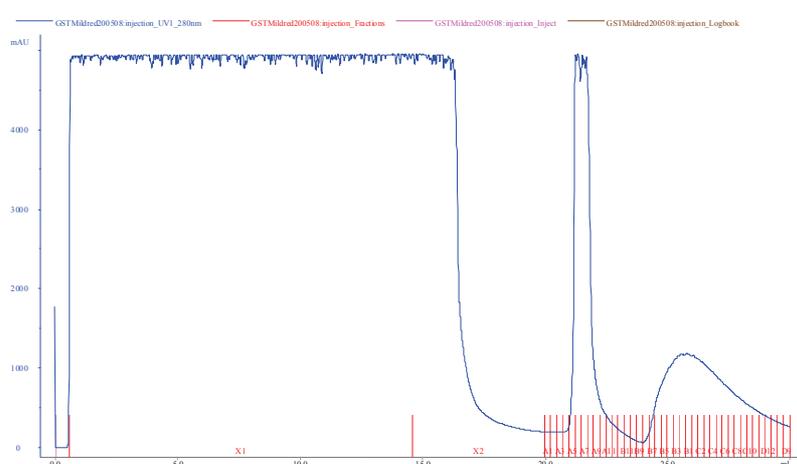
Après la purification, les protéines des fractions GST et GST-NLS sont dialysées afin de les placer dans un tampon permettant leur stockage et leur utilisation par la suite.

Les protéines sont aliquotées et stockées à -80°C. Leurs concentrations ont été déterminées comme étant de 5 µg/µl pour la GST et de 6 µg/µl pour la GST-NLS.

## **2. Purification de la protéine GST-IBB**

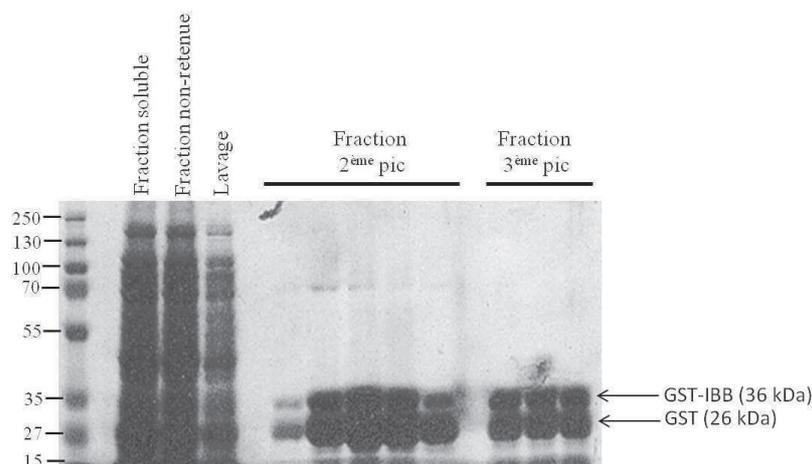
La protéine GST-IBB est en fait le domaine de l'importine  $\alpha$  qui se lie à l'importine  $\beta$  (Importin  $\beta$  binding domain), qui est fusionné avec la protéine GST. Cette protéine nous servira lors de control positif pour l'étude des interactions avec l'importine  $\beta$ .

La protéine GST-IBB est surexprimée grâce à 2 heures d'induction réalisée avec une concentration de 50  $\mu$ M d'IPTG. La protéine GST-IBB se retrouve alors majoritairement localisée dans la fraction soluble (test d'induction et analyse des fractions non montrés). Celle-ci va donc être injectée dans le système AKTA Purifier, sur une colonne GST.



**Figure 63:** Chromatogramme de la purification de la protéine GST-IBB. Obtenue sur le système AKTA Purifier par la mesure de l'absorbance à 280 nm.

La courbe d'absorbance à 280 nm obtenue montre 3 pics (Figure 63), le premier correspond à la fraction non-retenue, puis après le lavage de 5 ml, la solution d'éluion contenant du glutathion réduit est injectée ce qui provoque l'apparition du 2<sup>ème</sup> pic ainsi qu'une fraction retardée de l'éluion qui correspond au 3<sup>ème</sup> pic. Les différentes fractions récoltées sont analysées sur un gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 64).



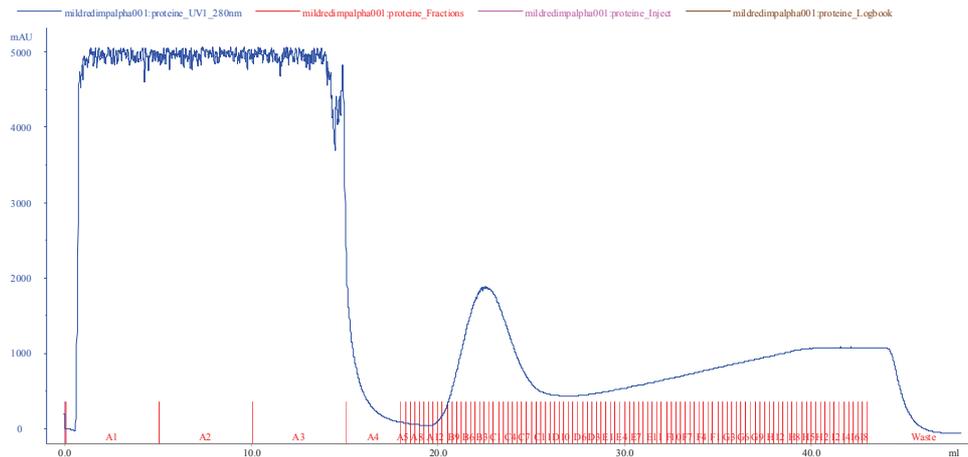
**Figure 64:** Analyse des différentes fractions obtenues après la purification de GST IBB.  
Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

Le premier puits correspond à la fraction soluble avant la purification, juste à côté nous pouvons observer un extrait de la fraction non-retenue contenant toutes les protéines qui ne se sont pas attachées sur la colonne. Puis un extrait du volume de lavage a été chargé qui nous permet de voir que certaines protéines restent attachées à la colonne de façon non spécifique mais peuvent être retirées grâce au lavage effectué.

Ce gel nous montre aussi que les pics 2 et 3 contiennent de la protéine GST-IBB qui migre à une taille d'environ 36 kDa. Les fractions contenant les plus fortes concentrations de GST-IBB sont rassemblées et dialysées dans le tampon approprié. Puis la solution de GST-IBB obtenue est quantifiée, la pureté de la solution protéique est bien sûr prise en compte. En effet, la protéine GST IBB est en minorité comparativement à la bande de 26 kDa observée et qui correspond à la taille de la protéine GST. La concentration trouvée est donc de 0,4 µg/µl de GST-IBB. Cette solution est ensuite aliquotée et stockée à -80°C.

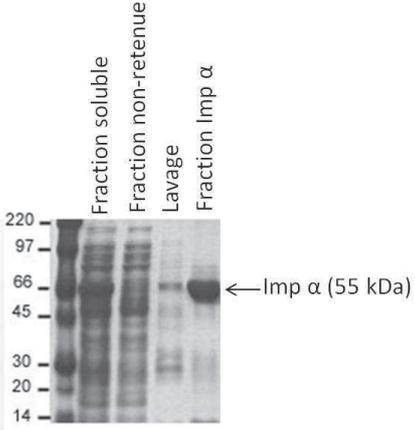
### **3. Purification de la protéine Importine $\alpha$ - His :**

La purification de l'importine  $\alpha$ , qui est une des protéines de l'import, se fait grâce à une colonne de nickel, l'importine  $\alpha$  utilisée possédant une étiquette histidine. Elle est retrouvée majoritairement dans la fraction soluble du lysat bactérien (test d'induction et analyse des fractions non montrés). Cette fraction est injectée dans le système AKTA Purifier et le suivi de l'absorbance (Figure 65) nous montre que l'importine  $\alpha$ , qui est éluée grâce à un gradient d'imidazole, sort dans les fractions correspondantes au 2<sup>ème</sup> pic.



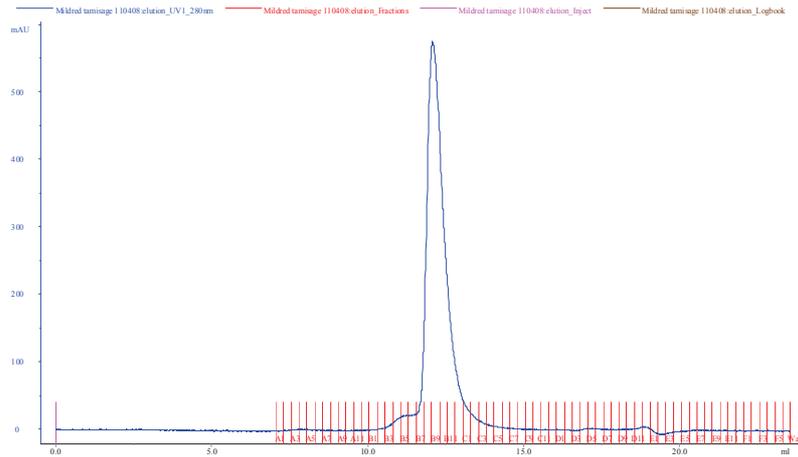
**Figure 65:** Chromatogramme de la purification de la protéine importine  $\alpha$ . Obtenue sur le système AKTA Purifier avec une colonne HisTrap par la mesure de l'absorbance à 280 nm.

Les différentes fractions obtenues après la 1<sup>ère</sup> colonne sont analysées sur un gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 66), cela montre que le 2<sup>ème</sup> pic est composé en majorité d'une protéine de 55 kDa ce qui correspond à la taille de l'importine  $\alpha$ .



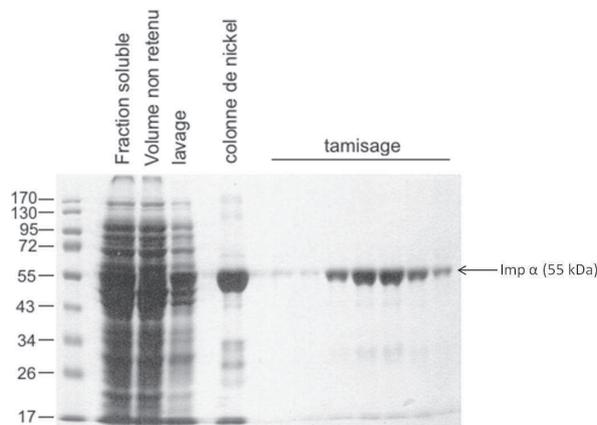
**Figure 66:** Analyse des différentes fractions obtenue après la purification de l'Importine  $\alpha$ . Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

Les fractions du pic correspondant à l'importine  $\alpha$  sont ensuite réinjectées sur une colonne de tamisage, la Superose 12. Cette seconde étape de purification améliore le degré de pureté de la protéine importine  $\alpha$  (Figure 67).



**Figure 67:** Chromatogramme de la purification de la protéine Importine  $\alpha$ .  
Obtenue sur le système AKTA Purifier par la mesure de l'absorbance à 280 nm.

Les fractions sont ensuite analysées sur un gel SDS PAGE (Figure 68), où l'on peut voir que le passage sur la 2<sup>ème</sup> colonne permet de retirer les contaminants de taille supérieure ainsi que légèrement ceux de taille inférieure. En effet, la pureté de la protéine après la 1<sup>ère</sup> colonne est de 52 % alors qu'après la 2<sup>ème</sup> la pureté augmente à 75 %.

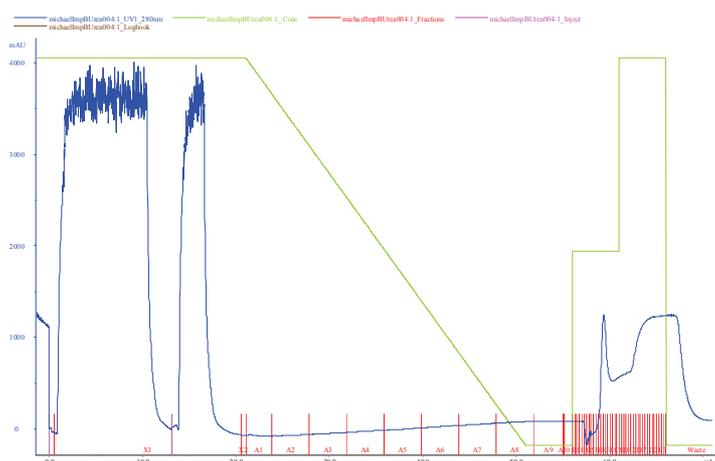


**Figure 68:** Analyse des différentes fractions obtenue après la purification de l'Importine  $\alpha$ . Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

Les fractions de la protéine obtenues après la 2<sup>ème</sup> colonne sont rassemblées et dialysées dans le tampon approprié. La concentration de la solution obtenue est d'environ 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  et cette solution est aliquotée et stockée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

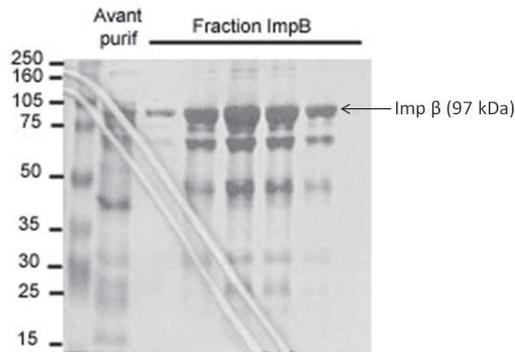
#### 4. Purification de l'importine $\beta$ - His :

La purification de la protéine importine  $\beta$  s'effectue à partir de la fraction insoluble du lysat bactérien après induction (test d'induction et analyse des fractions non montrés). La fraction insoluble est donc reprise dans une solution à 6 M d'urée, et après centrifugation pour clarification, cette solution est injectée sur une colonne de nickel car l'importine  $\beta$  possède une étiquette histidine. Lorsque la protéine est fixée sur la colonne, un gradient est effectué afin de diminuer progressivement la concentration en urée et favoriser la renaturation de la protéine. Puis la quantité d'imidazole est augmentée en 2 étapes, 250 mM et 500 mM. Ces changements de concentration sont indiqués sur le chromatogramme en vert (Figure 69), ainsi que l'absorbance mesurée à 280 nm en bleu. On observe que le pic contenant l'importine  $\beta$  est élué dès le 1<sup>er</sup> changement de la quantité d'imidazole, à 250 mM.



**Figure 69:** Chromatogramme de la purification de la protéine Importine  $\alpha$ .  
Obtenu sur le système AKTA Purifier avec une colonne HisTrap par la mesure de l'absorbance à 280 nm.

Les fractions obtenues après la purification sont ensuite analysées sur un gel SDS PAGE, coloré au bleu de Coomassie (Figure 70). Ce gel nous montre que l'importine  $\beta$  entière a bien été purifiée ou du moins enrichie car la pureté de la solution obtenue n'atteint pas les 50 %. La concentration de la solution est d'environ 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

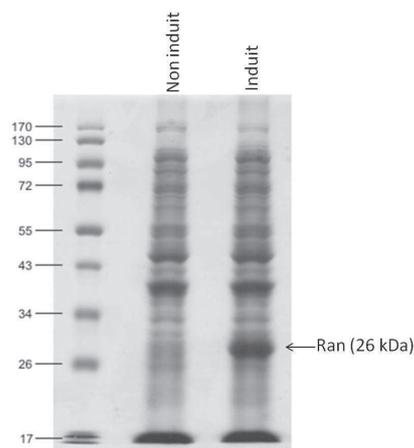


**Figure 70:** Analyse des fractions obtenues après la purification de l'Importine  $\beta$ .  
Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

## 5. Purification de la protéine Ran :

La protéine Ran est une des protéines importantes de l'import, en effet cette protéine permet la dissociation du complexe d'import dans le panier nucléaire et permet ainsi la libération des cargos dans le noyau.

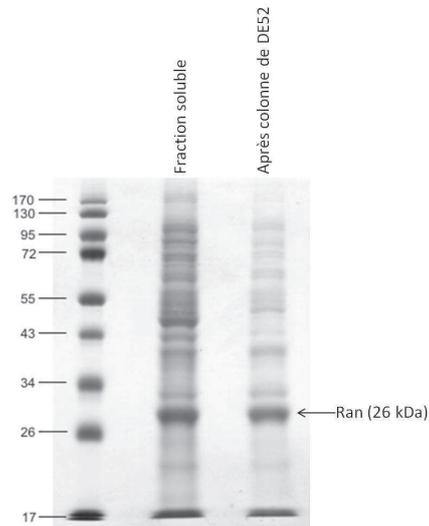
La surexpression de la protéine Ran doit se faire sur des transformant frais, la vérification des clones se fait à partir de mini-culture, 1ml est prélevé avant et à la fin de l'induction. Ces 1ml sont centrifugés et le culot est repris dans 200  $\mu$ l de bleu de charge dénaturant, 20  $\mu$ l du lysat est déposé sur un gel SDS PAGE (Figure 71).



**Figure 71:** Vérification de l'induction de la protéine Ran  
Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

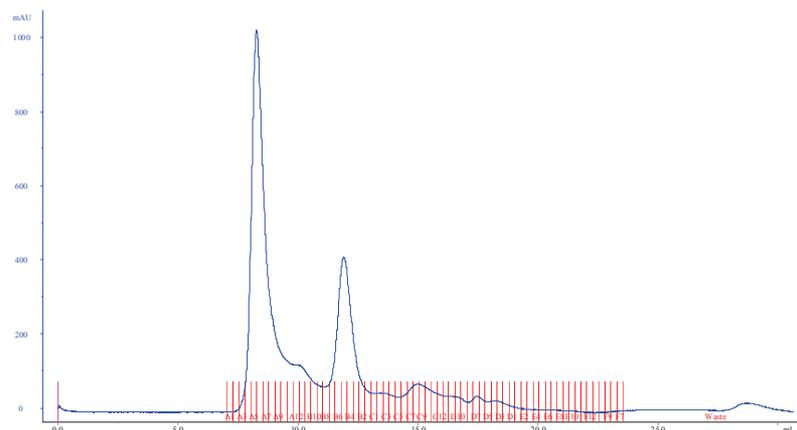
Après que l'induction ait été effectuée, la fraction soluble du lysat cellulaire est déposée sur une colonne composée d'une matrice de DE52 (test d'induction et analyse des fractions non montrés). Le volume non-retenu qui contient la protéine Ran est récupéré. Une analyse de

celui-ci sur gel SDS-PAGE montre que cette 1<sup>ère</sup> colonne permet de retirer une partie des contaminants (Figure 72).



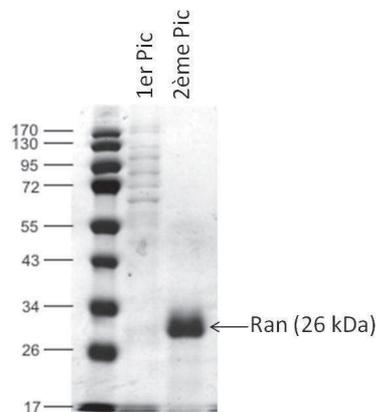
**Figure 72:** Analyse de la solution de Ran après la 1<sup>ère</sup> colonne de DE52  
Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

Suite à cette 1<sup>ère</sup> colonne, une précipitation est effectuée grâce à une saturation de la solution avec 65% de sulfate d'ammonium. Les protéines précipitées sont ensuite reprises dans un faible volume de tampon de transport et injectées sur une colonne d'exclusion de taille, la Superdex 75 (Figure 73).



**Figure 73:** Chromatogramme de la 2<sup>ème</sup> colonne de Purification de Ran.  
Suivi de l'absorbance à 280 nm après injection de la solution de Ran sur la Superdex 75

Le suivi de l'absorbance à 280 nm montre 2 pics importants qui sont analysés sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 74). Le 1<sup>er</sup> pic correspond aux protéines de haut poids moléculaire, et le 2<sup>ème</sup> pic correspond à la protéine Ran.



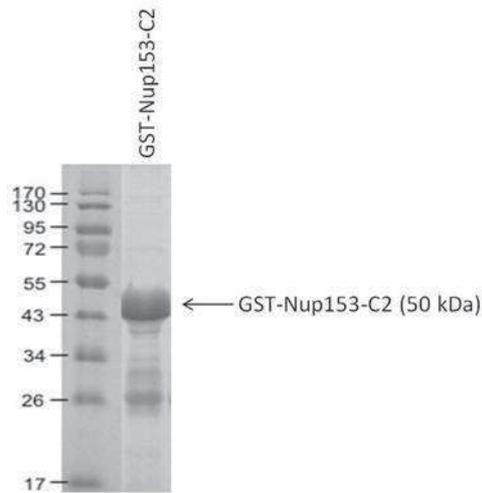
**Figure 74:** Analyse des différents pics obtenus après la 2<sup>ème</sup> colonne  
Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

Les fractions du 2<sup>ème</sup> pic sont donc récupérées et rassemblées. La solution de Ran est ensuite dialysée contre le tampon approprié. La quantification de la protéine donne une solution à environ 0,2 µg/µl de Ran et sa pureté est d'environ 75 %.

## **6. Purification du fragment de la Nup153-C2 :**

La Nup153 a été montrée comme l'une des protéines interagissant avec la capsid au niveau du panier nucléaire, de plus elle présente un site d'interaction avec l'importine β. Nous avons donc voulu analyser son rôle lors de l'import nucléaire ainsi que lors de la dissociation des capsides. Cependant étant donné la difficulté de purifier de la Nup153 entière, nous avons préféré utiliser le fragment de la Nup153-C2 pour effectuer la suite des expériences. Ce fragment est le domaine C2 du clone partiel de la Nup153 de xénope référencé dans Genbank sous le nom [gi: 3047240].

La purification de ce fragment s'effectue à partir de la fraction soluble du lysat bactérien après induction. La fraction soluble est ensuite injectée sur une colonne de glutathion. Les différentes fractions obtenues sont ensuite rassemblées et dialysées avant d'être stockées à -80°C.



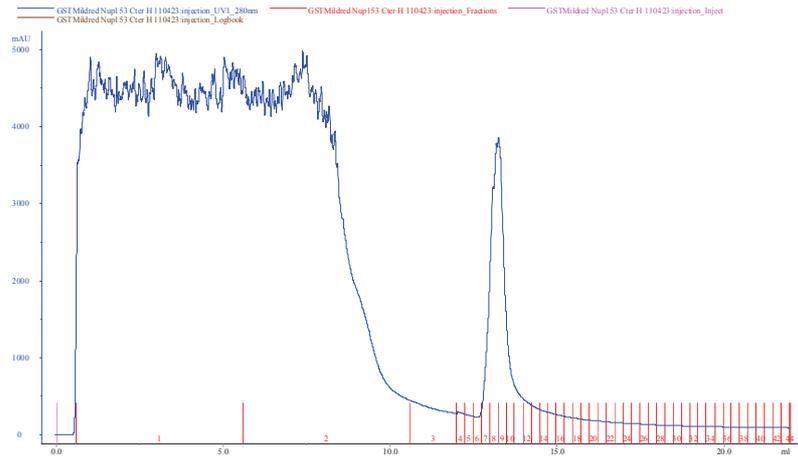
**Figure 75:** Analyse de Nup153-C2  
Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

Le fragment C2 est un fragment du domaine C-terminal et possède les répétitions FG caractérisant ce domaine. La protéine GST-Nup153-C2 est un fragment de 50 kDa contenant les acides aminés de 992 à 1219. La pureté de la solution obtenue est d'environ 50 % (Figure 75) et la solution présente une concentration de GST-Nup153-C2 d'environ 1,7 µg/µl.

## **7. GST-Nup153-C-terminal humaine :**

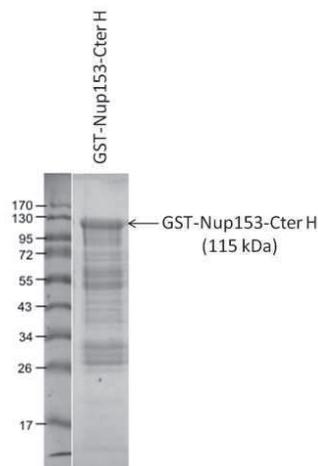
Les expériences ont été réalisées avec le fragment de la Nup153 de xénope, cependant il n'existe que 47 % d'homologie entre la Nup153 de xénope et la Nup153 humaine. C'est pourquoi afin de vérifier les résultats obtenus par la suite nous avons effectué la purification de la GST-Nup153-Cter.

La protéine GST-Nup153-C-terminal humaine correspond à la totalité du domaine C-terminal (des résidus 609 à 1475) de la Nup153.



**Figure 76:** Purification sur le système AKTA

La purification sur le système AKTA Purifier donne l'éluion de la protéine dans les fractions correspondant au 2<sup>nd</sup> pic sur le chromatogramme (Figure 76). Ces fractions ont été analysées sur un gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 77).



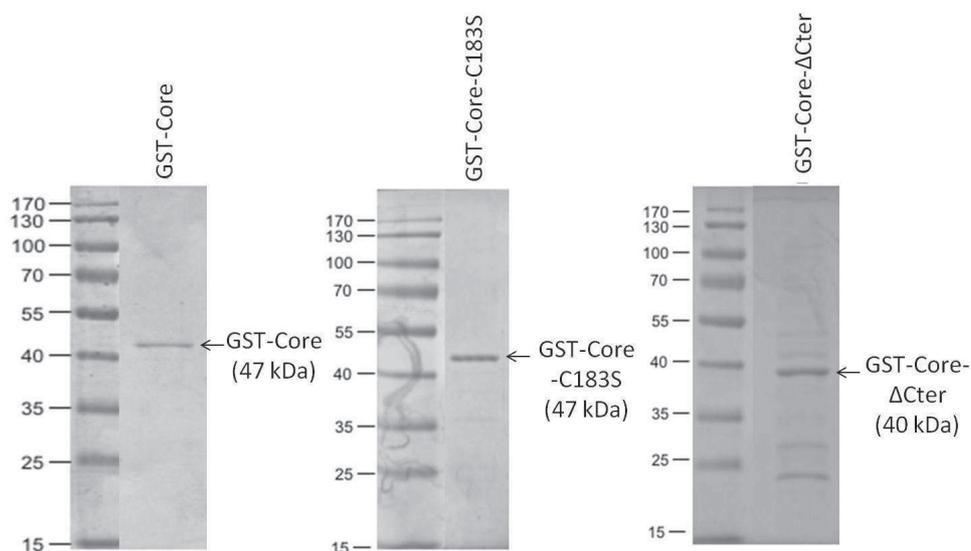
**Figure 77:** Analyse des fractions du pic de la purification de la Nup153-Cter humaine  
Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie

Le domaine C-terminal de la Nup153 fusionné avec la protéine GST donne un poids moléculaire d'environ 115 kDa, ce qui correspond à la bande la plus haute sur le gel. La concentration de la GST-Nup153-Cter obtenue après dialyse est de 0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , et la pureté de la protéine est à environ 15 %.

## 8. Purification des protéines Core :

La protéine Core, qui est la sous unité de la capside, est une protéine qui pose certains problèmes pendant sa purification et son utilisation car elle a tendance à s'auto-assembler, bien que la protéine Core soit fusionnée à une protéine GST ce qui va inhiber l'assemblage de la protéine Core en capside mais ne va pas abolir sa propension à se lier en dimère et à former des agrégats.

Après la purification les protéines sont déposées sur un gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 78). Les protéines GST-Core et GST-Core-C183S ont une masse moléculaire de 47 kDa alors que la protéine GST-Core $\Delta$ Cter a une masse moléculaire de 40 kDa.



**Figure 78:** Analyse des fractions du pic de la purification des protéines GST-Core, GST-Core-C183S et GST-Core- $\Delta$ Cter. Gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie.

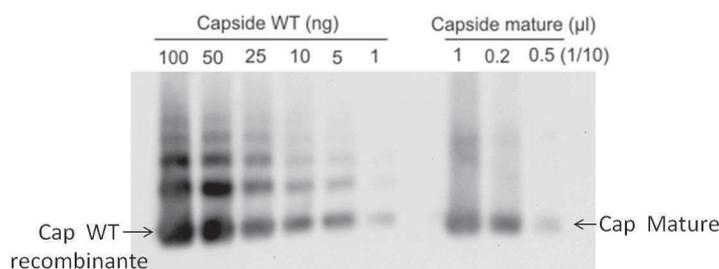
Les protéines obtenues ont une concentration de 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  pour la protéine GST-Core, de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  pour la protéine GST-Core-C183S et de 0,9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  pour la protéine GST-Core $\Delta$ Cter. La pureté de ces protéines est d'environ 90 % pour la GST-Core, 80 % pour la GST-Core-C183S et environ 60 % de pureté pour la protéine GST-Core- $\Delta$ Cter.

## 9. Purification des Capsides :

### a. Capsides Matures :

Les capsides matures sont purifiées à partir du surnageant de la culture des cellules HepG2.2.15. Après une première ultracentrifugation sur coussin de TNE-NP40-sucrose, les virions sont traités avec 1 % de NP40 ce qui va libérer la capside des protéines de surface. Après une deuxième ultracentrifugation sur coussin de TNE-NP40-sucrose, les capsides sont stockées à -20°C et leur concentration est déterminée.

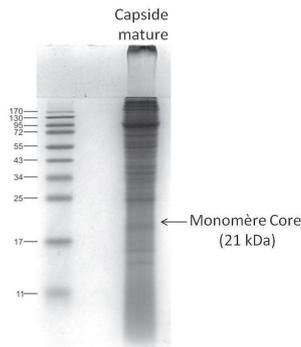
La détermination de la concentration des capsides se fait donc par comparaison avec une gamme de standards dont la concentration est connue, ces standards étant de la capside recombinante. Les standards, ainsi que la capside mature sont donc chargés sur un gel d'agarose de 1 % où la capside va migrer sous sa forme entière de manière similaire à un ADN de taille d'environ 3000 pb. Puis après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane par transfert sous vide. La membrane est révélée avec l'anticorps anti-HBcAg (Dako) (Figure 79).



**Figure 79:** Quantification de la capside mature grâce à une gamme de standard. Migration sur gel d'agarose et révélation de la membrane avec l'anticorps anti-HBcAg (Dako).

L'intensité des bandes obtenues sur cette membrane a été utilisée afin de déterminer la concentration de la capside mature purifiée, par l'utilisation du logiciel ImageJ. Cette détermination indique une concentration d'environ 20 ng/µl.

On peut aussi observer sur cette membrane, que les capsides matures sont formées car leur migration est la même que les capsides recombinantes. Cependant, nous pouvons observer que les capsides recombinantes apparaissent aussi à des tailles plus grandes, ces bandes sont en fait des capsides reliées entre elles par de l'ARN. En effet, un traitement avec une RNase diminue la présence de ces bandes.

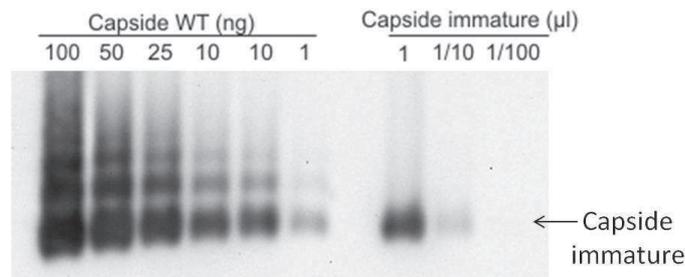


**Figure 80:** Pureté de la capside mature. Migration sur gel SDS-PAGE et coloration au Coomassie.

La pureté des capsides a été observée sur un gel SDS-PAGE (Figure 80) et nous pouvons voir que la majorité des protéines sont des protéines contaminantes.

b. Capsides Immatures :

La même quantification a été réalisée avec les capsides immatures. Ces capsides ont été purifiées à partir des cellules HepG2.2.15. Après lavage des cellules pour retirer toute trace du surnageant, celle-ci sont lysées et les capsides intracellulaires sont purifiées. La quantification a été faite de la même manière que pour les capsides matures (Figure 81).



**Figure 81:** Quantification de la capside immature grâce à une gamme de standard. Migration sur gel d'agarose et révélation de la membrane avec l'anticorps anti-HBcAg (Dako).

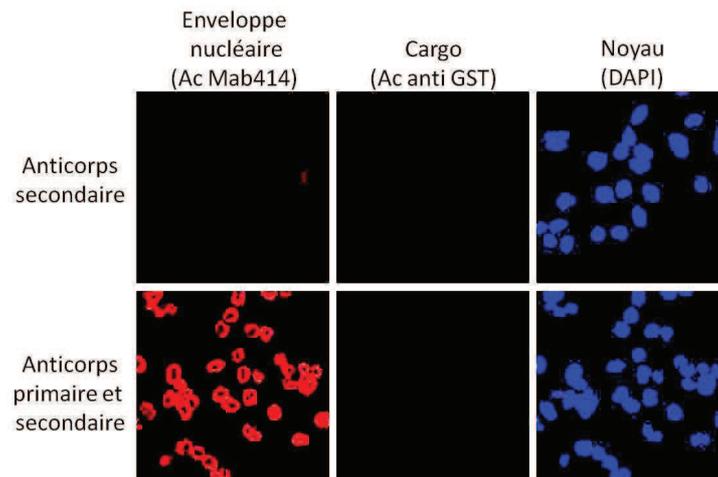
## II. Vérification de l'activité de l'Importine $\alpha$ et $\beta$ :

Les importines  $\alpha$  et  $\beta$  nécessitent la vérification de leurs activités, avant leurs utilisations dans d'autres expériences, par un essai d'import nucléaire en utilisant des cellules Hela perméabilisées.

### 1. Vérification de la spécificité des anticorps primaires et secondaires :

Premièrement, nous avons vérifié par immunofluorescence que les anticorps utilisés pour cet essai ne réagissent pas de façon non-spécifique avec les cellules.

Pour cela des cellules Hela ont été fixées puis elles ont subi le même traitement que les cellules de l'essai d'import nucléaire, lors de l'étape d'immunofluorescence. Les cellules sont marquées avec les anticorps primaires, l'anticorps Mab414 de souris ( $1/300^{\text{ème}}$ ) qui reconnaît certaines nucléoporines du NPC et l'anticorps anti-GST de chèvre ( $1/300^{\text{ème}}$ ), et les anticorps secondaires utilisés sont l'Alexa 488 anti chèvre ( $1/200^{\text{ème}}$ ) et l'Alexa 594 anti souris ( $1/200^{\text{ème}}$ ).



**Figure 82:** Immunofluorescence avec les Anticorps primaire et secondaire utilisés lors de l'essai d'import nucléaire. L'ADN est marqué en bleu par le DAPI, les NPC sont marqués en rouge et les cargos sont marqués en vert

Après observation au microscope confocal (Figure 82), on peut voir que les anticorps secondaires seuls ne montrent aucun signal, ce qui signifie qu'il n'y pas de signaux dus à des

interactions non spécifiques. Lorsque l'on rajoute les anticorps primaires, le marquage de l'enveloppe nucléaire devient visible, en revanche l'addition de l'anticorps primaire anti-GST ne donne aucun signal ce qui est normal car il n'y a pas de protéine GST endogène dans les cellules. Les anticorps ne montrent donc pas de signaux non spécifiques ou de bruit de fond qui pourrait se révéler gênant pour la suite de l'expérience.

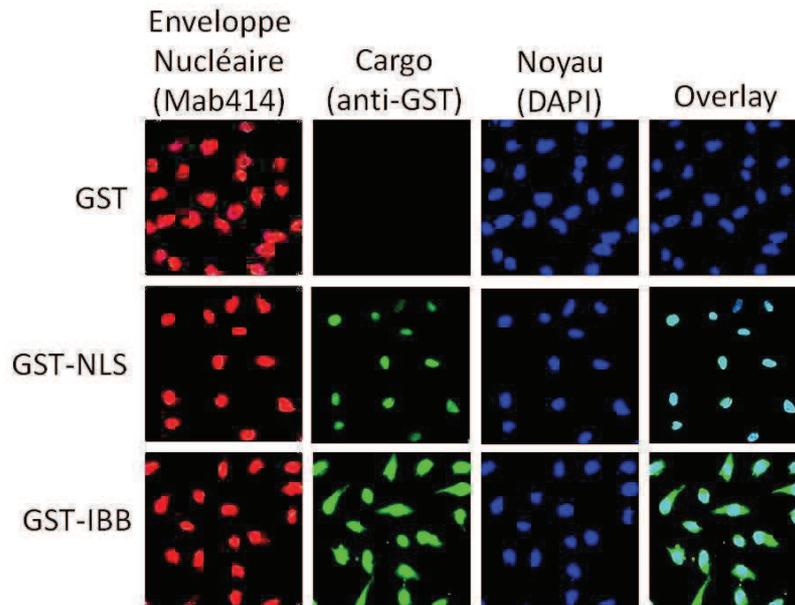
## **2. Import nucléaire des protéines GST, GST-NLS et GST-IBB :**

Après avoir vérifié que les anticorps utilisés ne nous posent pas de soucis, nous avons importé les protéines GST, GST-NLS et GST-IBB, la protéine GST étant utilisée comme témoin négatif car elle ne possède pas de signal de localisation nucléaire. La protéine GST-NLS est importée par les importines  $\alpha$  et  $\beta$ , alors que la protéine GST-IBB est importée par l'importine  $\beta$  seule.

### **a. Avec le RRL :**

Premièrement, un contrôle positif de l'import des protéines utilisées est réalisé avec du RRL, du lysat de réticulocytes de lapin, qui contient toutes les protéines nécessaires à l'import des cargos dans le noyau.

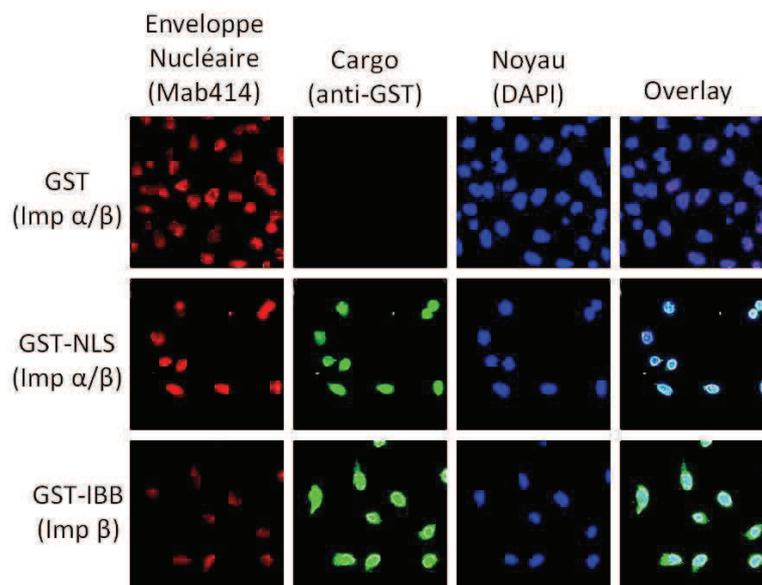
Les résultats de cet import (Figure 83), montre que les protéines GST ne sont pas importées dans le noyau ce qui est en accord avec le fait que cette protéine ne possède pas de signal de localisation nucléaire. Le GST-NLS quant à lui possède le NLS du SV40, il est donc importé dans le noyau (2<sup>ème</sup> ligne), ce qui est démontré par la colocalisation de la protéine (en vert) avec le noyau (en bleu). Le GST-IBB, qui possède le "Importin beta binding domain", domaine de l'importine  $\alpha$  qui interagit avec l'importine  $\beta$  est lui aussi importé dans le noyau (3<sup>ème</sup> ligne).



**Figure 83:** Import nucléaire avec le RRL des protéines GST (T-), GST-NLS et GST-IBB. L'ADN est visible en bleu, le NPC est marqué en rouge et les cargos GST sont marqués en vert.

b. Avec les Importines  $\alpha$  et  $\beta$  :

La même expérience est réalisée, mais où le RRL est remplacé par un mélange d'importine  $\alpha$  et  $\beta$ , de protéines additionnelles nécessaires à l'import comme RanGDP, ainsi que de l'ATP et du GTP.



**Figure 84:** Import nucléaire avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$  des protéines GST (T-), GST-NLS et GST-IBB. L'ADN est marqué en bleu, les NPC sont marqués en rouge et les cargos GST sont marqués en vert

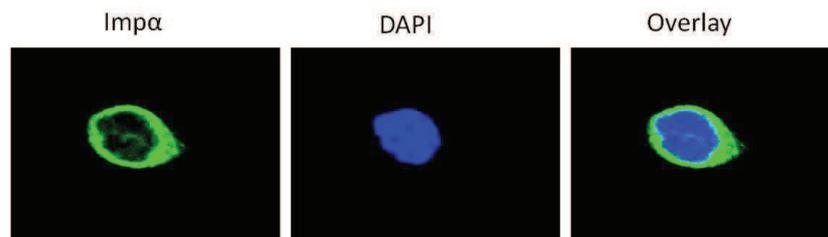
Pour la protéine GST, aucun signal vert n'est visible, la protéine GST n'est toujours pas importée au niveau du noyau, ce qui signifie que la membrane du noyau ainsi que le NPC jouent toujours leurs rôles de barrière et que l'import est bien réalisé par un import actif et non par diffusion. Les protéines GST-NLS et GST-IBB sont bien importées dans le noyau ce qui nous montre que les importines  $\alpha$  et  $\beta$  sont bien actives, ou tout du moins une partie des protéines recombinante sont actives et suffisantes pour effectuer l'import des cargos (Figure 84).

### III. Localisation des importines endogènes :

La capsid du VHB est transportée dans le cytoplasme par les réseaux des microtubules. Cependant le transport de la capsid par les microtubules emmène la capsid jusqu'au niveau du MTOC (Microtubule organizing center) mais le transport depuis le MTOC jusqu'au pore nucléaire n'est pas encore précisément défini. Notre hypothèse propose que ce sont les protéines importine  $\alpha$  et  $\beta$  mises en jeu dans l'import nucléaire de la capsid qui vont également permettre à celle-ci d'arriver jusqu'au pore nucléaire. C'est pour cette raison que nous avons voulu déterminer la localisation de ces protéines dans les cellules.

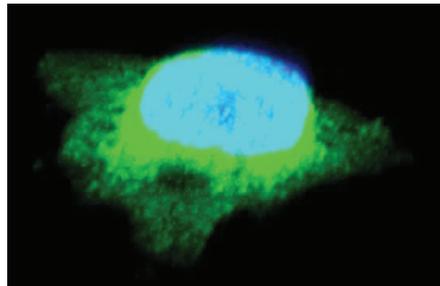
Pour cela nous avons effectué une réaction d'immunofluorescence dans des cellules HeLa avec les anticorps anti alpha (1/500) et anti beta (1/15). Cependant l'anticorps anti-importine  $\beta$  ne permet d'obtenir aucun signal et cela malgré une dilution au 1/15<sup>ème</sup>. C'est pour cette raison que nous ne montrerons que les résultats obtenus avec l'anticorps contre l'importine  $\alpha$ .

Au microscope confocal, les cellules sont observées (Figure 85) et un maximum d'images sont prises sur les différents plans de la cellule (Z-stack), le nombre et l'épaisseur des couches sont déterminés automatiquement par le logiciel afin d'optimiser les images.



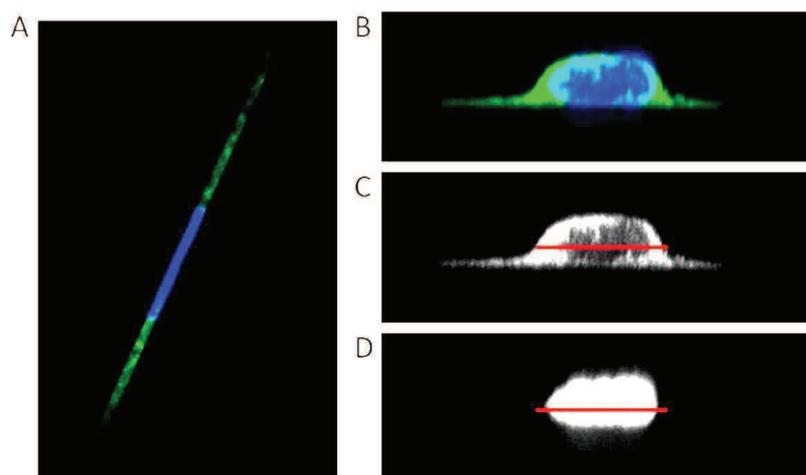
**Figure 85:** Immunofluorescence pour la localisation de l'importine  $\alpha$ . Endogène.  
Le noyau est marqué en bleu par le DAPI et les importines  $\alpha$  endogènes sont marquées en vert par l'anticorps anti- $\text{Imp } \alpha$  et l'alexa 488.

Cependant, le microscope confocal nous permet de visualiser la localisation approximative de la protéine, pour cette raison nous avons choisis d'effectuer une reconstitution en 3D de la cellule afin de voir où est localisée la protéine. La reconstitution se fait à partir des images des différents plans de la cellule (du Z-stack) et du logiciel Imaris (Figure 86).



**Figure 86:** Immunofluorescence pour la localisation de l'importine  $\alpha$  endogène, image d'une cellule après reconstitution 3D grâce au logiciel Imaris. Le noyau est marqué en bleu par le DAPI et les importines  $\alpha$  endogènes sont marquées en vert par l'anticorps anti-Imp  $\alpha$  et l'alexa 488.

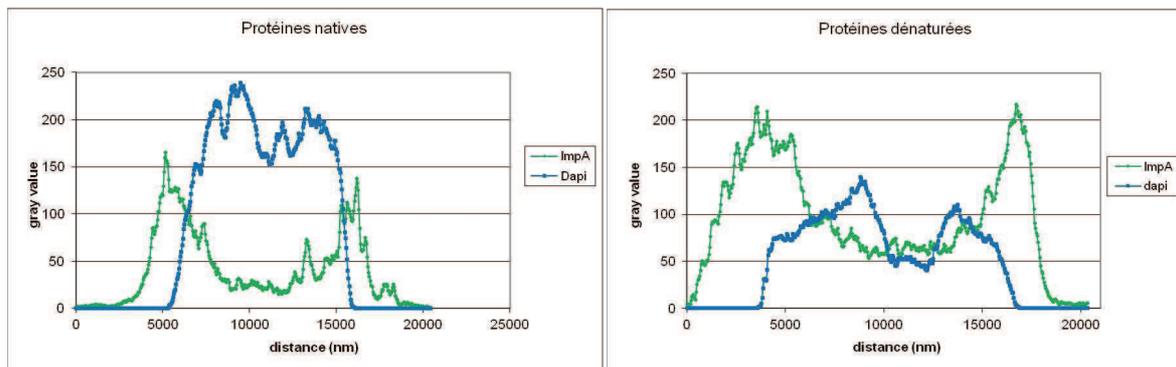
Cette image en 3D nous permet de mieux visualiser la localisation de l'importine  $\alpha$  dans la cellule. Sa localisation semble en effet plus cytoplasmique que nucléaire. Cependant, afin de s'assurer de sa localisation et de pouvoir analyser celle-ci plus en détails, nous avons quantifié l'intensité des signaux de l'importine  $\alpha$  sur la longueur de la cellule. Avant de réaliser la quantification, il a fallu s'affranchir du problème dû à la profondeur de la cellule qui va dépendre de la forme et de la taille de celle-ci.



**Figure 87:** Différentes étapes pour l'obtention des images utilisées pour la détermination de la localisation de l'importine  $\alpha$ . (A) : tranche verticale de la cellule reconstituée en 3D, (B) : Repositionnement de la tranche vertical de la cellule de façon à la voir de face, (C/D) : Séparation des signaux vert représentant l'Imp  $\alpha$  (C), des signaux bleu représentant le noyau (D). Le trait rouge montre la localisation où le "plot density" a été réalisé.

Pour répondre à ce problème, nous avons coupé une tranche à la verticale de la cellule (Figure 87, A), qui a ensuite été positionnée de manière à visualiser l'intérieur de la cellule (Figure 87, B). Grâce au logiciel ImageJ, l'image peut ensuite être séparée en fonction de la couleur des signaux. Nous obtenons donc une image des signaux verts de l'importine  $\alpha$  et une image des signaux bleus pour le noyau (Figure 87, C et D). Par la suite l'intensité des signaux peut être mesurée le long d'une ligne horizontale indiquée en rouge sur la figure 88.

Cette expérience a été réalisée sur des protéines natives, or l'anticorps utilisé reconnaît un domaine large (des résidus 254 à 497), domaine qui est aussi impliqué dans les interactions de l'importine  $\alpha$  avec les cargos possédant un NLS, ainsi qu'avec la protéine CAS pour son recyclage. Pour cette raison, l'expérience a aussi été réalisée après dénaturation des protéines, effectuée par une incubation de 10 minutes à 65°C.



**Figure 88:** Visualisation de la localisation de l'importine  $\alpha$  (en vert) par rapport au noyau (en bleu) sur des protéines natives (à gauche) ou dénaturées (à droite).

Ces graphiques nous montrent premièrement la localisation du noyau, grâce à la courbe bleu qui représente l'ADN marqué par le DAPI. Puis nous pouvons observer que dans les cellules où les protéines ont été dénaturées l'importine  $\alpha$  est surtout localisée au niveau de la membrane nucléaire et sa concentration diminue pour former un gradient dans le cytoplasme (Figure 88). Les résultats obtenus sur les cellules où les protéines n'ont subi aucune dénaturation, nous permettent de dire que les interactions avec les NLS et la protéine CAS se situent majoritairement au niveau de l'enveloppe nucléaire.

#### IV. Analyse des interactions qui ont lieu lors de l'import nucléaire de la capsid du VHB :

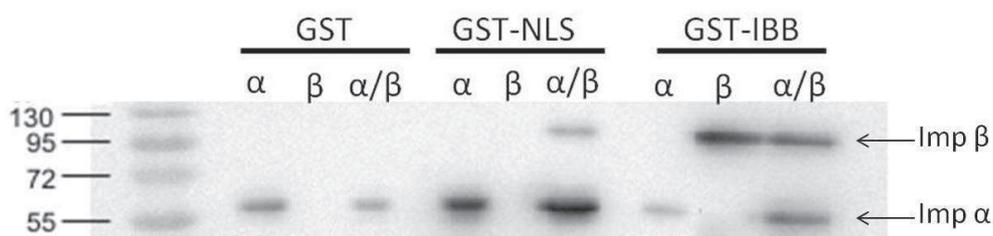
Il a été montré que l'import nucléaire et l'attachement de la capsid est effectué par les importines  $\alpha$  et  $\beta$ , l'importine  $\alpha$  étant une protéine adaptatrice qui va reconnaître les NLS présents à la surface de la capsid. L'importine  $\alpha$  va ensuite se lier à l'importine  $\beta$  qui va transporter ce complexe jusqu'au panier nucléaire où le complexe va être dissocié.

Nous avons voulu analyser les interactions qui ont lieu lors de cet import et surtout lors de la dissociation du complexe avant le désassemblage de la capsid et donc la libération du génome. Pour cela différentes méthodes ont été testées.

##### 1. Formation des complexes et analyse sur gel SDS-PAGE:

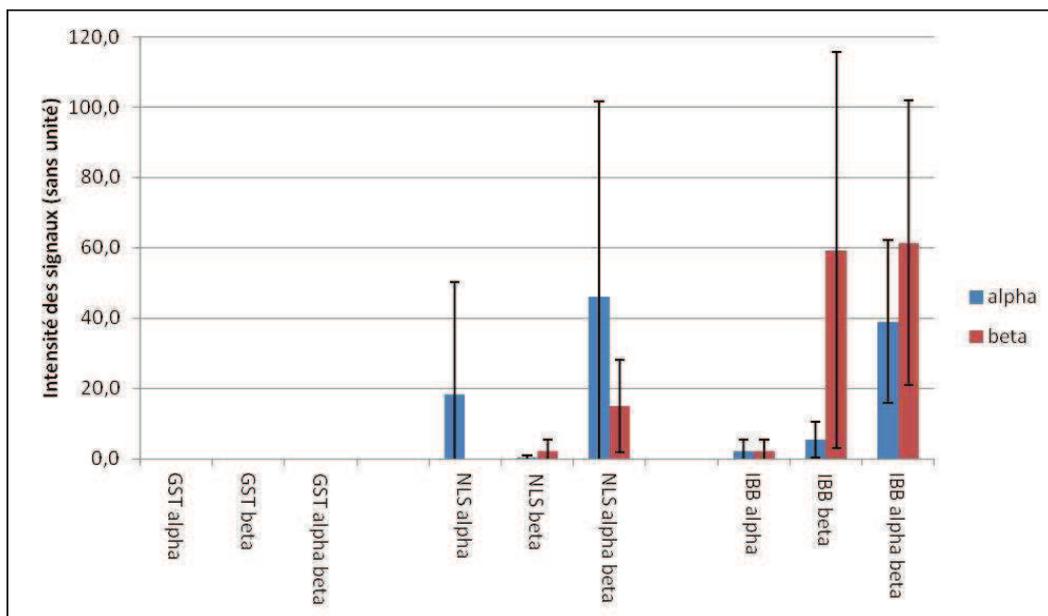
Afin de visualiser les complexes qui se forment lors de l'import de la capsid, nous avons utilisé des billes saturées de capsid comme support, ces billes ont ensuite été incubées avec l'importine  $\alpha$  et l'importine  $\beta$ . Après plusieurs lavages ces billes sont déposées sur un gel SDS-PAGE puis après un transfert des protéines sur membrane, la révélation est effectuée avec les anticorps anti-importine  $\alpha$  et anti-importine  $\beta$ .

Cependant, avant d'effectuer les expériences avec la capsid, nous nous sommes assurés que les complexes se formaient correctement avec des protéines que nous savons interagir fortement avec les importines, les protéines GST-NLS et GST-IBB. Les réactions d'interaction sont réalisées dans une solution de PBS, 500 mM de NaCl et 0,1 % de BSA.



**Figure 89:** Visualisation de la formation des complexes d'import avec les protéines GST (T-), GST-NLS et GSTIBB. Les billes glutathion ont été incubées avec les protéines fusionnées à la GST, puis après lavage, une incubation avec les importines a été effectuée. Les complexes formés sur les billes sont déposés sur un gel SDS PAGE et un Western Blot est effectué avec les anticorps anti- $\alpha$  et anti- $\beta$ .

Les résultats obtenus pour l'étude de l'interaction des importines  $\alpha$  et  $\beta$  avec les protéines GST, GST-NLS et GST-IBB sont visibles sur la figure 89. Nous pouvons observer cependant que l'importine  $\alpha$  qui reconnaît les NLS semble interagir de façon non spécifique avec la protéine GST. En revanche les signaux observés pour l'interaction avec la protéine GST-NLS sont plus intenses que les signaux non-spécifiques. L'importine  $\beta$ , quant à elle semble interagir de façon plus spécifique car elle ne se lie avec le GST-NLS qu'en présence de l'importine  $\alpha$ . On observe aussi que l'importine  $\beta$  se lie fortement à la protéine GST-IBB. Cette expérience a été répétée 3 fois et les résultats ont été rassemblés sur le graphique (Figure 90).



**Figure 90:** Analyse des interactions des importines  $\alpha$  et  $\beta$  avec les protéines GST, GST-NLS et GST-IBB visualisées sur gel SDS PAGE. Cet histogramme montre en bleu l'importine  $\alpha$  liée aux protéines sur les billes et en rouge l'importine  $\beta$ . Les traits noirs correspondent aux écart-types calculés sur 3 expériences.

Ce graphique a été obtenu par quantification de l'intensité des signaux avec ImageJ à partir des images des gels. Les signaux visibles représentent des signaux spécifiques car les résultats obtenus pour la protéine GST, correspondant à des signaux non spécifiques, ont été soustraits aux autres.

Cependant, nous pouvons observer que cette expérience n'est pas hautement reproductible, au regard des écarts types calculés qui sont particulièrement importants. D'autres techniques ont été testées, comme le système Biacore qui fonctionne sur le principe de la résonance plasmonique de surface (SPR) et permet de caractériser des interactions en temps réels. Les

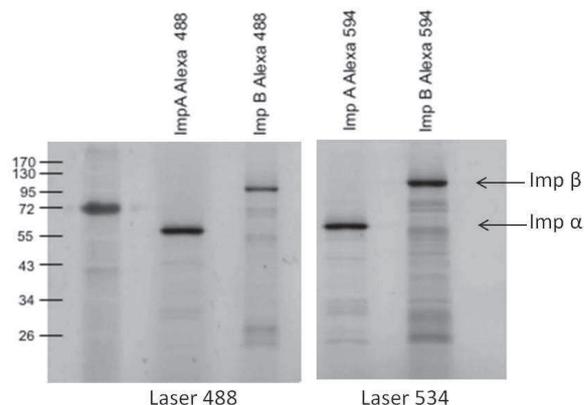
résultats obtenus montrent le même profil que ceux obtenus par co-précipitation, cependant comme pour la technique de visualisation sur gel, l'importine  $\alpha$  se lie de façon non-spécifique aux protéines sur les billes.

## **2. Formation des complexes et analyse au microscope confocal :**

Après avoir testé plusieurs systèmes pour vérifier les interactions sur les protéines GST, GST-NLS et GST-IBB, nous avons testé la formation des complexes sur billes avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$  qui ont été préalablement marquées avec un fluorochrome. Après les incubations et les lavages nécessaires, les billes sont observées au microscope confocal et les images obtenues sont analysées.

### **a. Marquage des importines $\alpha$ et $\beta$**

Premièrement, à partir des protéines purifiées, on effectue les marquages des importines  $\alpha$  et  $\beta$  avec les Alexa 488 et 594. Le marquage se fait par l'emploi de kits Invitrogen qui lient les Alexa sur les amines primaires des protéines, suivi d'une vérification de la qualité du marquage avec les lasers 488 et 536 nm de l'imager Pharos (Figure 91). En effet, les protéines après marquage sont chargées sur un gel SDS PAGE (la migration se fait dans le noir), puis après fixation des protéines dans le gel, celui-ci est révélé dans le système Pharos.

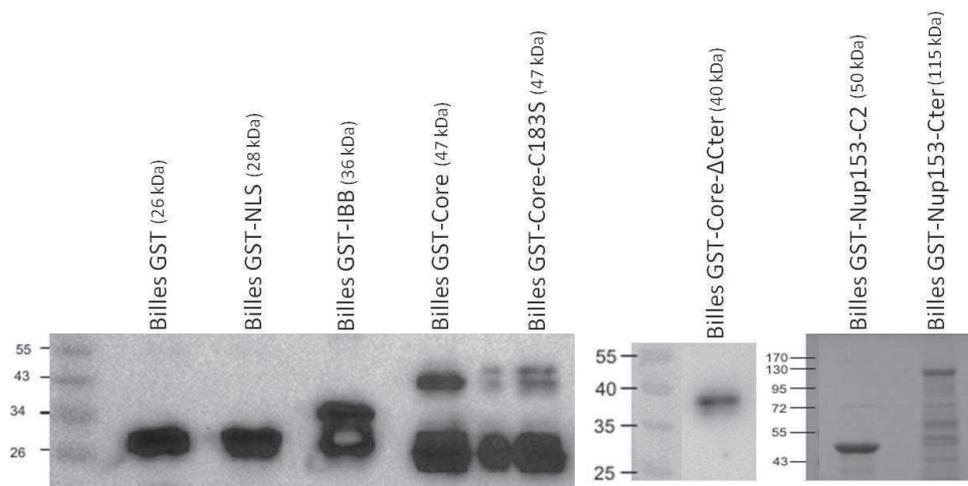


**Figure 91:** Vérification du marquage des importines  $\alpha$  et  $\beta$ . Les protéines sont chargées sur un gel SDS PAGE puis la révélation s'effectue grâce au système Pharos avec les lasers 488 et 536 nm.

La vérification du marquage nous montre que les protéines sont correctement marquées avec les Alexas 488 et 594.

b. Fixation des protéines fusionnées à la GST sur les billes :

Par la suite, les protéines fusionnées à la GST sont accrochées aux billes glutathion. Cela est vérifié par Western Blot avec l'anticorps anti GST (Figure 92).



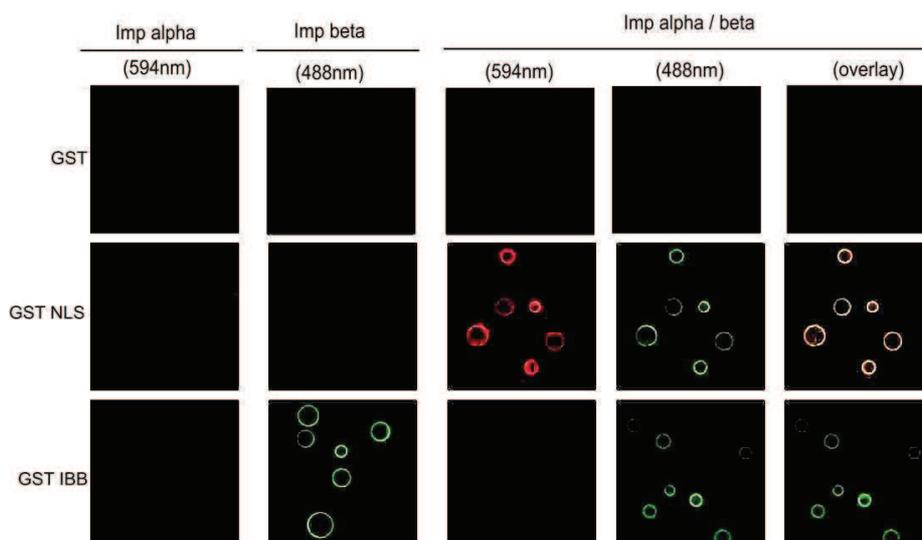
**Figure 92:** Vérification de la présence des protéines fusionnées à la GST sur les billes glutathion. Analyse sur gel SDS PAGE puis Western Blot avec l'anticorps anti GST.

Ce Western Blot, nous permet de vérifier que les protéines fusionnées à la GST sont bien retrouvées sur les billes glutathion ce qui nous permettra par la suite de pouvoir analyser les interactions qui ont lieu avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$ .

c. Essai avec les protéines GST, GST-NLS et GST-IBB :

Pour cela les billes décorées des protéines fusionnées avec la GST sont incubées avec l'importine  $\alpha$ , l'importine  $\beta$  et les importines  $\alpha/\beta$  ensemble. Après lavage, les billes sont ensuite regardées au microscope confocal.

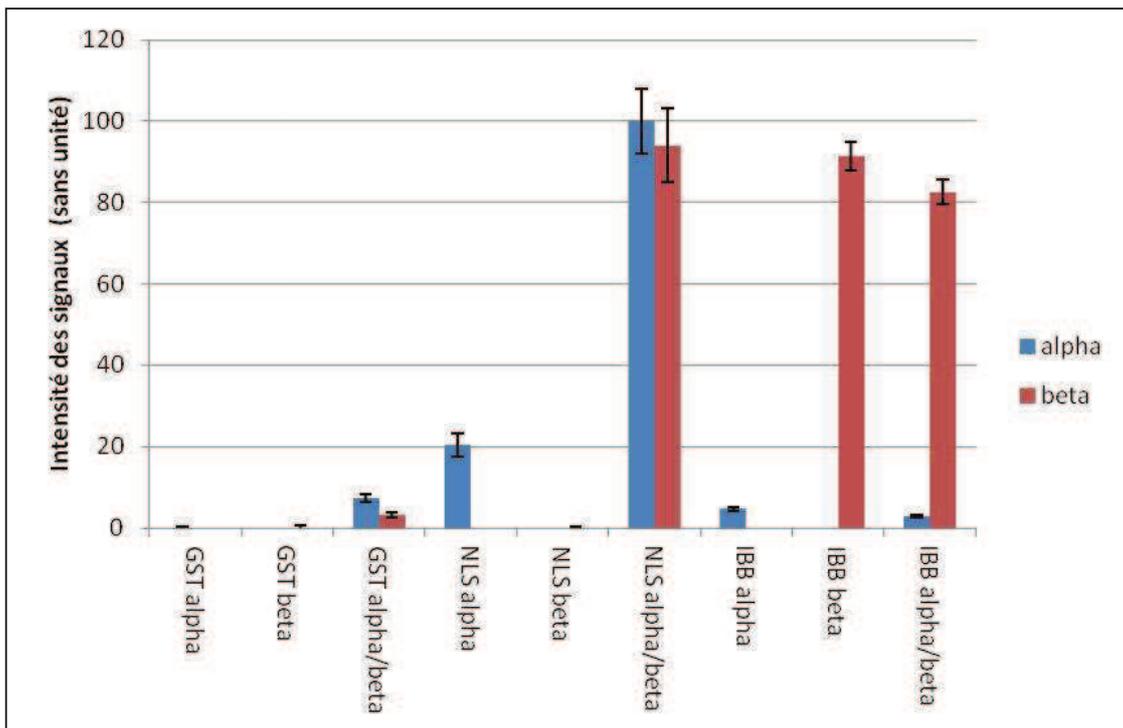
En premier lieu, nous avons testé les protéines GST, GST-NLS et GST-IBB en tant que témoins. En effet, la protéine GST ne doit interagir avec aucune des importines, alors que la protéine GST-NLS doit se lier aux importines  $\alpha$  et  $\beta$ . La protéine GST-IBB, quant à elle, doit interagir avec l'importine  $\beta$  seule.



**Figure 93:** Observation des billes au microscope confocal. L'importine  $\alpha$  est visible en rouge à 594 nm et l'importine  $\beta$  est visible en vert à 488 nm.

Ces observations (Figure 93), nous renseignent qualitativement sur la présence ou l'absence d'une association entre les protéines. Afin de quantifier ces résultats, les intensités des signaux observés autour des billes ont été mesurées. Ces résultats ont ensuite servis à présenter un histogramme afin d'obtenir une visualisation plus claire des résultats.

Cet histogramme (Figure 94), nous montre que les protéines interagissent faiblement, de manière non spécifique, à la protéine GST. Il nous montre aussi que l'importine  $\alpha$  seule se lie à la protéine GST-NLS. Cette liaison est cependant faible alors qu'en présence des importine  $\alpha$  et  $\beta$  ensemble, l'interaction de l'importine  $\alpha$  pour la protéine GST-NLS est 5 fois plus forte. De plus, le domaine IBB, "Importin  $\beta$  binding domain", qui est le domaine de l'importine  $\alpha$  se liant à l'importine  $\beta$ , interagit fortement avec l'importine  $\beta$ . Ce résultat est logique, cependant lorsque les 2 importines sont incubées ensemble avec le domaine IBB, il n'y a pas de diminution significative due à la compétition entre le domaine IBB des billes et l'importine  $\alpha$  en solution.



**Figure 94:** Histogramme de l'intensité des signaux obtenus pour les différentes interactions observées au confocal avec les protéines GST, GST-NLS et GST-IBB. Les signaux sont mesurés grâce au logiciel Image J et ont été réajustés en fonction de la quantité de protéine fixées sur les billes. Cet histogramme montre en bleu l'importine  $\alpha$  lié aux protéines sur les billes et en rouge l'importine  $\beta$ . Les traits noirs correspondent aux écarts-types calculés sur 5 expériences.

Le profil des résultats obtenus par cette technique est cependant le même que ceux obtenus par les systèmes d'analyse sur gel et sur le Biacore, sans la présence des interactions non spécifiques de l'importine  $\alpha$ . De plus cette technique présente moins de variation dans les résultats obtenus.

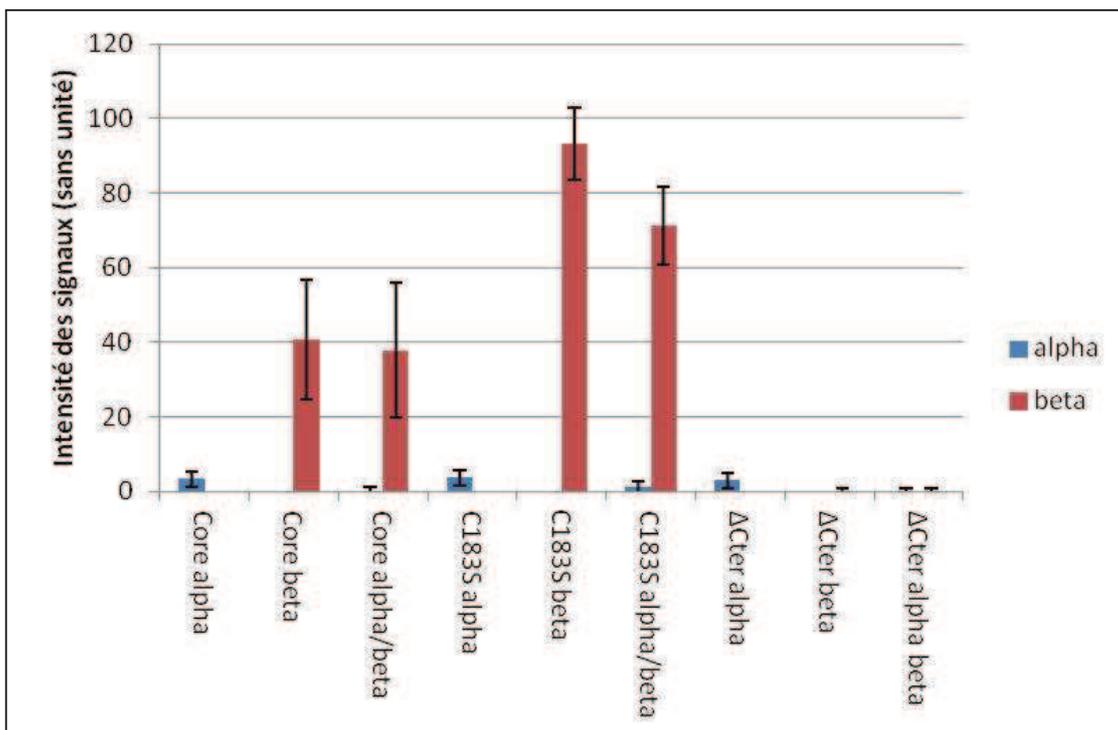
d. Analyse des interactions avec les différentes protéines Cores :

La même expérience a ensuite été réalisée sur les billes décorées avec les protéines Core, Core-C183S et Core- $\Delta$ Cter en fusion avec la GST. La protéine Core est la sous-unité composant la capsid, cependant, au laboratoire une autre capsid est souvent utilisée, il s'agit de la protéine Capsid-C183S. En effet la capsid recombinante purifiée de bactéries possède un pont disulfure non physiologique qui se forme entre les cystéines en position 183 de 2 protéines Core voisines. Ces ponts disulfures ne sont pas observés dans les capsides provenant de cellules eucaryotes après infection. Afin de s'assurer que cette modification ne joue pas un

rôle, nous avons utilisé la protéine Core recombinante C183S où la cystéine en position 183 a été mutée en une sérine.

Par ailleurs, il a été montré que le NLS de la protéine Core est localisé dans le domaine C-terminal de la protéine. C'est pour cette raison que nous avons utilisé une protéine Core où le domaine C-terminal a été délété.

L'expérience va donc être réalisée avec les protéines GST-Core, GST-Core-C183S et GST-Core- $\Delta$ Cter.



**Figure 95:** Histogramme de l'intensité des signaux obtenus pour les différentes interactions observées au microscope confocal avec les protéines GST-Core, GST-Core-C183S et GST-Core- $\Delta$ Cter. Cet histogramme montre en bleu l'importine  $\alpha$  liée aux protéines immobilisées sur les billes et en rouge l'importine  $\beta$ . Les traits noirs correspondent aux écarts-types calculés sur 3 expériences.

Cette réaction montre que la protéine GST-Core est capable d'interagir directement avec l'importine  $\beta$  seule et non avec l'importine  $\alpha/\beta$  comme cela a été décrit dans la littérature (Figure 95). Cependant, les expériences que nous avons réalisées ont été effectuées avec les protéines Core fusionnées à la GST, qui ne peuvent donc pas s'assembler en capside.

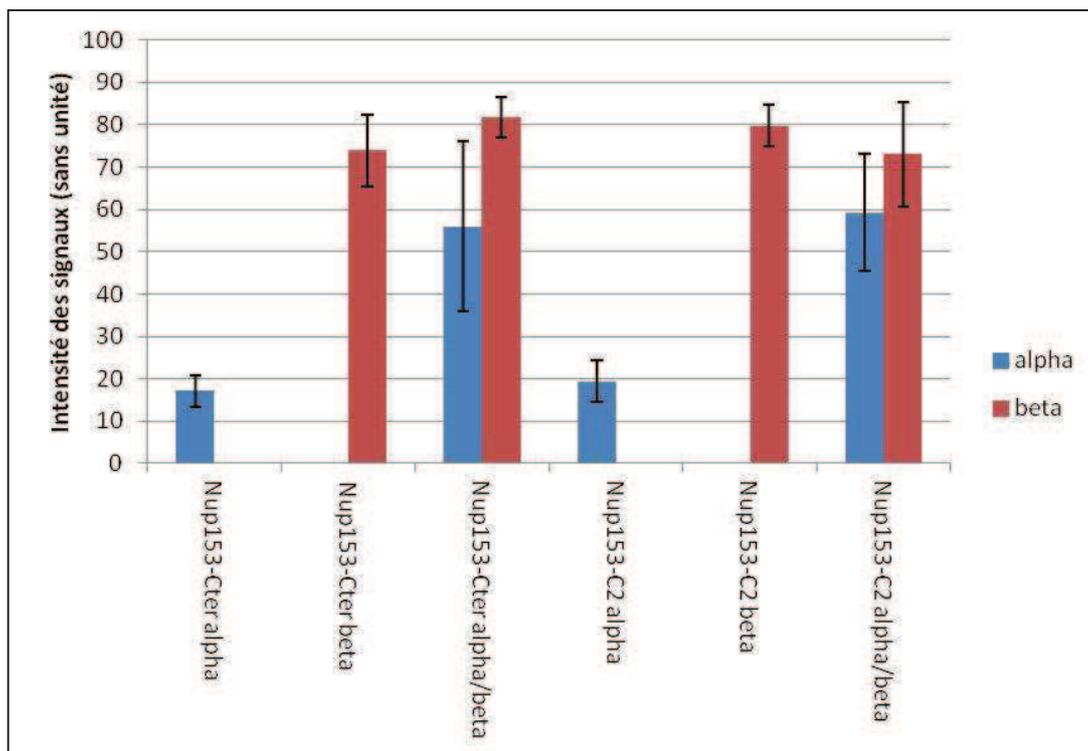
Les résultats obtenus pour la protéine GST-Core-C183S sont les mêmes que ceux obtenus pour la protéine Core, à la différence près que l'interaction observée est plus forte. Cela est vraisemblablement dû au fait que pour la protéine Core recombinante, des agrégats de protéines peuvent se former car des ponts disulfures peuvent s'établir entre protéines Core et

que, de plus, la GST présente également une tendance à former des dimères. C'est pourquoi la protéine GST-Core-C183S qui est mutée sur la dernière cystéine semble interagir plus fortement avec l'importine  $\beta$  que la protéine Core.

Finalement les résultats négatifs obtenus avec la protéine GST-Core- $\Delta$ Cter démontrent que l'interaction observée avec l'importine  $\beta$ , prend bien place sur le domaine C terminal de la protéine Core (149-183).

e. Analyse des interactions avec les domaines C-terminal de la Nup153 :

Au niveau du panier nucléaire, il a été montré que l'importine  $\beta$  interagit avec la Nup153 et que c'est à ce niveau que la dissociation du complexe d'import par RanGTP a lieu. Afin de visualiser les interactions engagées avec la Nup153 et les importines  $\alpha/\beta$ , la même expérience est réalisée.



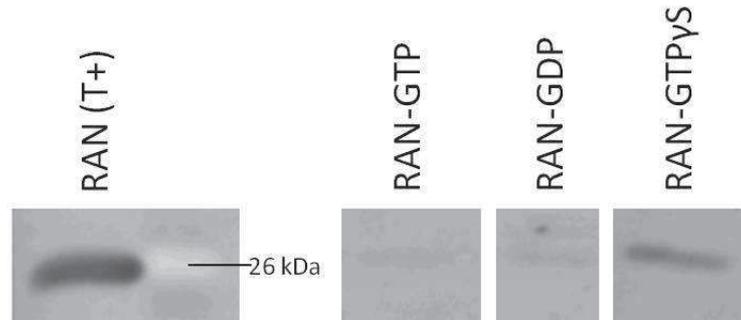
**Figure 96:** Histogramme de l'intensité des signaux obtenus pour les différentes interactions observées au confocal avec les protéines GST-Nup153-Cter et GST-Nup153-C2. Cet histogramme montre en bleu l'importine  $\alpha$  lié aux protéines sur les billes et en rouge l'importine  $\beta$ . Les traits noirs correspondent aux écart-types calculés sur 3 expériences.

Les résultats que l'on observe montrent premièrement qu'il n'y a pas de différence significative pour ces interactions entre la Nup153-Cter humaine et la Nup153-C2 de xénope malgré les différences de séquence qui existent entre les deux (Figure 96). Cette expérience confirme par ailleurs que les domaines qui interagissent avec l'importine  $\beta$  sont fonctionnels. Dans la littérature, l'interaction de la Nup153 avec l'importine  $\beta$  a souvent été décrite, aussi la liaison assez importante que l'on observe pour l'importine  $\beta$  seule était attendue. Cependant, une liaison entre la Nup153 et l'importine  $\alpha$  est également détectée, et cette liaison bien que faible augmente notablement en présence de l'importine  $\beta$ . En 1997, Moroianu et al. ont montré que l'importine  $\alpha$  avait un site de liaison sur la Nup153 dans son domaine C-terminal et que cette liaison avait surtout une utilité dans le mécanisme d'export de l'importine  $\alpha$ . Ce laboratoire a également montré que la présence d'un peptide NLS augmentait l'affinité de l'importine  $\alpha$  pour la Nup153. Cependant cela n'explique pas pourquoi son affinité augmente aussi en présence d'importine  $\beta$ .

f. Dissociation des complexes par Ran-GTP :

Lors de l'import, le cargo est transporté par les importines jusqu'au niveau du panier nucléaire, où le complexe est dissocié par la protéine Ran-GTP. Nous avons voulu savoir si nos complexes formés sur les billes peuvent être dissociés par la protéine Ran-GTP.

Premièrement, afin de tester si la protéine Ran, à laquelle la molécule GTP est fixée, peut se lier correctement à l'importine  $\beta$ , un test d'immunoprécipitation a été réalisé. Pour cela, des billes magnétiques couplées à des anticorps anti IgG de souris ont été utilisées. Ces billes ont été incubées avec les anticorps anti-importine  $\beta$ . Puis après lavage, ces billes ont été incubées avec la protéine Ran-GTP, -GDP et -GTP $\gamma$ S. Le GTP $\gamma$ S est une molécule qui ne peut être hydrolysée en GDP, ce qui la rend plus stable que la molécule de GTP normale.



**Figure 97:** Immunoprécipitation des molécules RAN par l'importine  $\beta$ . Les billes et les complexes formés ont été chargés sur un gel SDS PAGE et révélés par western blot avec l'anticorps anti RAN.

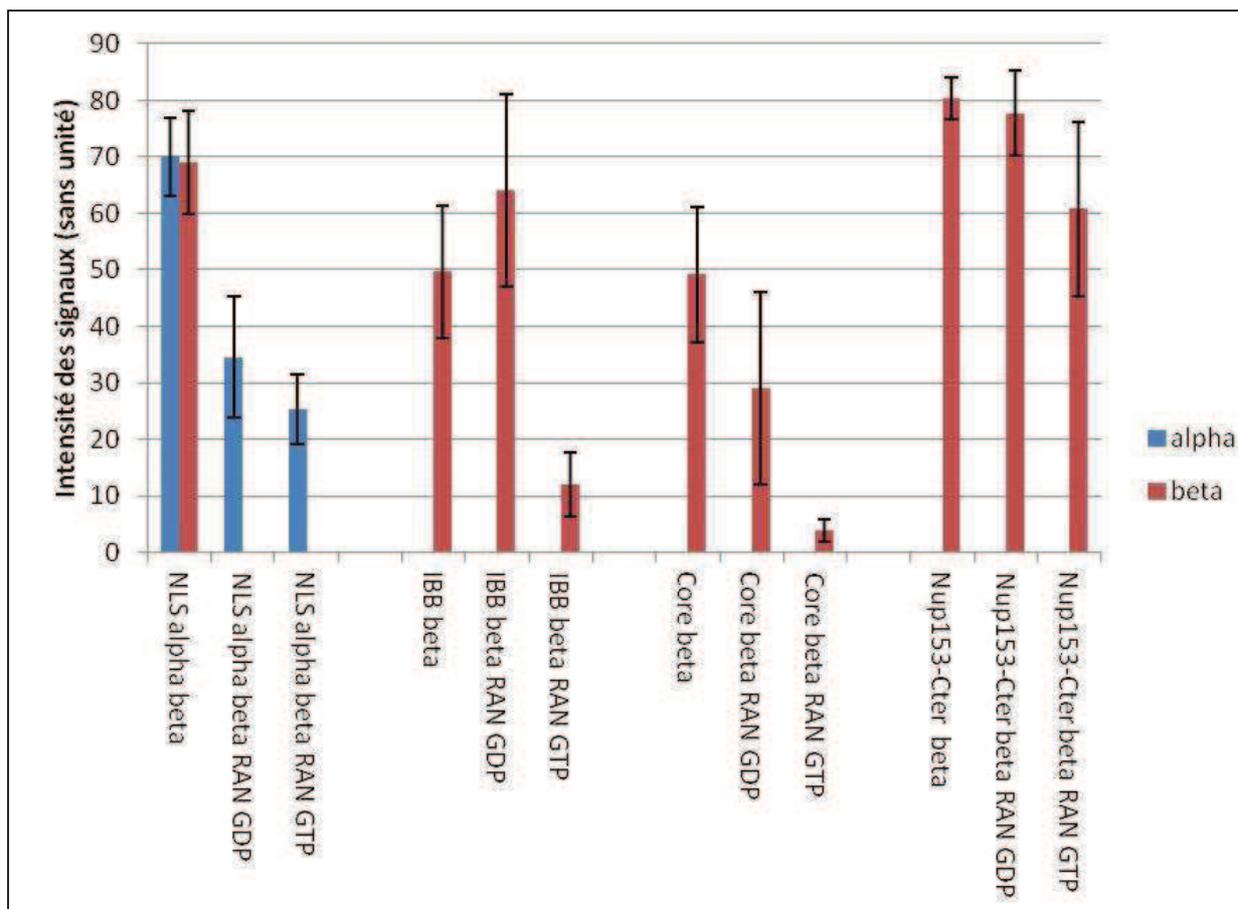
La figure 97 nous montre que le Ran-GTP se lie faiblement à l'importine  $\beta$ , et la même chose est observée pour la molécule Ran-GDP. Cependant l'interaction avec le Ran-GTP $\gamma$ S apparaît nettement plus forte car le GTP fixé sur la protéine Ran ne peut être hydrolysé en GDP et donc l'interaction est plus stable.

Cependant, étant donné que l'import nucléaire ne peut être réalisé avec le GTP $\gamma$ S car celui-ci a été décrit comme inhibant l'import nucléaire des molécules, nous avons choisi d'effectuer la suite des expériences avec la protéine Ran-GTP.

En effet afin d'analyser la dissociation des complexes que nous avons formés et observés au microscope confocal, ces complexes préformés sur les billes ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C avec la protéine Ran-GTP ou Ran-GDP, puis, après lavage, les billes ont été observées au microscope confocal (Figure 98).

La dissociation de l'importine  $\beta$  de la protéine GST-IBB est visible par l'action de Ran-GTP et non par celle de Ran-GDP, ce qui est en accord avec les données de la littérature et ce qui nous permet de conclure quant aux autres résultats. Nous pouvons observer que l'importine  $\beta$  est fortement dissociée du complexe NLS / Imp  $\alpha$  / Imp  $\beta$  et cela par Ran-GTP comme par Ran-GDP. La quantité d'importine  $\alpha$  est quant à elle diminuée de moitié par l'addition de Ran-GDP et encore un peu plus par Ran-GTP.

Le complexe GST-Core / Imp  $\beta$  est lui aussi dissocié par la molécule Ran-GTP. En revanche, les tests de dissociation de l'importine  $\beta$  sur le domaine C-terminal de la Nup153 ne montrent pas de dissociation visible par la molécule Ran-GTP.

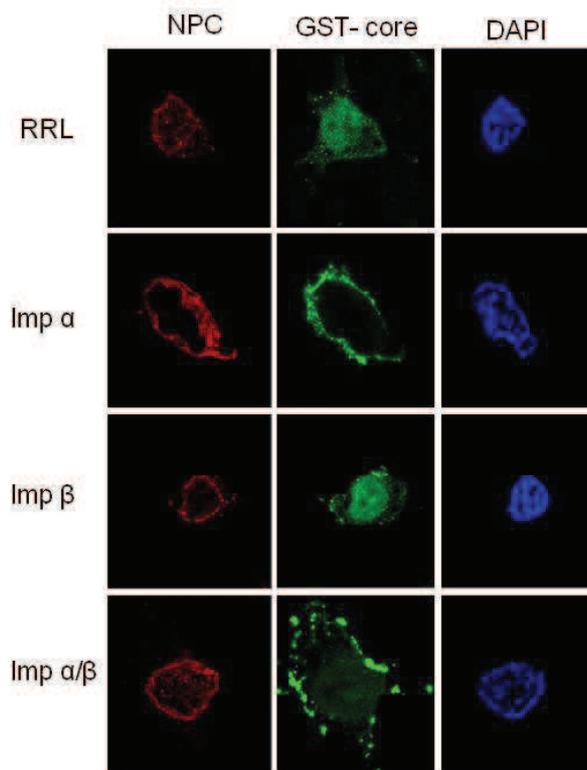


**Figure 98:** Histogramme de l'intensité des signaux obtenus pour les différentes interactions observées au microscope confocal lors des essais de dissociation avec Ran-GTP. Cet histogramme montre en bleu l'importine  $\alpha$  liée aux protéines sur les billes et en rouge l'importine  $\beta$ . Les traits noirs correspondent aux écarts-types calculés sur 2 expériences.

## V. Import nucléaire de la protéine GST-Core :

Les interactions observées précédemment, qui montrent que les protéines GST-Core et GST-C183 peuvent se lier avec l'importine  $\beta$  seule, ont conduit à nous demander si l'import de ces protéines est aussi effectué par l'importine  $\beta$  seule. Cela est en opposition avec les résultats publiés précédemment, mais il est aussi possible que la protéine Core non-assemblée utilise une voie d'import différente de celle utilisée par la capsidie entière. Afin de répondre à cette question, des essais d'import nucléaire ont été réalisés.

L'essai d'import nucléaire de la protéine GST-Core a été réalisé sur des cellules HeLa perméabilisées à la digitonine (Figure 99). L'import a été réalisé avec en premier lieu le RRL, puis avec nos protéines d'import dans un mélange contenant les importines, le Ran-GDP, l'ATP et le GTP.



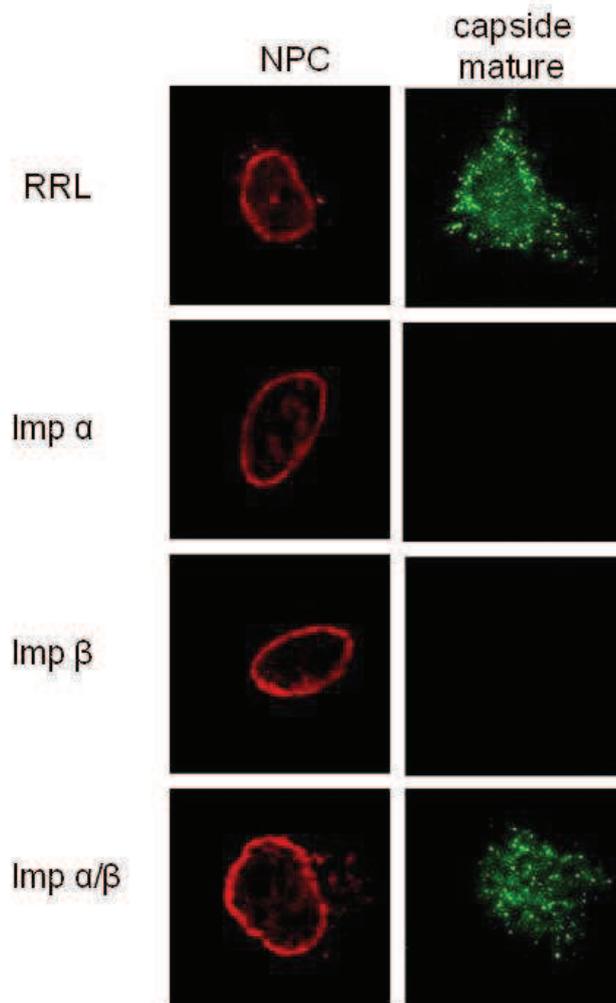
**Figure 99:** Import nucléaire de la protéine GST-Core dans des cellules Hela perméabilisées. L'ADN est visible en bleu, le NPC est marqué en rouge et les cargos GST sont marqués en vert

Le témoin négatif correspond à l'import de la protéine réalisé dans la glace, au lieu des 37°C utilisés normalement pour l'import. Celui-ci ne présente aucun signal pour le marquage de la protéine Core (images non présentées), ce qui signifie qu'il n'y pas de diffusion passive visible et que les résultats observés pour les autres essais correspondent bien à un import actif. Nous pouvons donc observer que la protéine GST-Core est importée dans le noyau par le RRL, cependant que les résultats observés pour les essais avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$  confirment bien les interactions observées de la protéine Core avec l'importine  $\beta$  seule, car la protéine est importée dans le noyau par l'importine  $\beta$  seule et ne nécessite pas l'interaction des importines  $\alpha/\beta$ .

L'expérience a aussi été conduite avec la protéine GST-Core-C183S et les mêmes résultats ont été obtenus.

## VI. Import nucléaire de la Capside mature :

Il semblerait donc que la sous unité de la capside, la protéine Core soit importée dans le noyau grâce à l'importine  $\beta$ . Cependant, la littérature décrit l'import de la capside comme étant réalisé par les importines  $\alpha$  et  $\beta$  de concert. Pour vérifier quelles sont les importines nécessaires à l'import de la capside, nous avons réalisé un essai d'import nucléaire de la capside mature (Figure 100).



**Figure 100:** Import nucléaire de la capside mature dans des cellules HeLa perméabilisées. Le NPC est marqué en rouge et les capsides sont marquées en vert.

L'essai a été réalisé avec des capsides matures purifiées d'une production de virions obtenue à partir du surnageant de cellules HepG2.2.15 après détachement des protéines de surface, accompli par traitement avec le détergent NP-40. Ces capsides possèdent donc un génome ADN et les domaines C-terminal de core sont phosphorylés et exposés à la surface de la capside.

Les capsides matures sont correctement importées dans le noyau par le RRL, en revanche, la capside entière n'est pas importée par l'importine  $\alpha$  seule, ni par l'importine  $\beta$  seule contrairement à ce qui a été observé pour la protéine Core. En effet, la capside entière nécessite la présence des 2 importines  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces résultats sont en accord avec ceux déjà publiés par B. Rabe et al. (Rabe, 2003).

## VII. Import nucléaire des différentes capsides :

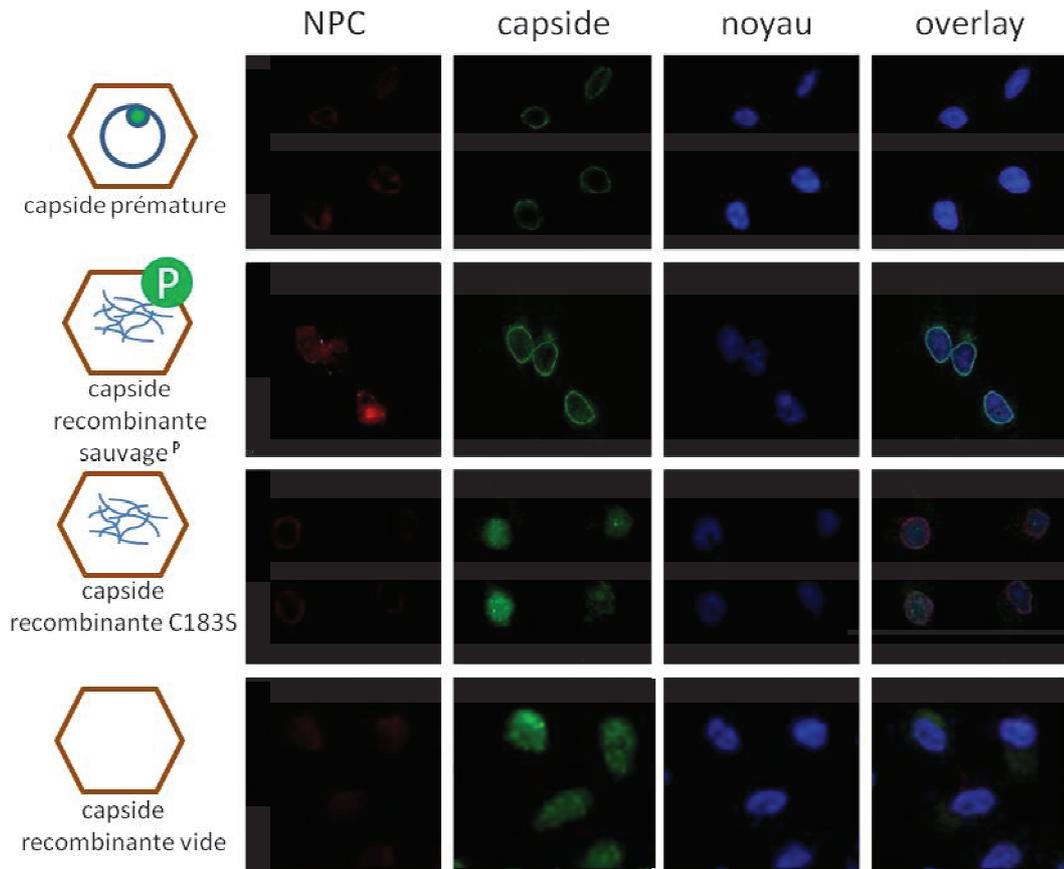
Des tests d'import ont été réalisés avec les différentes capsides présentes au sein du laboratoire. L'import des capsides a été réalisé avec du RRL dans les cellules Hela perméabilisées. La quantité de capside importée est d'environ 160 ng.

Premièrement, les capsides immatures sont observées au niveau de la membrane nucléaire, ce qui est en accord avec les résultats déjà publiés dans la littérature. De même pour les capsides recombinantes WT phosphorylées qui sont observées au niveau de la membrane nucléaire.

Nous avons ensuite testé l'import nucléaire des capsides C183S, qui ressemblent plus aux capsides virales intracellulaires. En effet, les capsides WT produites en bactéries présentent un pont disulfure non physiologique qui n'est pas retrouvé dans les capsides produites en cellules eucaryotes. C'est pourquoi une mutation a été effectuée où la cystéine impliquée a été mutée en sérine. Ces capsides sont par ailleurs, comme montré dans la suite des résultats, des capsides moins stables, ce qui explique le fait que les capsides C183S soient retrouvées dans le noyau (Figure 101).

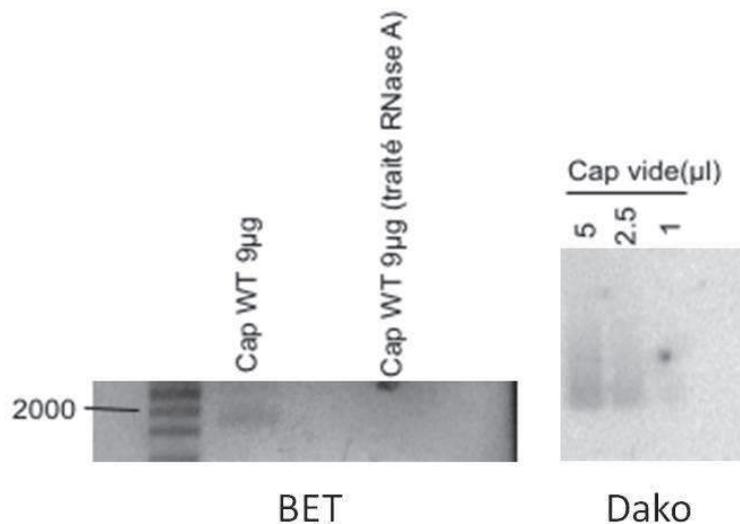
Le laboratoire de Paul Pumpens a récemment produit des capsides dans le système de la levure, ce système possède l'avantage d'effectuer les modifications post-transcriptionnelles telles que la phosphorylation (Freivalds, 2011).

Nous avons donc testé l'import nucléaire des capsides produites dans la levure. Les résultats nous montrent ici que la capside de levure présente le même profil que la capside WT recombinante phosphorylée *in-vitro*, à savoir que la capside de levure reste arrêtée au niveau de la membrane nucléaire (résultats non présentés).



**Figure 101:** Import nucléaire de différentes capsides avec le RRL dans des cellules Hela perméabilisées. L'ADN est visible en bleu, le NPC est marqué en rouge et les capsides sont marquées en vert.

Afin d'analyser le rôle de l'ADN ou de l'ARN dans les capsides, nous avons traité les capsides WT recombinantes avec de la RNase, puis après avoir vérifié l'absence d'ARN dans les capsides et que celles-ci étaient bien formées (Figure 102), nous avons effectué un essai d'import nucléaire.



**Figure 102:** Analyse des capsides vides après migration sur gel d'agarose par révélation au BET et après Western Blot et révélation avec l'anticorps Dako.

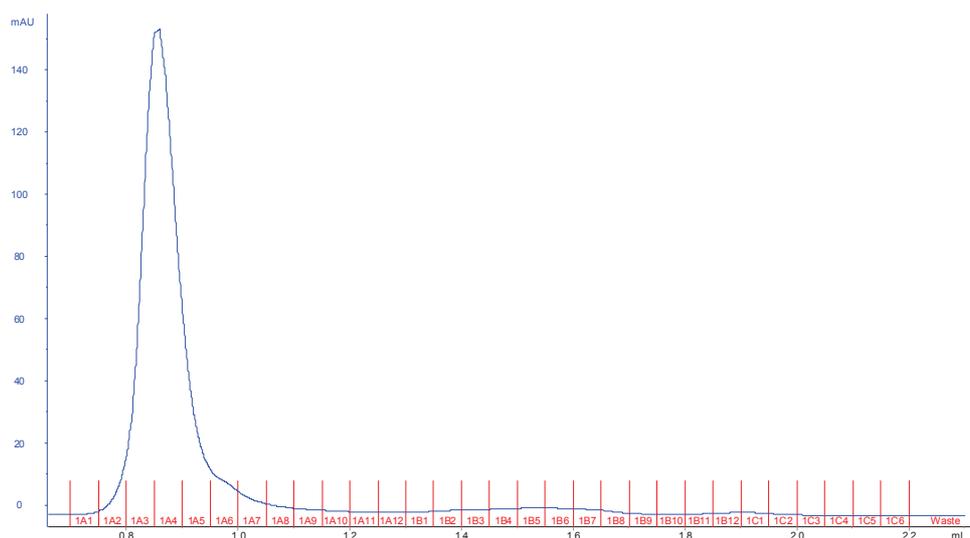
Les capsides recombinantes WT vides sont observées dans les noyaux sans devoir être phosphorylées au préalable, cela signifie que le domaine C-terminal est accessible aux importines  $\alpha$  et  $\beta$ . On en conclue donc que l'ARN bactérien pris au piège dans les capsides, possède un rôle dans la stabilité de la capside ou dans la rétention du domaine C-terminal vers l'intérieur de la capside.

### **VIII. Stabilité des capsides recombinantes :**

Après avoir atteint le panier nucléaire, la capside doit se désassembler et libérer son génome. Cette étape se déroule dans le panier nucléaire, cela est basé sur des expériences qui montrent que des capsides ayant subi un cross-link et qui ne peuvent donc pas se désassembler, restent bloquées au niveau de la membrane nucléaire (Schmitz, 2010). Ce désassemblage semble donc nécessaire et après avoir trouvé que des capsides recombinantes comme la C183S, qui sont moins stables, sont capable d'aller dans le noyau, nous avons voulu étudier la stabilité des capsides.

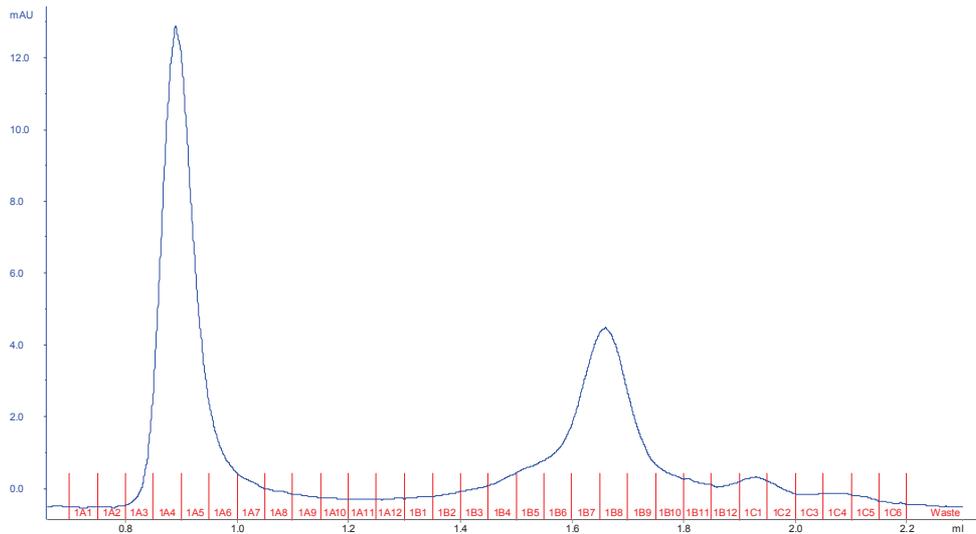
## 1. Analyse de la capside WT sur la Superdex 75 :

Pour étudier la stabilité des capsides, nous avons choisi d'analyser leurs comportements après injection sur une colonne d'exclusion de taille, la colonne Superdex 75. La colonne est équilibrée avec du tampon de transport et les capsides sont diluées dans le même tampon.



**Figure 103:** Analyse de 50 µl d'une solution de capside WT à 0,4 µg/µl, sur une colonne Superdex 75

Après injection de la capside WT exprimée chez *E. coli* à une concentration de 0,4 µg/µl, nous pouvons observer sur le chromatogramme (Figure 103), qui est le suivi de l'absorbance à 280 nm à la sortie de la colonne, que nous n'obtenons qu'un seul pic, correspondant à la forme entière de la capside. La même expérience a ensuite été réalisée avec une quantité de capside 10 fois plus faible soit 0,04 µg/µl (Figure 104). Le chromatogramme montre qu'à cette concentration, la capside est fractionnée en 3 pics qui correspondent vraisemblablement à la forme entière pour le premier pic, à la forme hexamérique pour le deuxième et au dimère pour le troisième. En effet, Adam Zlotnick a montré que l'association passait par la formation de dimères, qui vont ensuite s'assembler en trimères de dimères, soit donc en hexamères, puis former la forme entière de la capside. Il a montré par ailleurs que la dissociation aussi passait par ces intermédiaires (Zlotnick, 1999).

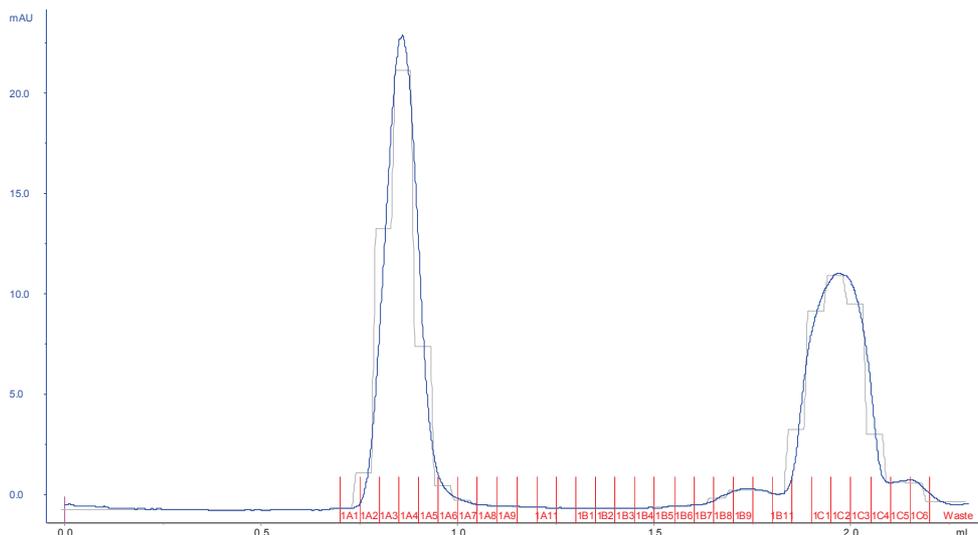


**Figure 104:** Analyse de 50 µl d'une solution de capsid WT à 0,04µg/µl, sur une colonne Superdex 75.

Ces résultats nous indiquent qu'il existe un équilibre qui est dépendant de la concentration entre la forme entière de la capsid et ces intermédiaires de désassemblage.

## **2. Analyse de la capsid C183S sur la Superdex 75 :**

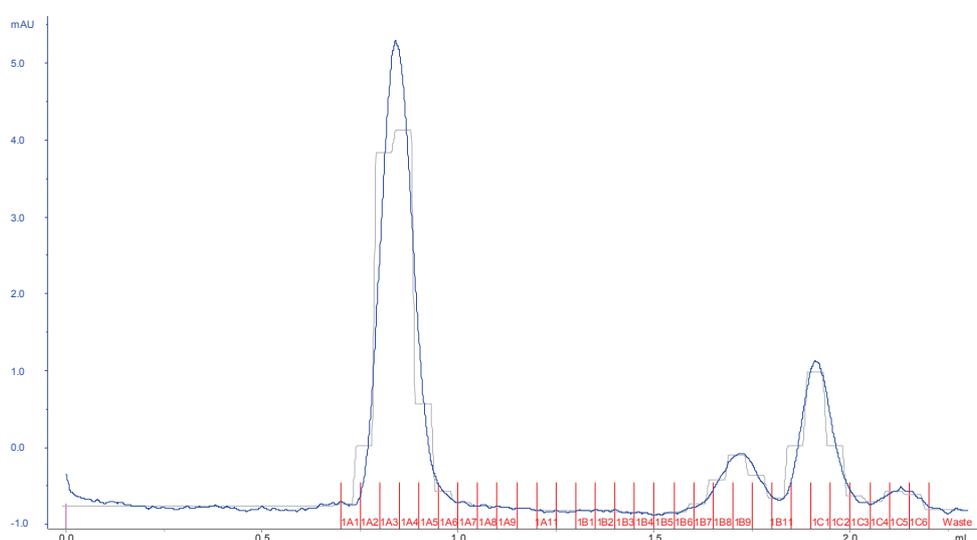
La capsid recombinante C183S est donc injectée sur la colonne Superdex 75 à une concentration de 0,7 µg/µl.



**Figure 105:** Injection de 50 µl d'une solution de capsid C183S à 0,7 µg/µl, sur une colonne Superdex 75.

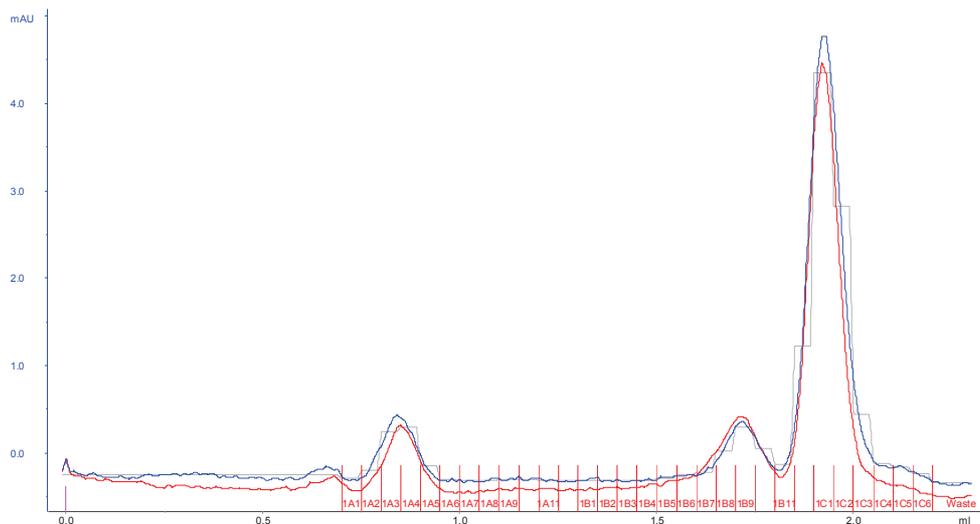
L'injection de la capside C183S à une concentration de 0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  donne un profil légèrement différent de celui obtenu pour la capside WT (Figure 105). En effet, à cette concentration assez élevée les 3 pics sont observés ce qui signifie que la capside C183S est moins stable que la capside WT. De plus on observe que le pic correspondant probablement à la forme du dimère est plus important que celui qui contiendrait la forme hexamérique, ce qui est l'inverse dans le cas des capsides WT exprimée chez *E. coli*.

Afin de poursuivre l'analyse de la stabilité de la capside C183S, nous avons réinjecté les fractions correspondant au pic de la capside entière puis celles correspondant au dimère.



**Figure 106:** Réinjection du 1<sup>er</sup> pic correspondant aux fractions de la capside entière.

La réinjection du pic contenant la capside entière (Figure 106) donne de nouveau 3 pics qui ont le même profil que la première injection. Cela signifie que la capside est en constante-dissociation-réassociation.



**Figure 107:** Réinjection du 3<sup>ème</sup> pic correspondant à la fraction des dimères.

Enfin, la réinjection du pic contenant les dimères de la capside montre un fort pic correspondant au dimère, ainsi que la formation de 2 pics qui correspondent à l'hexamère et à la forme entière (figure 107).

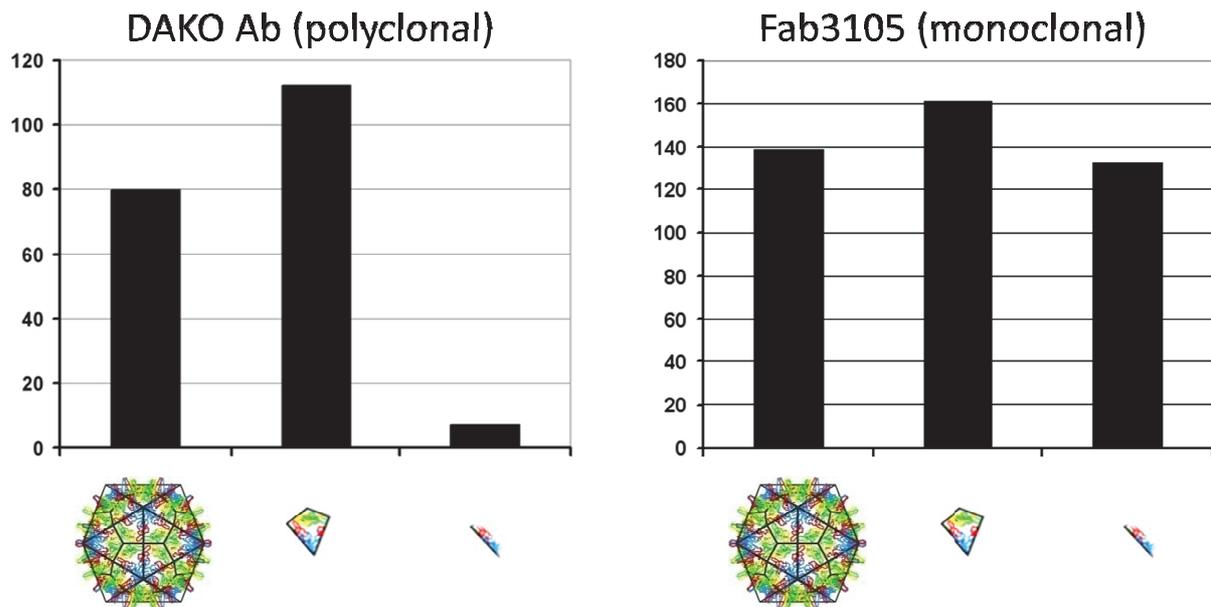
Cela signifie qu'il y a aussi une constante association de la capside, en accord avec le phénomène de "capsid breathing" déjà décrit dans la littérature et qui correspond à une succession d'association et dissociation transitoires de la capside.

### **3. Analyse des intermédiaires de dissociation pour les capsides recombinantes :**

Les intermédiaires de désassemblage ont ensuite été analysés avec les anticorps dirigés contre la capside disponibles au laboratoire : le Dako et le Fab3105.

Les fractions des différents pics ont donc été déposées sur une membrane de nitrocellulose par la méthode du Dot-Blot, puis la révélation a été réalisée avec l'anticorps Dako et l'anticorps Fab3105.

L'intensité des signaux obtenue a été quantifiée et normalisées en fonction de la quantité de protéines présentes dans les différentes fractions.



**Figure 108:** Réactivité des anticorps Dako et Fab3105 pour les différents intermédiaires de dissociation de la capsid recombinante C183S.

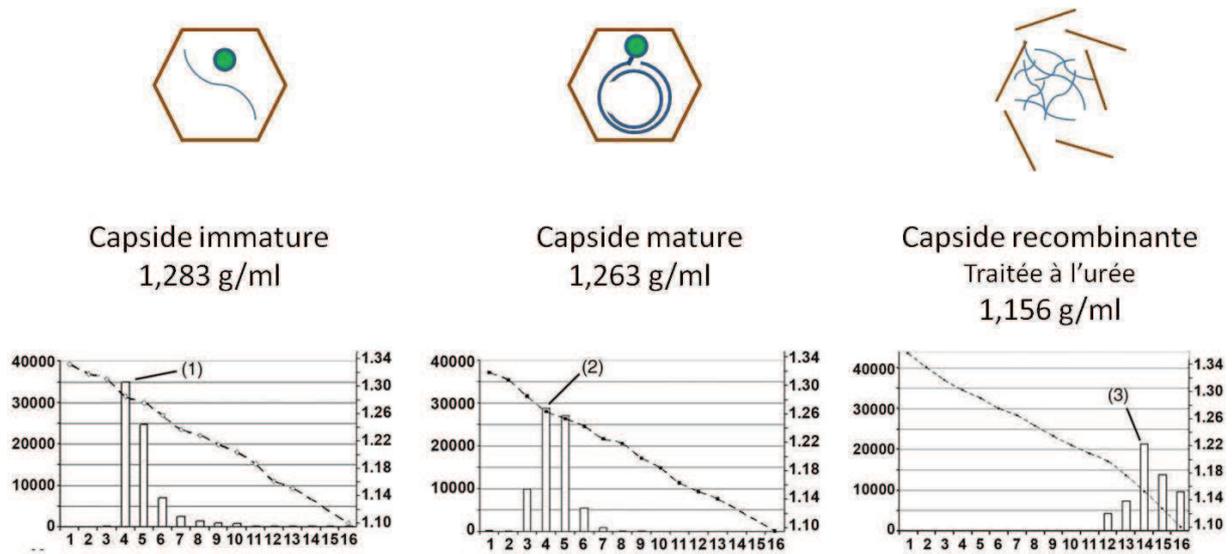
Le Fab3105 a été montré comme reconnaissant une région du dimère de la capsid impliquée dans la boucle antigénique. Dans cette expérience, nous pouvons voir que le Fab3105 réagit de la même manière avec les 3 formes de la capsid, ce qui montre aussi que la forme présente dans le troisième pic est bien au moins composée de dimère.

L'anticorps Dako qui est conformationnel, réagit normalement avec la capsid entière et l'intermédiaire de désassemblage, il est cependant connu que cet anticorps ne réagit pas avec les formes dénaturées de la capsid. L'histogramme de la figure 108 nous montre que l'anticorps polyclonal Dako réagit fortement avec la forme hexamérique et un peu moins avec la forme entière de la capsid. L'anticorps Dako ne réagit pas avec les fractions du pic 3 qui correspondent au dimère de la capsid. Ce qui montre que le Dako reconnaît la capsid ou les formes complexes de dissociation.

## **IX. Analyse des capsides sur gradient de Nycodenz :**

Les gradients de Nycodenz ont les mêmes propriétés que les gradients de sucrose. Cependant, nous avons choisi d'effectuer les analyses sur du Nycodenz car celui-ci conserve mieux les interactions protéiques. Les capsides migrent dans le Nycodenz en fonction de leur

coefficient de sédimentation. L'analyse des différentes capsides sur gradient de Nycodenz montre que les capsides matures et immatures ne sédimentent pas à la même densité de Nycodenz. En effet les capsides matures qui contiennent de l'ADN sédimentent à 1,283 g/ml, alors que les capsides immatures qui contiennent de l'ARN sédimentent à une densité de 1,263 g/ml. De plus, des capsides recombinantes traitées à l'urée qui contiennent donc de l'ARN, mais sont désassemblées, sont retrouvées à une densité de 1,156 g/ml (Figure 109).



**Figure 109:** Caractérisation de la sédimentation des capsides matures, immatures et recombinantes traitées à l'urée sur gradient de Nycodenz.

## **X. Analyse des densités de capside après import nucléaire :**

Afin de déterminer quel est l'impact de l'import nucléaire sur les capsides matures, nous avons effectué un import nucléaire sur des cellules perméabilisées. Puis les lysats cellulaires sont déposés sur les gradients de Nycodenz et après ultracentrifugation les fractions sont récupérées et analysées afin de déterminer la densité de la capside.

Les capsides importées sont des capsides matures composés d'ADN et présentant une densité de 1,263 g/ml.

Capsides	Caractéristiques	Densité	Capsides correspondantes
	Après import nucléaire	1,285 g/ml	
	Après import nucléaire dans des cellules traitées avec WGA	1,267 g/ml	
	Après import nucléaire dans des cellules traitées avec de la RNase	1,285 g/ml et 1,156g/ml	 

**Figure 110:** Analyse des densités de capside après import nucléaire.

Cette analyse montre que les capsides matures qui contenaient de l'ADN, subissent une modification après avoir été importées dans le noyau. En effet après l'import, les capsides présentent une densité de 1,285 ce qui correspond à la densité des capsides contenant de l'ARN (Figure 110).

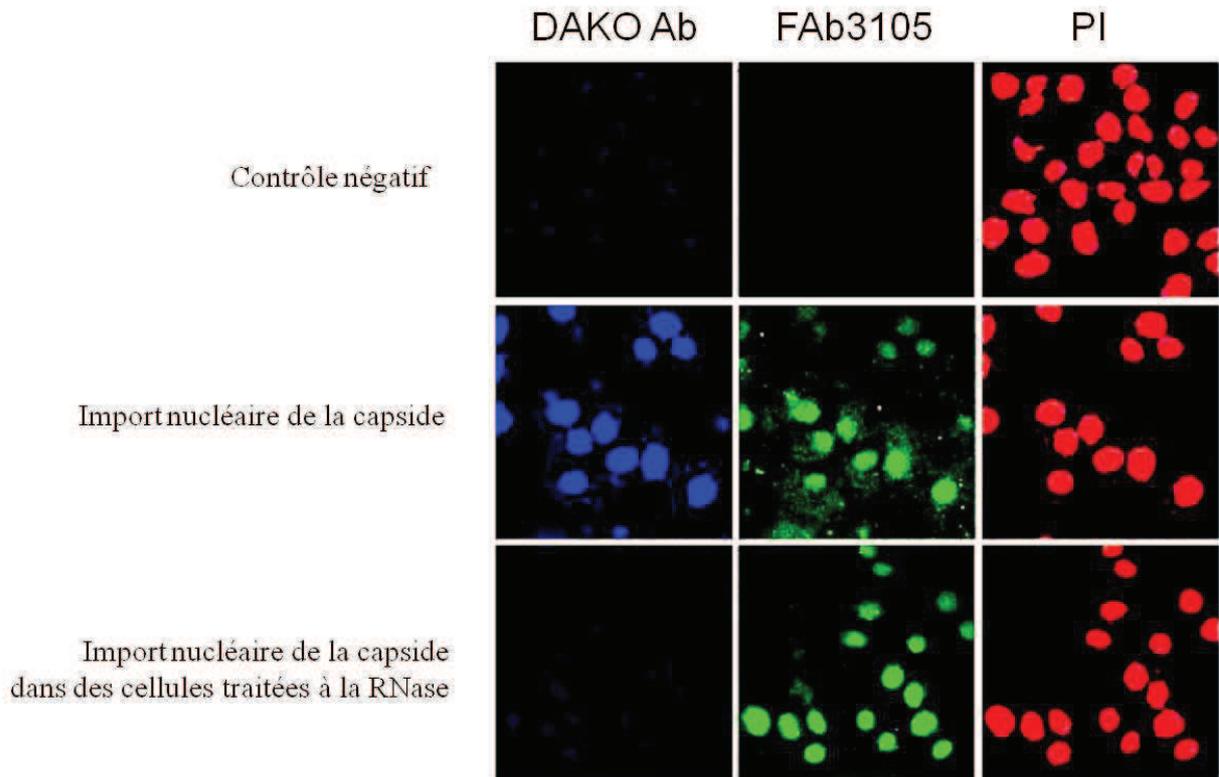
Lorsque cet import est inhibé par l'ajout de WGA (Wheat germ agglutinin), les capsides retrouvées dans les cellules sont toujours constituées d'ADN. Ceci implique donc que le fait d'être importé dans le noyau modifie la contenance de la capside d'ADN en ARN.

Cependant lorsque l'import nucléaire des capsides est réalisé sur des cellules traitées préalablement à la RNase, on observe dans ce cas que la densité des capsides importées correspond à la capside contenant de l'ARN avec une densité de 1,285, cependant la quantité de capsides possédant cette densité est diminué de moitié et l'on retrouve une proportion importante de capsides dissociées avec une densité de 1,156 g/ml. Ces modifications n'ont pas lieu lorsque l'import des capsides est inhibé.

Ces résultats montrent qu'après l'import nucléaire, la capside se désassemble et nécessite de l'ARN pour se réassembler.

## **XI. Import nucléaire dans des cellules traitées à la RNase :**

Afin de visualiser cela, un essai d'import nucléaire observé au microscope confocal est analysé après avoir traité les cellules avec de la RNase. La localisation de la capside est déterminée avec 2 anticorps, le Fab3105 qui reconnaît toute les formes de la capside et le Dako qui ne reconnaît que la forme hexamère et la forme entière.



**Figure 111:** Import de la capside mature dans des cellules traité à la RNase et visualisation de la capside par le Fab3105 et le Dako.

L'expérience d'import nucléaire de la capside mature dans des cellules traitées à la RNase présente des résultats qui vont dans la même direction que les expériences sur gradient de Nycodenz.

Dans des cellules non traitées, les protéines de la capside sont retrouvées dans le noyau et peuvent être visualisées tant par l'anticorps Fab3105 que par le Dako ce qui signifie qu'elles sont au minimum sous forme hexamérique. En revanche, dans les cellules préalablement traitées avec la RNase A, la visualisation se fait toujours bien avec le Fab3105, mais non plus avec le Dako (Figure 111). Des expériences précédentes ont montré que l'anticorps Dako ne réagissait pas avec les dimères de la protéine Core. On en conclue donc qu'en absence d'ARN, les capsides qui se sont désassemblées pour libérer leur génome ne peuvent se réassocier.

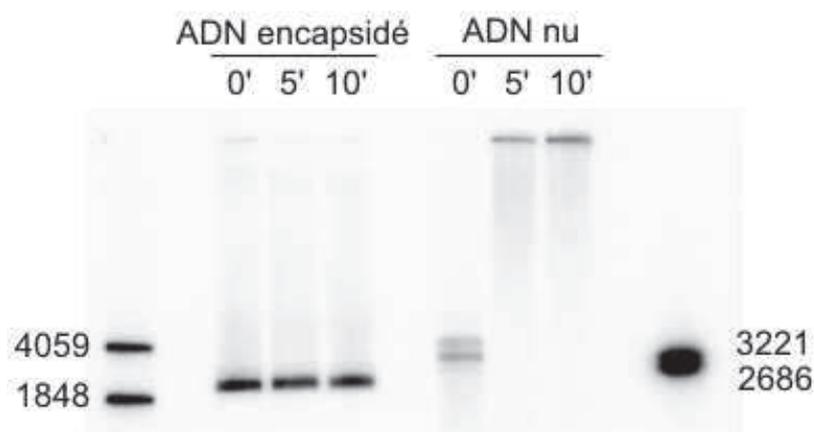
## **XII. Accessibilité du génome et stabilité de la capsid** :

### **1. Accessibilité du génome encapsidé :**

Les expériences réalisées sur les colonnes ne peuvent pas être réalisées avec les capsides matures et immatures, car les quantités de capsides récupérées suite à la purification sont trop faibles pour pouvoir effectuer le fractionnement sur les colonnes d'exclusion de taille. Nous avons donc voulu savoir si le génome est accessible à la dégradation par la Nucléase S7. Cette protéine fait une taille de 16 kDa, soit environ 5 nm de diamètre pour une protéine globulaire. Ainsi lorsque la capsid est formée, la nucléase ne doit pas pouvoir dégrader le génome, cependant si la capsid effectue le "capsid breathing" et se désassemble momentanément la nucléase S7 doit pouvoir avoir accès au génome et le dégrader.

Pour suivre la dégradation du génome, nous avons utilisé des capsides matures marquées grâce à la réaction de polymérisation endogène.

Premièrement, l'action de la nucléase S7 a été testée sur les capsides matures et sur le génome des capsides matures après traitement à la protéinase K et purification de l'ADN par phénol/chloroforme.



**Figure 112:** Vérification de l'action de la nucléase S7 sur l'ADN encapsidé et l'ADN nu de la capsid mature radiomarké.

Ce test nous montre que l'ADN lorsqu'il est encapsidé, est protégé de l'action de la nucléase S7, alors que l'ADN nu est dégradé totalement en moins de 5 minutes (Figure 112).

De plus lorsque la capsid est chauffée pendant 15 minutes à 60°C préalablement à l'addition de nucléase, celle-ci s'ouvre et laisse un accès à la nucléase S7 (Figure 113).

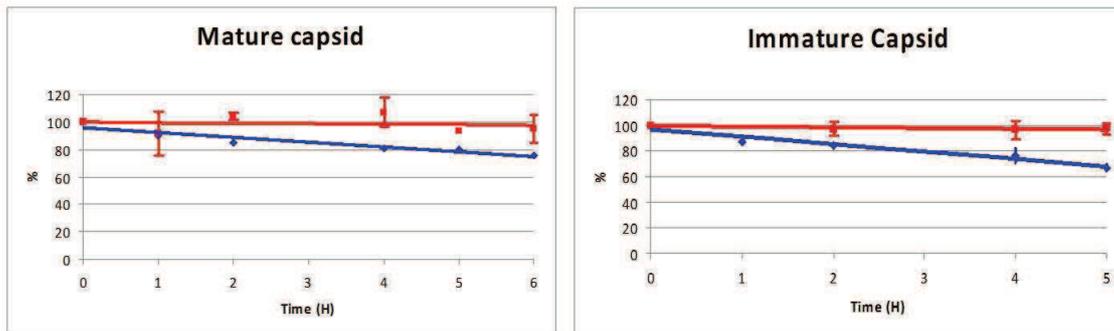


**Figure 113:** Vérification de la dégradation maximum obtenue avec la nucléase S7 sur le génome des capsides mature.

## **2. Accessibilité du génome et stabilité des capsides matures et immatures :**

Cependant lorsque les capsides sont incubées avec la nucléase S7 pendant une plus longue période, le génome est dégradé. Nous avons donc réalisé des cinétiques afin de suivre la dégradation du génome, ainsi que la stabilité de la capsid. La dégradation du génome est suivie après migration des capsides sur un gel d'agarose, les capsides ont été préalablement incubées pendant différents temps avec la nucléase S7.

En parallèle, les mêmes essais sont déposés sur un gel d'agarose afin de suivre la quantité de capsid qui reste formée au cours du temps par western blot avec l'anticorps Dako.

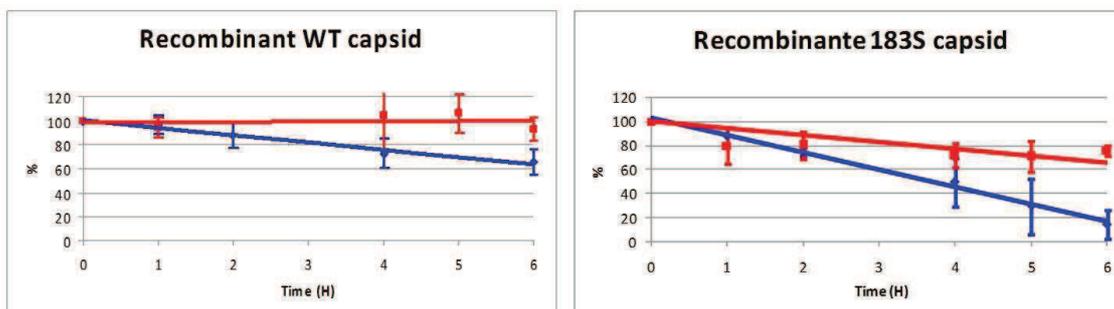


**Figure 114:** Suivi de l'accessibilité du génome (en bleu) et de la stabilité de la capside (en rouge) pour les capsides matures et immature.

Ces droites nous indiquent que la capside reste stable au cours du temps, alors que le génome est dégradé indiquant qu'il doit exister des accès temporaires pour que la nucléase S7 puisse dégrader le génome des capsides (Figure 114). La dégradation du génome reste pourtant modérée, environ 30 % en 6 heures.

### **3. Accessibilité du génome et stabilité des capsides recombinante WT et C183S :**

La même expérience est ensuite réalisée sur les capsides recombinantes WT et C183S (Figure 115), cependant ces capsides ne possédant pas de génome à marquer, les réactions ont lieu avec une quantité de capside plus importante et le suivi de la dégradation du génome se fait après révélation de l'ARN au BET.



**Figure 115:** Suivi de l'accessibilité du génome (en bleu) et de la stabilité de la capside (en rouge) pour les capsides recombinante WT et C183S.

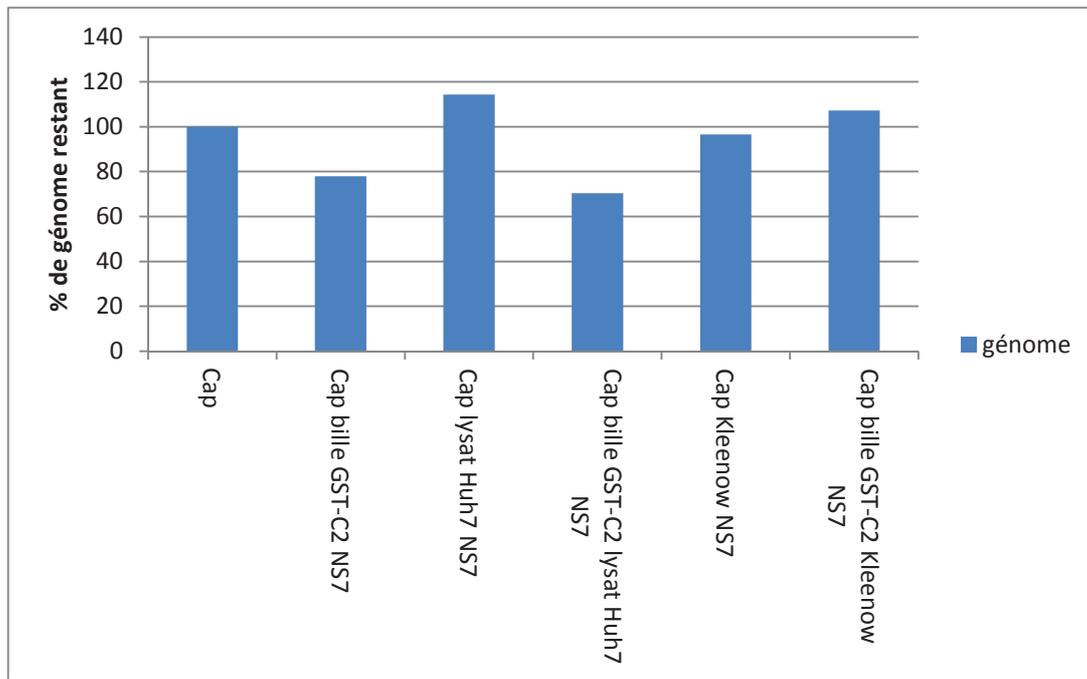
Ces résultats nous montrent que les capsides recombinantes possèdent le même profil que les capsides matures et immatures. Cependant la capside C183S apparaît moins stable que les autres capsides, car en effet, l'ARN contenu dans ces capsides est dégradé à 90 % au bout de

6 heures et il ne reste que 60 % des capsides formées. Ces résultats sont cohérents avec la stabilité de la capsid C183S observée sur les colonnes Superdex 75.

Ces résultats vont dans le sens du “capsid breathing” où en effet, le génome est dégradé alors que la capsid reste intacte ce qui signifie qu’il existe des désassemblages momentanés de la capsid. Cependant seulement 30 % des génomes sont dégradés en 6 heures, alors que le génome est retrouvé en 30 minutes dans le noyau après lipofection des capsides. Cela signifie qu’un facteur cellulaire et plus précisément nucléaire doit très vraisemblablement entrer en jeu pour favoriser la libération du génome.

### **XIII. Détermination des facteurs impliqués dans le désassemblage de la capsid :**

Les expériences précédentes nous indiquent qu’un facteur supplémentaire au “capsid breathing” est nécessaire pour la libération du génome. Nous avons donc observé le rôle des protéines impliquées dans la formation de l’ADNccc. En effet l’étape qui suit la libération du génome est celle de la réparation/reconversion du génome qui utilise différentes protéines nucléaires. Bien que celles-ci ne soient pas encore bien déterminées, nous savons que cette étape implique à priori l’action de polymérase, c’est aussi pour cette raison que nous avons testé l’action de la polymérase de *E.coli*, qui est dépourvue de l’activité exonuclease (3’ → 5’), Klenow sur l’accessibilité du génome à la nucléase S7 et cela pendant 1 heure (Figure 116).



**Figure 116:** Accessibilité du génome en présence du fragment Nup153-C2 immobilisé sur des billes, de lysat cellulaire et de la klenow.

Ces résultats montrent que le domaine C-terminal de la Nup153 augmente de légèrement l'accessibilité au génome pour la nucléase S7 (20%) mais ne permet pas une dégradation totale de celui-ci. Cette dégradation est augmentée en présence de lysat cellulaire de Huh7 (30%) mais nécessite la présence du domaine C-terminal de la Nup153.

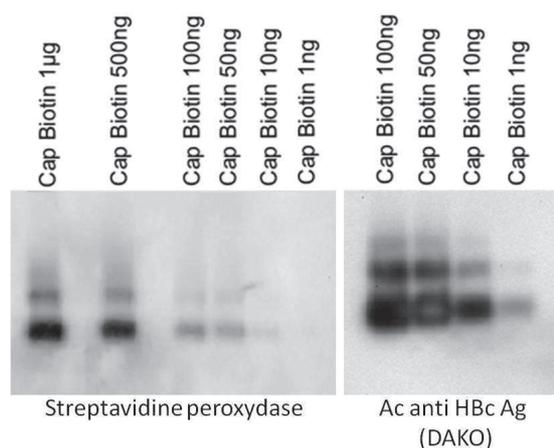
La polymérase de Klenow, n'as pas d'action visible sur l'accessibilité du génome et semble même protéger celui-ci de l'action de la nucléase S7, car en présence du fragment C2 de la Nup153, nous n'observons pas les 20% de dégradation observés avec le fragment seul.

#### **XIV. Résultats préliminaires :**

Etant donné que nos expériences entreprises afin de déterminer le facteur impliqué dans la dissociation de la capsid n'ont pas donné de résultats satisfaisants, nous avons cherché une technique alternative afin de suivre la libération du génome. Pour cela nous avons effectué des travaux préliminaires afin de marquer les capsides et les génomes. Nous avons donc testé la biotinylation des capsides et le marquage des génomes par des sondes radioactives et fluorescentes.

## 1. Biotinylation des capsides :

Nous avons donc marqué les capsides avec des molécules de biotine. Pour cela le kit Invitrogen a été utilisé afin de lier de façon covalente des molécules de biotine sur les amines primaires de la capside recombinante WT.



**Figure 117:** Vérification de la formation de la capside WT après la biotinylation. Migration sur un gel d'agarose 1 % et révélation des capsides avec le Dako (à droite) et la streptavidine peroxydase (à gauche).

Ces membranes nous montrent que le marquage des capsides avec la biotine a correctement fonctionné et que l'on peut détecter avec cette méthode environ 10 ng de capside (Figure 117). De plus la capside est toujours reconnue par l'anticorps Dako ce qui signifie que ce marquage n'a pas déstabilisé la capside ou modifié la structure concernant la charge de surface.

## 2. Marquage du génome par des sondes :

### a. Détermination de sondes utilisées :

Premièrement, nous avons déterminé quelles étaient les zones simple brin du génome du VHB, en effet il est sous forme ADNrc et il est partiellement double brin. Cependant dans la région simple brin, des structures secondaires sont retrouvées et par prédiction informatique nous avons déterminé 4 zones d'environ 12 bases qui sont prédites constamment comme devant être simple brin et qui vont nous servir pour élaborer des sondes complémentaires.

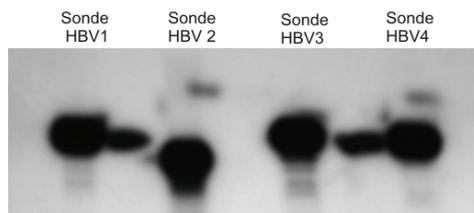
Les sondes sont donc :

- Sonde HBV 1 : ATC TTC TTT TCT
- Sonde HBV 2 : AAC CTA GCA G
- Sonde HBV 3 : CTG GAT AAT AAG
- Sonde HBV 4 : TGT AAA TAG TGT

b. Marquage des sondes avec la radioactivité :

Les sondes sont ensuite marquées avec de l'ATP $\gamma^{32}\text{P}$  et purifiées avant d'être incubées avec le génome à 25°C durant toute la nuit. Le lendemain, les sondes sont cross-linkées au génome par l'utilisation du Psoralène. Ces capsides matures possédant donc des sondes radiomarquées sur leur génome sont chargées sur gel d'agarose.

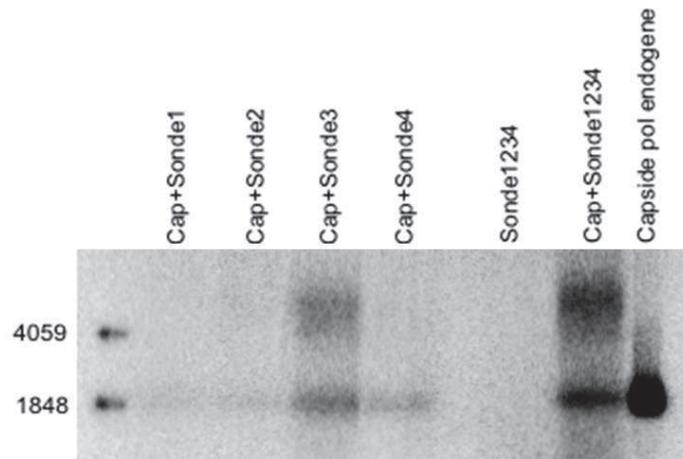
En premier lieu, nous avons vérifié le marquage des sondes. Pour cela nous les avons déposées sur un gel d'acrylamide dénaturant de 20 % et la révélation a été réalisée sur film.



**Figure 118:** Vérification du marquage des sondes HBV. Les sondes ont une taille de 10 et 12 bases.

c. Marquage de la capside avec les sondes radioactives :

Puis ces sondes sont incubées avec la capside et cross-linkées sur son génome. Les capsides entières sont ensuite déposées sur un gel agarose 1 %.



**Figure 119:** Marquage des capsides matures avec les sondes radioactives.

Ce gel nous montre que les sondes s'attachent sur le génome cependant, les sondes 1 et 2 ne sont pas très efficaces comparées aux sondes 3 et 4.

Mais nous pouvons observer que lorsque les 4 sondes sont placées sur la capside le signal de celle-ci s'amplifie.

Les étapes avec les sondes fluorescentes n'ont été testées qu'une seule fois pour le moment, et il semblerait que les capsides s'agrègent pour former des filaments qui ne peuvent pas être micro-injectés. Ce qui signifie que des mises au point additionnelles de cette méthode sont nécessaires avant de pouvoir obtenir des résultats.

# Discussion

## **I. Expression, purification et fonctionnalité des protéines :**

Les protéines ont donc été exprimées et purifiées, la pureté des protéines obtenue varie de 95 à 50%, excepté pour le domaine C-terminal humaine de la protéine Nup153 (15%), et pour les capsides matures et immatures qui sont contaminées par des protéines de cellules eucaryotes. Les contaminants retrouvés dans les préparations de capside ne comprennent pas de facteurs de l'import nucléaire fonctionnels qui pourraient perturber les résultats obtenus, comme déduit du fait que les capsides, sans l'ajout des protéines spécifiques à leur import, ne donnent pas de signaux dans les essais d'import nucléaire.

La protéine GST seule a servi de témoin négatif, sa liaison au glutathion nous indique que sa conformation est correcte, et comme nous l'attendions cette protéine n'interagit pas avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$  et n'est pas importée dans le noyau lors des essais d'import nucléaire.

Les protéines GST-NLS et GST-IBB, nous ont servi de contrôle positif dans nos expériences. Le NLS fusionné à la GST correspond à celui du SV40 qui a été largement décrit dans la littérature comme se liant à l'hétérodimère composé de l'importine  $\alpha$  et de l'importine  $\beta$  (Nigg, 1997). Cela a été confirmé par nos résultats d'interaction visualisés sur gel et au microscope confocal. De plus les essais d'import montrent qu'elle est correctement importée au sein du noyau. L'IBB fusionné à la GST correspond au domaine de l'importine  $\alpha$  qui se lie à l'importine  $\beta$ , le "Importin beta binding domain". Cette protéine se lie correctement au glutathion et l'analyse des interactions a montré qu'elle se liait correctement à l'importine  $\beta$ . Cette protéine est aussi correctement importée dans le noyau par l'importine  $\beta$ .

Ces protéines ont permis de visualiser la fonctionnalité des importines  $\alpha$  et  $\beta$ . En effet, les résultats obtenus pour les analyses d'interaction montrent que ces protéines se lient au NLS pour l'importine  $\alpha$  et à l'IBB pour l'importine  $\beta$ . L'importine  $\beta$  a aussi été montrée comme interagissant avec les domaines C-terminal de la Nup153 comme cela a été décrit dans la littérature (Ben-Efraim, 2001). De plus la fonctionnalité de ces protéines a été testée en import nucléaire et nous pouvons constater qu'elles effectuent correctement l'import nucléaire des protéines GST-NLS et GST-IBB.

Les tests de dissociation réalisés sur les complexes formés sur les billes, indiquent que la protéine Ran qui a été purifiée est bien active, comme l'attestent les résultats de dissociations

de l'importine  $\beta$  sur la GST-IBB, qui est dissociée par la forme liée au GTP et non par celle liée au GDP.

Les interactions avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$  ont ensuite été étudiées avec la protéine Core fusionnée à la GST. Cette fusion permet de fixer les protéines sur les billes glutathion et inhibe la formation des capsides qui se produit automatiquement en présence d'une forte concentration de protéine Core (0,8  $\mu$ M) (Seifer, 1993). Nous avons donc utilisé la protéine GST-Core qui est importée dans le noyau par le RRL, ce qui indique que la conformation de la protéine Core permet un accès aux importines sur le domaine C-terminal, qui contient le NLS.

La même chose est observée pour les mutants de la protéine Core utilisée, la protéine GST-Core-C183S et le GST-Core- $\Delta$ Cter.

La Nup153 qui est impliquée dans l'import nucléaire de la capside est difficilement obtenue sous sa forme entière (travaux de thèse de Michael Foss), c'est pourquoi nous avons travaillé avec le fragment du domaine C-terminal de la Nup153, celui qui possède la majorité des répétitions FG. Le fragment Nup153-C2 est dérivé de la Nup153 du xénope et le domaine Nup153-Cter est dérivé de la Nup153 humaine. Il n'existe pas de test d'activité pour les domaines C-terminal de la Nup153, cependant le fait qu'elles se lient au glutathion indique un repliement correct de leurs parties GST.

Ces 2 protéines ont montrées leur interaction avec le glutathion sur les billes et leur interaction avec l'importine  $\beta$  comme décrit dans la littérature.

Finalement, les capsides matures et immatures ont montrées dans les tests d'import nucléaire les mêmes résultats que ceux décrits dans la littérature (Rabe, 2003) (Kann, 1999), c'est-à-dire que les capsides matures sont bien importées dans le noyau et que les capsides immatures sont retrouvées au niveaux de la membrane nucléaire.

## **II. Interaction entre les différents cargos karyophiliques et les protéines de l'import nucléaire :**

### **1. Interactions contrôles :**

La protéine GST ne se lie à aucune des importines fluorescentes. Cela signifie qu'il n'y a pas d'interaction non spécifique comme cela a pu être observé avec d'autres techniques.

Le GST-NLS présente une interaction avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$  comme nous pouvions l'attendre, les interactions visibles sont bien induites par le NLS car la GST seule ne montre aucune interaction. L'importine  $\alpha$  seule ne se lie pas au NLS, ce résultat est surprenant car il existe un grand nombre de publications qui indiquent que l'importine  $\alpha$  se lie en premier au NLS et que cette interaction conduit à exposer le domaine IBB, ce qui va permettre la liaison avec l'importine  $\beta$ . Nos résultats sont cependant en accord avec les observations du laboratoire de Bostjan Kobe qui observe aussi la nécessité de la présence des 2 importines (Catimel, 2001). Nos résultats obtenus avec la protéine GST-IBB, et surtout l'absence de compétition entre le domaine IBB fixé sur les billes et l'importine  $\alpha$  en solution, démontrent que l'hétérodimère est instable en absence du NLS. Il faut donc que les 3 partenaires soient présents simultanément.

### **2. Interaction avec la protéine Core :**

De façon surprenante, la protéine GST-Core ne présente aucune interaction avec l'importine  $\alpha$ , même en présence de l'importine  $\beta$ . Elle interagit cependant avec l'importine  $\beta$  seule de la même manière que le domaine IBB.

La protéine GST-Core-C183S présente le même profil d'interaction que la protéine GST-Core avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$ . La protéine GST-Core- $\Delta$ Cter, de son côté, ne se lie à aucune des importines, ce qui indique que le domaine d'interaction ressemblant à l'IBB est localisé sur la partie C-terminale de la protéine Core. La GST-core représente la sous-unité de la capsid non-assemblée, dont la présence dans le noyau suite à l'import de la capsid a par ailleurs été établie (Guidotti, 1995).

La GST fusionnée en N-terminal inhibe l'assemblage des protéines Core en capsid mais non la dimérisation qui est la première forme de l'assemblage. Comme les protéines ont été

purifiées dans les bactéries *E. coli*, elles se présentent donc sous une forme non phosphorylée. Cependant la phosphorylation *in-vitro* de ces protéines tend à favoriser la formation d'agrégats, ce qui ne nous permet pas de réaliser l'attachement des protéines sur les billes pour analyser les interactions.

Les interactions observées avec les protéines Core sont identiques à celles observées pour le GST-IBB. Cela peut être expliqué par le fait que les NLS décrits en C-terminal de la protéine Core sont composés d'arginine comme le domaine IBB, alors que les NLS classiques sont composés de lysines. Cependant la quantité de GST-IBB et de GST-Core sur les billes est à peu près égale, ce qui signifie que l'importine  $\beta$  possède une plus faible affinité pour la protéine Core que pour le domaine IBB ( $K_d$  IBB/ Imp  $\beta$  = 7 nM) (Catimel, 2001). Cette différence peut également être expliquée par le fait que la séquence de Core est similaire mais non exactement identique au domaine IBB.

Il faut cependant prendre en compte que l'effet de la phosphorylation des protéines Cores isolées n'a pas été étudié, ce phénomène pourrait en effet avoir un rôle dans l'attachement des importines  $\alpha$  et  $\beta$ .

### **3. Nup153-C2 de xénope et Nup153-Cter humaine :**

Des études ont montré que la capsid est stoppée sur le domaine C-terminal de la Nup153 (Schmitz, 2010), qui comprend la majorité des répétitions FxFG et qui correspond au domaine qui interagit avec l'importine  $\beta$ .

Ce travail a été réalisé avec la Nup153 de xénope, qui montre environ 47% d'homologie avec la séquence de la Nup153 humaine. Nous avons voulu confirmer que les domaines C-terminal de la Nup153 humaine et de xénope exhibent la même fonctionnalité pour leurs substrats physiologiques, qui est l'importine  $\beta$ . Pour cela nous avons comparé l'interaction de l'importine  $\alpha$  et  $\beta$  pour ces protéines.

Nous pouvons observer que les 2 domaines C-terminaux de la Nup153 présentent les mêmes profils d'interaction. L'attachement pour l'importine  $\alpha$  est faible, ce qui est en accord avec le fait que l'importine  $\alpha$  lorsqu'elle se dissocie du complexe trimérique d'import est retrouvé dans le noyau et non à la membrane nucléaire. Une faible interaction est cependant visible, celle-ci a été décrite dans la littérature comme servant au recyclage de l'importine  $\alpha$  par la protéine CAS (Moroianu, 1997). En contraste, l'importine  $\beta$  se lie fortement au domaine C-terminal, ce qui est accord avec les données déjà publiés (Ben-Efraim, 2001). Cette interaction

a été caractérisée et son  $K_d = 1,1 \text{ nM}$  (Bednenko, 2003). Ces résultats ont aussi montré qu'en présence de l'importine  $\beta$ , l'importine  $\alpha$  s'attache de manière significative. Or nous savons que le complexe d'importine  $\alpha$  et  $\beta$  est stable seulement en présence d'un cargo, ces résultats peuvent donc indiquer que le domaine C-terminal de la Nup153 est aussi capable de stabiliser ces interactions.

#### **4. Interaction de Ran avec l'Importine $\beta$ :**

Le Ran-GTP ainsi que le Ran-GDP présentent des faibles interactions avec l'importine  $\beta$ , ce qui est en accord avec la littérature qui caractérise le  $K_d$  à  $3,3 \text{ nM}$  (Bednenko, 2003). Cependant, les interactions avec le Ran-GTP $\gamma$ S montrent une interaction beaucoup plus forte avec l'importine  $\beta$ . Les résultats similaires obtenus pour les molécules liées au GTP comme au GDP, supportent le modèle où la dissociation de l'importine  $\beta$  de la protéine Ran n'est pas seulement due à l'hydrolyse du GTP en GDP réalisée par Ran-GAP mais nécessite l'action de Ran-BP (Ran Binding protein) (Plafker, 2000).

#### **5. Dissociation des complexes d'imports par Ran-GTP :**

Les protéines GST-IBB et GST-Core présentent le même profil de dissociation, en effet l'importine  $\beta$  est dissociée par Ran-GTP alors que le Ran-GDP ne désassemble pas le complexe. En effet Core est efficacement libérée de l'importine  $\beta$  par Ran GTP et non par Ran GDP, ce qui confirme la nécessité de Ran-GTP pour la dissociation (Moroianu, 1998). Il est à noter que la dissociation s'effectue sans la présence de Nup153, ce qui indique que la faible interaction de Ran-GTP pour l'importine  $\beta$  est suffisante pour provoquer la dissociation. Le fait que Ran-GDP ne dissocie pas le complexe, confirme la spécificité de la réaction et est en accord avec le fait que la dissociation des complexes lors de l'import nucléaire s'effectue dans le noyau où Ran-GTP est majoritaire (Askjaer, 2002).

Les résultats obtenus pour le complexe NLS/ Imp $\alpha$ / Imp $\beta$  montrent que l'importine  $\beta$  est dissociée en présence de Ran-GTP comme de Ran-GDP, l'importine  $\alpha$  est quant à elle dissociée plus fortement par Ran-GTP que par Ran-GDP mais une dissociation est quand même visible, ce qui signifie que les interactions de l'importine  $\beta$  sur l'importine  $\alpha$  sont assez

faible. On peut aussi observer que l'importine  $\alpha$  reste encore accrochée au NLS même en absence de l'importine  $\beta$ , la liaison avec le NLS pourrait donc être stabilisée par la présence de Ran.

La dissociation de l'importine  $\beta$  du domaine C-terminal de la Nup153, n'est pas visible par l'action du Ran lié au GTP ou au GDP. Ceci est en accord avec la faible affinité de l'importine  $\beta$  pour le Ran. Cependant, la Nup153 possède sur son domaine central une région de liaison au Ran (Ball, 2005). Ce domaine n'est pas présent dans cette expérience, nous pouvons donc penser que ce domaine est impliqué dans la dissociation de l'importine  $\beta$  de la Nup153. Des expériences réalisées avec la Nup153 entière pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.

### **III. Localisation des importines :**

Les résultats obtenus pour la localisation de l'importine  $\alpha$  après reconstitution 3D des cellules nous ont permis de voir que les importines  $\alpha$  étaient présentes en forte concentration au niveau de la membrane nucléaire et qu'un gradient de concentration semblerait être visible. En effet plus on s'éloigne de la membrane nucléaire, plus la concentration diminue. Les anticorps utilisés reconnaissent les domaines de l'importine  $\alpha$  se liant au NLS ainsi qu'à la protéine CAS qui effectue l'export de l'importine  $\alpha$  (résidus 254-497) (Goldfarb, 2004). Les résultats obtenus sur des cellules dont les protéines ont été dénaturées par chauffage nous montrent que les interactions ont fortement lieu au niveau de la membrane nucléaire.

### **IV. Import nucléaire de la protéine Core et de la capsid mature :**

Nous avons effectué différents tests d'import sur des cellules HeLa perméabilisées à la digitonine. Premièrement nous avons effectué un test d'import sur les protéines Core ce qui nous a permis de voir que la protéine Core est importée par l'importine  $\beta$  seule. Ces résultats sont en accord avec les interactions observés précédemment. Alors que la capsid mature est, elle, importée par les 2 importines  $\alpha$  et  $\beta$ , ce résultat est le même que celui décrit dans la littérature (Kann, 1999) (Rabe, 2003).

Il semblerait donc que la protéine Core qui expose le C-terminal contenant un NLS composé de clusters d'arginine et qui est donc plus semblable au domaine IBB, soit reconnue par l'importine  $\beta$ . Alors que la Core dans le contexte de la capsid présente son NLS à la surface lorsque celle-ci est mature. La structure du NLS exposé ou la longueur de celle-ci sont très certainement des caractéristiques importantes qui permettent l'interaction avec l'hétérodimère imp  $\alpha$  / imp  $\beta$ .

## **V. Import nucléaire des différentes capsides :**

L'import nucléaire des capsides immatures présente le même résultat que celui décrit dans la littérature (Rabe, 2003), à savoir que la capsid immature reste bloquée au niveau de la membrane nucléaire. Les capsides WT exprimées chez *E.coli* et phosphorylées in-vitro sont aussi localisées au niveau de la membrane nucléaire ce qui est accord avec les résultats de M. Kann (Kann, 1999).

Les capsides recombinantes exprimées chez la levure et donc possédant déjà la phosphorylation restent elles aussi bloquées au niveau de l'enveloppe nucléaire.

Les capsides recombinantes C183S qui sont moins stables que les capsides WT sont, elles importées dans le noyau, or nous savons que les capsides observées dans le noyau sont issues d'une réassociation (Schmitz, 2010). Cela signifie que la stabilité des capsides peut avoir un rôle dans le désassemblage et donc dans la libération du génome.

Les capsides recombinantes WT vides sont observées dans les noyaux sans devoir être phosphorylées au préalable, ce qui signifie que le domaine C-terminal est accessible aux importines  $\alpha$  et  $\beta$ . La conclusion est donc que l'ARN bactérien pris au piège dans les capsides, possède un rôle dans la stabilité de la capsid ou dans la rétention du domaine C-terminal vers l'intérieur de la capsid.

## **VI. Stabilité des capsides recombinante WT et C183S :**

Des tests de fractionnement sur colonne d'exclusion de taille nous ont permis de dire que la capsid présente un équilibre de dissociation qui est concentration-dépendant. De plus des tests de réinjection des différentes fractions obtenues nous ont permis de voir que la capsid

était en constante association-dissociation. Ce phénomène va dans le sens du “capsid breathing” qui résulte d’une dissociation temporaire de la capsid.

## **VII. Affinité des anticorps Dako et Fab3105 pour la capsid et ces intermédiaires d’assemblages :**

En utilisant les fractions obtenues de l’injection des capsides sur les colonnes Superdex 75, nous avons analysé les affinités de 2 anticorps pour la capsid et ces intermédiaires de désassemblage. Nous avons utilisé l’anticorps polyclonal, le DAKO qui réagit avec la capsid entière et faiblement avec les capsides dénaturées (<1 %) (Kann, 1999). Le deuxième anticorps est l’anticorps monoclonal Fab3105 qui a été décrit comme se liant sur la boucle antigénique des dimères (Belnap, 2003). Les signaux ont été ajustés en fonction de la quantité de protéines présentes dans chaque fraction.

Nos résultats ont montré que l’anticorps Fab3105 réagit de la même manière avec les 3 formes de la capsid. Cela confirme que ce sont bien des protéines Core et que celles-ci sont au minimum sous la forme d’un assemblage dimérique.

Le Dako réagit avec la forme supposément hexamérique et avec la capsid entière, même si cette réaction est légèrement plus faible. Il est à noter que ce sont des capsides recombinantes produites en bactérie et contenant de l’ARN, ce dernier pourrait donc perturber l’ajustement des signaux.

Le Dako ne réagit pas avec les fractions provenant du 3<sup>ème</sup> pic, ce qui indique, avec les résultats du Fab3105, que ce pic contient de la protéine Core assemblée en dimère. Le Dako reconnaît donc des intermédiaires de désassemblage plus complexes que le dimère.

## **VIII. L’import nucléaire des capsides matures change leurs densités :**

### **1. Distribution des capsides dans un gradient de densité :**

Il a été montré que les capsides matures et les capsides dérivées d'*E. coli* sont identiques à une résolution de 30Å (kenney 1995) et dernièrement à une résolution de 16Å (Dryden, 2006).

Cela signifie que les différences de migration observée sur les gradients de densité sont causées par le contenu en acides nucléiques de la capside. En effet, une différence est observée entre les capsides contenant de l'ADN et celles contenant de l'ARN.

## **2. Effet du transport nucléaire sur la sédimentation de la capside mature :**

Afin d'analyser le devenir des capsides matures après l'import nucléaire, nous avons analysé la réaction de dissociation des capsides dans des cellules perméabilisées. L'import des capsides matures contenant donc de l'ADN provoque un changement de migration des capsides à la densité de celles contenant de l'ARN. Cela est seulement observable lorsque l'import nucléaire est efficace, le test d'inhibition de l'import nucléaire avec le WGA ne montre aucune modification de la capside.

## **3. Effet de l'ARN nucléaire sur les capsides nucléaire et ces intermédiaires de désassemblage :**

La libération du génome et le remplacement de l'ADN par de l'ARN n'est pas explicable sans une dissociation de la capside.

Afin d'observer le désassemblage de la capside en sous-unités dans le noyau, nous diminuons le phénomène de réassociation en retirant l'ARN nucléaire. Cela est effectué par un traitement à la RNase. Les techniques de sédimentation et l'observation de ce phénomène au microscope confocal, montrent que la capside se désassemble en dimère qui se localise dans le noyau.

La capside se désassemble en dimère pour libérer son génome, puis ces dimères vont utiliser l'ARN nucléaire afin de reformer des capsides contenant de l'ARN.

## **IX. Stabilité des capsides et accessibilité du génome :**

Des tests ont été réalisés afin de voir l'accessibilité du génome au cours du temps. Pour cela les capsides ont été incubées avec de la nucléase S7 qui possède une taille globulaire d'environ 5 nm. Cette nucléase ne peut pas dégrader le génome des capsides matures si celle-ci est formée et stable. Nous avons donc souhaité analyser au cours du temps la stabilité de ces capsides.

Les capsides ont donc été incubées avec la nucléase S7 durant différents temps et nous avons suivi la dégradation du génome ainsi que la présence des capsides entières. Cela nous a permis de déterminer que les capsides possédaient de façon transitoire des trous suffisamment larges pour permettre l'action de la Nucléase S7 au cours du temps, alors que les capsides sont toujours formées. Cela signifie que la nucléase peut avoir accès au génome même si la capside est formée.

Cependant, on observe une dégradation de seulement 30 % du génome en 6 heures ce qui n'est pas suffisant pour rendre compte de la libération du génome car celui-ci est retrouvé en 30 minutes dans les noyaux après lipofection des capsides.

Ces résultats vont aussi dans le sens de notre hypothèse, qui est que la capside effectue le "capsid breathing" et doit permettre à un facteur nucléaire de libérer le génome.

Les expériences réalisées dans les cellules perméabilisées où les capsides matures sont localisées, après import, dans le noyau et qui ont donc subi une dissociation, nous donnent une indication sur ce facteur nucléaire. En effet, lors de la perméabilisations et des lavages, les protéines avec d'une masse moléculaire inférieure à 30 kDa sortent du noyau. Cela nous indique que le facteur impliqué dans la libération du génome est soit d'une taille supérieure à 30 kDa soit lié à une structure nucléaire.

## **X. Facteurs impliqués dans la libération du génome :**

La libération du génome se fait donc au niveau du panier nucléaire, nous avons émis l'hypothèse que la capside liée à la Nup153 dans le panier nucléaire, effectue un "capsid

breathing” et que cela déstabilise la capsid, ce qui va favoriser l’action d’un facteur localisé à cette endroit afin de désassembler la capsid et permettre la libération du génome.

Le facteur qui rentre en jeu dans ce processus de libération est très vraisemblablement un facteur présent lorsque la capsid arrive au niveau du panier nucléaire. Il a été montré que la capsid se lie à la Nup153, c’est pourquoi nous avons pensé que cette protéine était un bon candidat.

Les tests réalisés avec la Nup153-C2 montrent que nous obtenons 20 % de dégradation du génome en 1 heure d’incubation, cela montre que la présence du domaine C-terminal de la Nup153 augmente d’environ 10 % la dégradation du génome.

Puis, nous avons souhaité voir si du lysat cellulaire avait un effet sur la réaction. Pour cela nous avons utilisé du lysat de Huh7, ces cellules ont déjà été décrites comme permettant l’import des capsides matures et donc la libération des génomes dans les cellules perméabilisées. Le lysat seul ne montre aucune dégradation du génome, alors que le lysat en présence du domaine C-terminal de la Nup153 présente une dégradation d’environ 30 %. Ceci va dans le sens de notre hypothèse où un facteur cellulaire est requis pour la dissociation de la capsid.

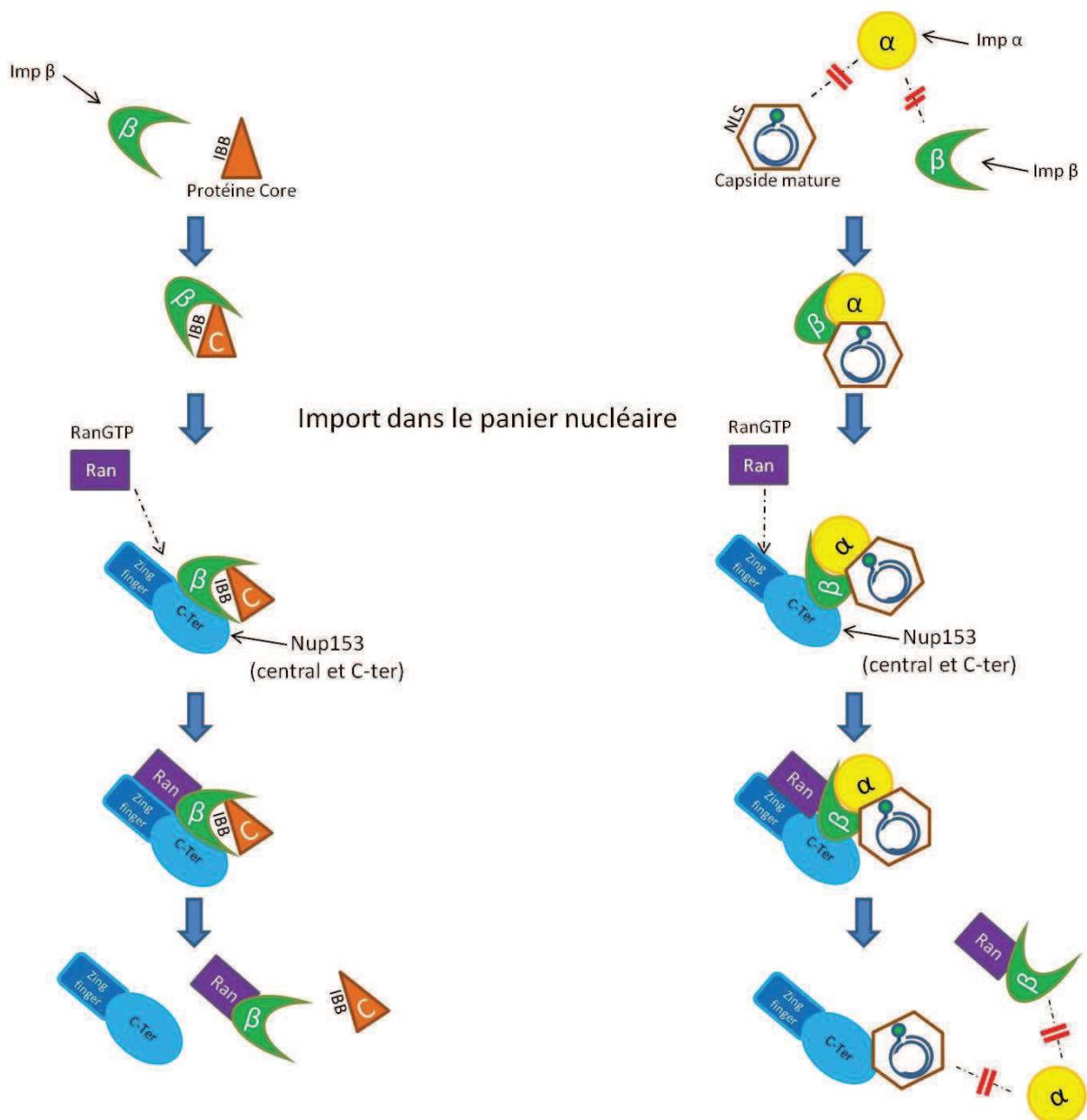
Cependant la lyse effectuée sur les cellules Huh7 dilue les protéines, le facteur nécessaire n’est peut être pas assez concentré pour montrer un effet de 100 %.

Après avoir testé cela, nous nous sommes tournés vers les protéines qui sembleraient impliquées dans la conversion du génome en ADNccc, car il s’agit de l’étape qui précède la libération du génome. C’est pourquoi nous avons testé la polymérase de Klenow qui est un prototype modèle commode de polymérase. Cependant aucune des protéines testées ne semble augmenter l’accessibilité du génome.

# **Conclusions et Perspectives**

Nos résultats nous ont permis de montrer que l'import de la capside ne suit pas le même chemin que l'import de la protéine Core non phosphorylée. En effet, la protéine Core est importée dans le noyau par l'importine  $\beta$  et réagit comme un signal IBB. En revanche la capside est quant à elle, importée par l'hétérodimère d'importine  $\alpha$  et  $\beta$ .

Des expériences de contrôle utilisant la protéine GST-NLS démontrent que la liaison entre le NLS et l'importine  $\alpha$  nécessitent l'interaction de l'importine  $\beta$  afin de stabiliser le complexe d'import. L'interaction des importines  $\alpha$  et  $\beta$  avec leurs cargos nécessite donc la présence des 3 partenaires.



**Figure 120:** Modèle d'import de la capside et de la protéine core.

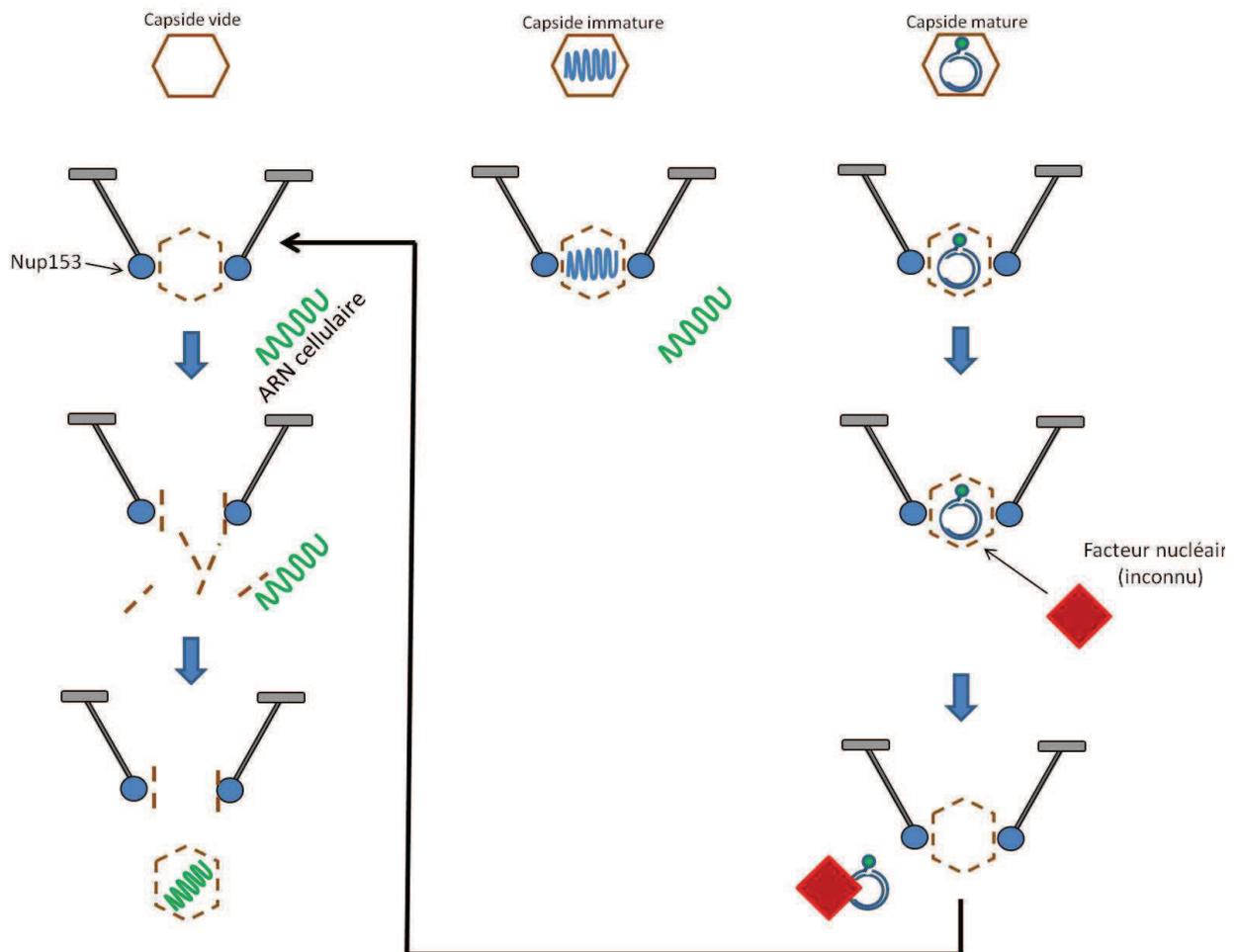
A la suite de ces interactions, les complexes d'import traversent le NPC. Ce transport se termine avec l'arrivée de la protéine Core ou de la capsidie dans le panier nucléaire. A ce niveau, nous avons observé que l'importine  $\beta$  interagit avec le domaine C-terminal de la Nup153, où sont localisées les répétitions FG. Ces interactions sont des liaisons fortes, ce qui est en accord avec la littérature.

La protéine RanGTP va ensuite se lier au domaine central de la Nup153, ce qui va dissocier l'importine  $\beta$  de la protéine Core. La protéine Core va être libérée dans le noyau et l'importine  $\beta$  va être recyclée par le RanGTP. La dissociation du complexe d'import de la capsidie est effectuée aussi par RanGTP qui va dissocier les importines  $\alpha$  et  $\beta$  de la capsidie. L'importine  $\beta$  va rester liée sur le Ran-GTP ce qui va permettre son export et inhiber une réassociation avec l'importine  $\alpha$ . Lorsque la capsidie est libérée de ces transporteurs, elle va interagir avec le domaine C-terminal de la Nup153 ce qui va la bloquer au niveau du panier nucléaire.

En effet il a été montré dans la littérature que les capsides sont arrêtées au niveau de la membrane nucléaire par la Nup153, et que les capsides qui sont retrouvées dans le noyau sont issues d'un désassemblage (Rabe, 2009). Cette interaction entre la capsidie et la Nup153 déstabilise la capsidie, ce qui est en accord avec nos résultats obtenus avec le domaine Cterminal de la Nup153 lors des tests d'accessibilité du génome.

A partir de nos résultats nous pouvons proposer un modèle pour la dissociation de la capsidie et la libération du génome. Premièrement, les capsides instables comme les capsides vides, ainsi que les capsides C183S sont importées jusqu'au panier nucléaire où elles vont alors se lier à la Nup153. Cette liaison va rendre la capsidie instable et permettre la dissociation de celle-ci sous sa forme dimérique. Les dimères libres de la capsidie vont donc se localiser dans le noyau, où ils vont pouvoir se réassembler pour former une nouvelle capsidie. Cette capsidie va s'assembler autour de l'ARN cellulaire. Deuxièmement les capsides immatures, qui contiennent de l'ARN vont être importé jusqu'au panier nucléaire où elles aussi vont se lier aux protéines Nup153 et être déstabilisées. Cependant dans le cas de ces capsides, il n'y a pas de dissociation et la capsidie reste arrêtée sur la Nup153. Il a été montré que la capsidie avait plus d'affinité pour l'ARN que pour l'ADN. Dans le cas des capsides matures, la capsidie est importée jusqu'au panier nucléaire où elle est arrêtée par la Nup153, cette interaction va déstabiliser la capsidie ce qui va favoriser le phénomène de capsidie breathing. Cela va pouvoir permettre l'accessibilité au génome à un facteur nucléaire qui pour le moment est encore

inconnu. Ce facteur qui est donc d'une taille supérieure à 30 kDa ou qui est fixé dans le noyau est spécifique au génome ADNrc. Ce facteur pourrait être une des protéines impliquées dans l'étape de réparation/conversion de l'ADNrc en ADNccc, qui est l'étape consécutive à la libération du génome.



**Figure 121:** Modèle pour la dissociation de la capside.

Cependant les tests réalisés avec la polymérase n'ont montré aucun effet sur l'accessibilité du génome et l'on observe un effet de dégradation plus fort en présence de Nup153-Cter et du lysat de Huh7, ce qui est en accord avec notre modèle. D'autres expériences doivent être réalisées afin d'identifier le facteur qui permet la libération du génome.

Nous avons mis au point un système de marquage de la capside et du génome qui pourront être utilisés afin de continuer l'analyse du désassemblage et de la libération du génome.

# **Annexes**

# Nuclear Entry of Hepatitis B Virus Capsids Involves Disintegration to Protein Dimers followed by Nuclear Reassociation to Capsids

Birgit Rabe<sup>1,9,10a</sup>, Mildred Delaleau<sup>2,9</sup>, Andreas Bischof<sup>1,10b</sup>, Michael Foss<sup>2</sup>, Irina Sominskaya<sup>3</sup>, Paul Pumpens<sup>3</sup>, Christian Cazenave<sup>2</sup>, Michel Castroviejo<sup>2</sup>, Michael Kann<sup>1,2\*</sup>

**1** Institute of Virology, Justus Liebig University, Giessen, Germany, **2** UMR 5234 CNRS-University Bordeaux 2 MCMP, Bordeaux, France, **3** Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia

## Abstract

Assembly and disassembly of viral capsids are essential steps in the viral life cycle. Studies on their kinetics are mostly performed *in vitro*, allowing application of biochemical, biophysical and visualizing techniques. *In vivo* kinetics are poorly understood and the transferability of the *in vitro* models to the cellular environment remains speculative. We analyzed capsid disassembly of the hepatitis B virus in digitonin-permeabilized cells which support nuclear capsid entry and subsequent genome release. Using gradient centrifugation, size exclusion chromatography and immune fluorescence microscopy of digitonin-permeabilized cells, we showed that capsids open and close reversibly. In the absence of RNA, capsid re-assembly slows down; the capsids remain disintegrated and enter the nucleus as protein dimers or irregular polymers. Upon the presence of cellular RNA, capsids re-assemble in the nucleus. We conclude that reversible genome release from hepatitis B virus capsids is a unique strategy different from that of other viruses, which employs irreversible capsid destruction for genome release. The results allowed us to propose a model of HBV genome release in which the unique environment of the nuclear pore favors HBV capsid disassembly reaction, while both cytoplasm and nucleus favor capsid assembly.

**Citation:** Rabe B, Delaleau M, Bischof A, Foss M, Sominskaya I, et al. (2009) Nuclear Entry of Hepatitis B Virus Capsids Involves Disintegration to Protein Dimers followed by Nuclear Reassociation to Capsids. *PLoS Pathog* 5(8): e1000563. doi:10.1371/journal.ppat.1000563

**Editor:** Michael Farzan, Harvard Medical School, United States of America

**Received:** March 18, 2009; **Accepted:** August 3, 2009; **Published:** August 28, 2009

**Copyright:** © 2009 Rabe et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This research was supported by two grants to MK: Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 535, TP B5) and Agence Nationale de Recherche sur la SIDA et les Hépatites Virales, ANRS, and by a grant by the Region Aquitaine to MD. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: michael.kann@u-bordeaux2.fr

<sup>10a</sup> Current address: AiCuris, Wuppertal, Germany

<sup>10b</sup> Current address: Allianz SE, München, Germany

<sup>9</sup> These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Viral capsids facilitate multiple functions in the viral life cycle. Outside the cell, they protect the enclosed viral genome against nucleases, and in case of non-enveloped viruses they mediate attachment and entry. For both enveloped and non-enveloped viruses, they carry the viral genome to the site of replication where they have to release the genome in order to allow access of transcription and/or replication factors. After replication new capsids have to be assembled for encapsidation of the progeny genomes and subsequent release of mature virions. Capsids are assigned to be metastable: early in infection they have to open, later they have to assemble and close. Most data on stability of capsids and kinetics of their formation and dissociation are obtained *in vitro* allowing analysis by biophysical or electron microscopical techniques (e.g. [1–5]).

*In vivo* data on capsid disintegration are rare despite of their importance for genome release and viability of infection. Two different examples are Adenovirus 5 (Ad-5) capsids and the capsid of Herpes simplex virus-1 (HSV-1). Ad-5 capsids disintegrate to

penton and hexon subunits after modification upon endocytosis [6,7] for genome release. Capsids of HSV-1 in contrast remain stable after release of one penton [8] which allows the injection of the viral DNA from that opening [9].

Intensive studies on capsid assembly were performed *in vitro* on capsids of the medically important Hepatitis B virus (HBV) [1,5,10,11]. HBV infection is endemic in large parts of the world and ~350 Mio people are chronically infected, accounting for 1 million deaths per year. HBV is an enveloped virus with an icosahedral capsid that is composed of 240 or 180 copies of a single protein species called core protein [12]. Within the oxidizing environment outside the cell the two core protein subunits of a dimer become linked by three disulfide bonds (Cys 48, 61 and 183 [13,14]). The capsid encloses the relaxed circular viral DNA (rcDNA) [15], which is covalently attached to the viral polymerase [16].

HBV cell entry is the limiting step that prevents infection of most cell cultures but it can be by-passed by lipofection of hepatoma cells with virion-derived capsids. Using this artificial mode of capsid entry, HBV production reaches *in vivo*-like

## Author Summary

Viral capsids facilitate protection of the enclosed viral genome and participate in the intracellular transport of the genome. At the site of replication capsids have to release the genome, but after replication new capsids have to be assembled for encapsidation of the progeny genomes. Detailed data on stability of capsids and kinetics of their formation and dissociation are obtained for several viruses *in vitro*, allowing biophysical or electron microscopical techniques. These approaches, however, do not consider the impact of cellular interaction partners. Using digitonin-permeabilized cells which support hepadnaviral genome release actively, we analyzed the disassembly kinetic of the hepatitis B virus (HBV) capsid. Using different analytical methods we found that HBV capsids disintegrate to protein dimers which reassemble to capsids inside the nucleus. The study provides a link between *in vitro* and *in vivo* data showing that HBV uses a unique strategy. We propose a model in which the unique environment of the nuclear pore favors the disassembly reaction, while both cytoplasm and nucleus favor assembly.

efficiency [17]. This suggests that the capsids either do not become modified during natural entry or that lipofection changes their structure in the same way. Complex interactions with the cellular transport machinery mediate capsid translocation to the nuclear periphery, passage through the NPC and liberation of the viral DNA [17–19].

Transport and genome release must be highly efficient and well-coordinated, because ~80% of virions are infection-competent *in vivo* [20]. Within the nucleus, viral DNA is converted by cellular repair mechanisms to a covalently closed circular form (cccDNA), which is the template for viral mRNA synthesis including the RNA pregenome. Interaction of the RNA pregenome with the viral polymerase facilitates encapsidation into the viral capsid [21]. The polymerase retrotranscribes RNA pregenome into the rcDNA, but this occurs only within the capsids. This genome maturation requires multiple phosphorylation steps within the C terminus of the core protein [22,23]. Mature capsids (Mat-C) can either be enveloped by the viral surface proteins in order to form virions or they can be transported through the NPC causing amplification of nuclear viral DNA.

Liver histology of HBV-infected individuals shows massive intranuclear capsid accumulation. However, the number of intranuclear viral genomes is low. Thus, it is believed that unassembled core protein pass the NPC and assembles intranuclear [24].

HBV capsids exhibit predominantly a T = 4 symmetry with a diameter of ~36 nm. Core protein assembly is independent of eukaryotic host proteins as it occurs also upon core protein expression in *E. coli* resulting in “recombinant” capsids (rC). In contrast to natural capsids, rC are unphosphorylated and contain *E. coli* RNA [25]. In addition, they exhibit one unnatural disulfide bond linking the C terminal Cys (C183) of one core protein with a C183 of a neighboring dimer [26].

Structure of the first 143 aa of core proteins in rC has been obtained by X ray crystallography with a resolution of 3.3 Å [27]. The core monomer comprises two long  $\alpha$ -helices with a hairpin structure. Association of two hairpins from two monomers forms a spike which protrudes from the particle surface. The connecting loop is exposed on the spike tip and comprises the immune dominant c/e1 B cell epitope, so that most antibodies are conformation-dependent. While the first 143 aa of the core

protein are well structured [12], the C terminus is flexible: whereas the C terminus is localized within capsid lumen in *E. coli*-expressed capsids [28], it is exposed to the exterior in viral mature capsids [19]. The latter observation may however indicate that capsids dynamics increase with genome maturation.

*In vitro* association kinetics, performed on *E. coli*-expressed, C terminally truncated core proteins (aa 149), showed that capsid formation starts with core protein dimers. It is thought that the dimers trimerize and the resulting hexamer nucleates capsid assembly without accumulating further distinct populations of capsid subassemblies [10,29]. According to the laws of thermodynamics, disassembly could just be the inverse reaction because the attractive forces between the subunits are weak, allowing them to transiently dissociate and re-associate (capsid breathing) [1,5] in a way similar to that observed for polio-, flockhouse- and rhinoviruses [2–4]. In fact, recent *in vitro* evaluations showed that chaotropic agents as urea cause disassembly down to core protein dimers without distinguishable capsid subassemblies [30]. Several differences of these *in vitro* studies with the *in vivo* situation deserve attention: the C terminus, which interacts with encapsidated nucleic acids [31] and comprises the phosphorylation sites, was deleted in these studies; the capsids contained neither RNA nor DNA nor the polymerase. Moreover, host factors explaining the highly time- and site-coordinated HBV genome release were not present.

Accounting for the poor knowledge on *in vivo* disassembly and the medical importance of HBV, we evaluated the fate of HBV capsids within the cell. As no efficient infection system exists, we used digitonin-permeabilized cells that promote genome liberation into the nucleus. In order to distinguish reliably between input capsids and products of disassembly and re-assembly, we determined antibody binding properties, density, and size of authentic and recombinant capsids, and compared these particles with the products of nuclear import.

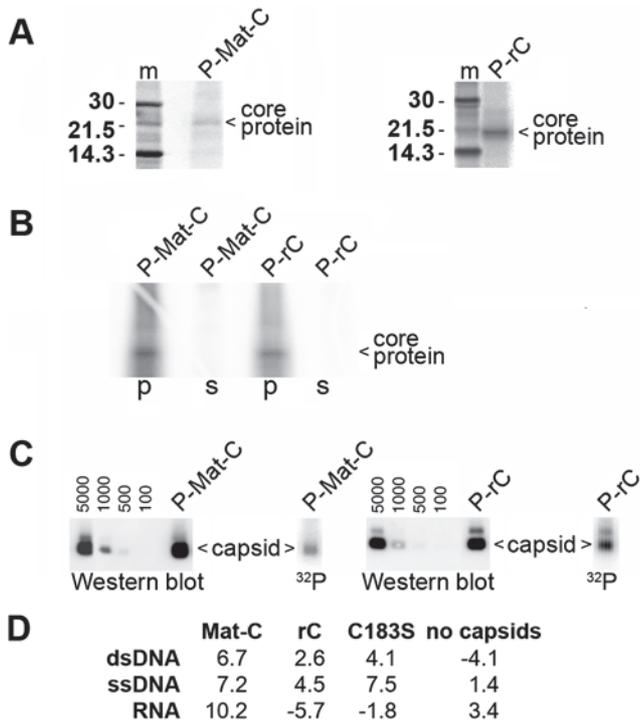
## Results

### Overview

We characterized <sup>32</sup>P labelled mature DNA-filled capsids from cell culture and RNA-filled capsids from *E. coli* as reagents. These capsids exhibited different densities upon Nycodenz gradient centrifugation. DNA-filled capsids undergo a transition to a density that resembled the RNA-filled state that correlates with nuclear entry. We demonstrated that *E. coli* expressed capsids dissociate and reassociate. Using the assembly/disassembly states we characterized two anti core protein antibodies and found different specificities for assembly states. These characteristics allowed us to analyse the intracellular fates of DNA-filled capsids by immune fluorescence microscopy.

### Characterization of capsids and core proteins

Phosphorylation of both HBV virion-derived (Mat-C) and *E. coli*-derived (rC) capsid species resulted in specific labelling of the core proteins (Fig. 1A). In order to exclude that contaminant proteins accounted for the radiolabelled 21.5 kDa band we performed an immune precipitation using a polyclonal anti HBV capsid antibody (DAKO Ab). This antibody does not react with denatured core protein or core protein aggregates generated by acidification [18]. Fig. 1B showed that the DAKO Ab completely precipitated the 21.5 kDa band. This finding confirmed the identity of the band as core protein and showed that no other <sup>32</sup>P-labelled protein co-migrated. It further indicated that all core proteins exhibited their proper conformation after phosphorylation. To analyze whether the core proteins were assembled to



**Figure 1. Analysis of  $^{32}\text{P}$  labelled capsids.** **A.** Labelling of virion-derived capsids (P-Mat-C) using the endogenous protein kinase (left) and *E. coli*-derived capsids (rC) by *in vitro* phosphorylation (P-rC, right) using SDS PAGE. m:  $^{14}\text{C}$  marker, labelled virion-derived capsids (P-Mat-C), labelled *E. coli*-expressed capsids (P-rC). The labelling resulted in a single 21.5 kDa band characteristic for the core protein. **B.** Immune precipitation of both capsids by DAKO Ab. p: precipitate, s: supernatant. Both capsids were completely precipitated. The result shows that no other radiolabelled 21.5 kDa protein contaminated the preparations. **C.** Separation of P-Mat-C (left) and P-rC (right) on native agarose gels followed by Western blot using DAKO Ab or phosphoimaging ( $^{32}\text{P}$ ). The numbers show a geometrical dilution of rC in pg, which was used for quantification. The figures show that the labelled core proteins were assembled to capsids. **D.** Nuclease activity in the capsid preparations.  $^{32}\text{P}$ -labelled nucleic acids were incubated for 2 h at 37°C with 50 ng of capsids. The numbers show the % of hydrolysis based on duplicates and depicts that no significant DNase or RNase activity was contaminating the preparations.  
doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g001

capsids we performed a native agarose gel electrophoresis of (Fig. 1C). No disintegrated capsids or aggregated core proteins exhibiting slower and diffuse migration were observed [18]. Phosphorylated rC (P-rC) caused a minor, slower migrating band. The additional band is characteristic for *E. coli*-expressed capsids. It is assumed that the minor band represent two capsids linked by RNA, as RNase A-treatment reduces the slower migrating band. The presence of this band thus indicates that the trapped RNA was not degraded upon *in vitro* phosphorylation. Both capsid species reacted with the DAKO Ab confirming their exposure of core protein epitopes.

We next analyzed possible contaminations with nucleases in the capsid preparations. We used  $^{32}\text{P}$  labelled dsDNA, ssDNA and RNA and determined the hydrolysis after 2 h incubation at 37°C (Fig. 1D). We observed reductions of TCA-precipitable  $^{32}\text{P}$  up to 10.2%. As the pipetting error in this assay was determined to be 4% we assume that the nuclease activities in the capsid preparations were not significant.

The  $^{32}\text{P}$  capsid preparations were analyzed by Nycodenz gradient centrifugation. Nycodenz was chosen as it conserves

protein interactions better than any other gradient media, allowing the recovery of functionally active protein complexes [32]. In our hands, Nycodenz allowed the recovery of 95% of *E. coli*-expressed capsids loaded, while CsCl, which is known to allow separation of genome-containing and empty capsids - caused significant capsid disintegration to 10% (data not shown). As Nycodenz has properties similar to sucrose that allows a separation based on the sedimentation coefficient. In contrast to sucrose however, Nycodenz allows capsids to reach their equilibrium. In order to determine sedimentation of unassembled core proteins, we analyzed urea disintegrated capsids by centrifugation. Due to the unphysiological disulfide bonds of the C terminal Cys upon expression in *E. coli*, the assay was performed using the C183S P-rC mutant.

Sedimenting the capsids on Nycodenz gradient resulted in a peak of P-rC from 1.257 to 1.283 g/ml, with a maximum at 1.283 g/ml (Fig. 2A, peak (1)). The three major fractions contained 91% of the radioactivity. P-Mat-C banded at a slightly lower density between 1.242 and 1.284 g/ml with a maximum at 1.263 g/ml (Fig. 2B, peak (2)). The four major fractions contained 98% of the radioactivity indicating that capsids had not undergone significant degradation during centrifugation.

Urea dissociated core proteins remained close to the top of the gradient exhibiting a peak at 1.156 g/ml (Fig. 2C, peak (3)). Likely, these core proteins represent dimers as it was reported upon urea disintegration by others [30].

Despite the fact that rC has a ca. 1.8 fold higher molecular mass than RNA, the density of P-Mat-C was slightly lower. In Nycodenz however, RNA has a higher density (1.18 g/ml) than dsDNA (1.13 g/ml) while proteins have 1.31 g/ml in Nycodenz [32]). Therefore, the different density distribution of Mat-C and rC implies that the gradient medium entered capsid lumen. To test this hypothesis we searched for Nycodenz entry by electron microscopy. Nycodenz, an electron-rich solute, can be seen without addition stain. Fig. 2D depicts that Nycodenz caused 20–24 nm large dots which were absent in the negative control. The size of the stain was similar to the lumen of P-rC stained by phosphotungstic acid, which exhibited the external diameter of 35 nm known for HBV capsids.

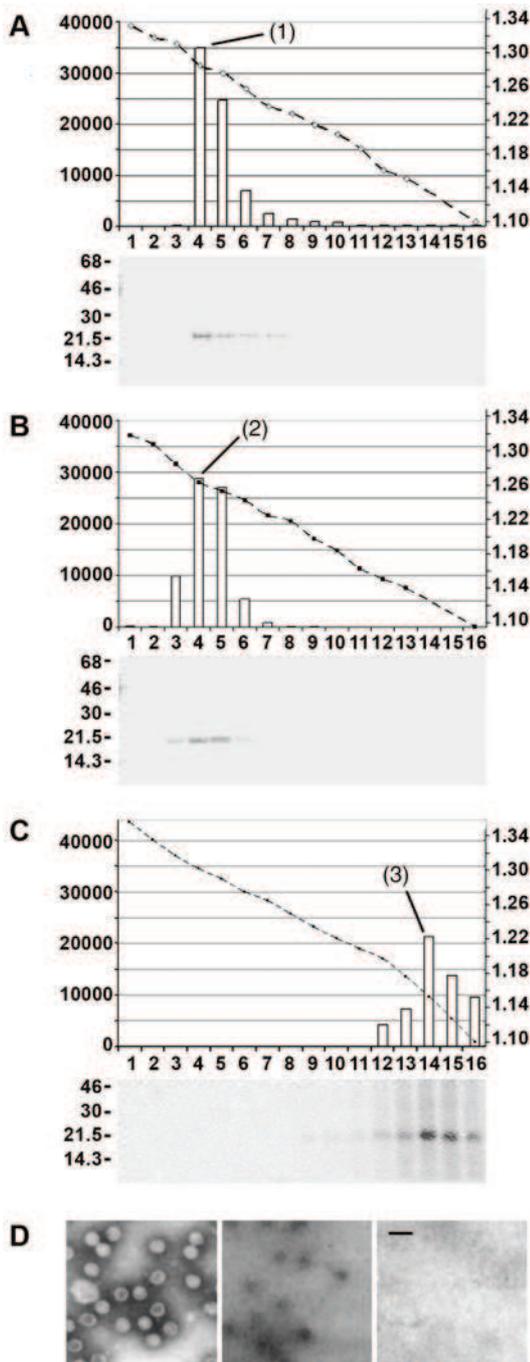
#### Antibody-binding to capsids and capsid subassemblies

We used rC capsids in order to separate capsids from core protein dimers and capsid subassemblies. Separation was performed by Superdex 75 size exclusion chromatography using C183S rC capsids.

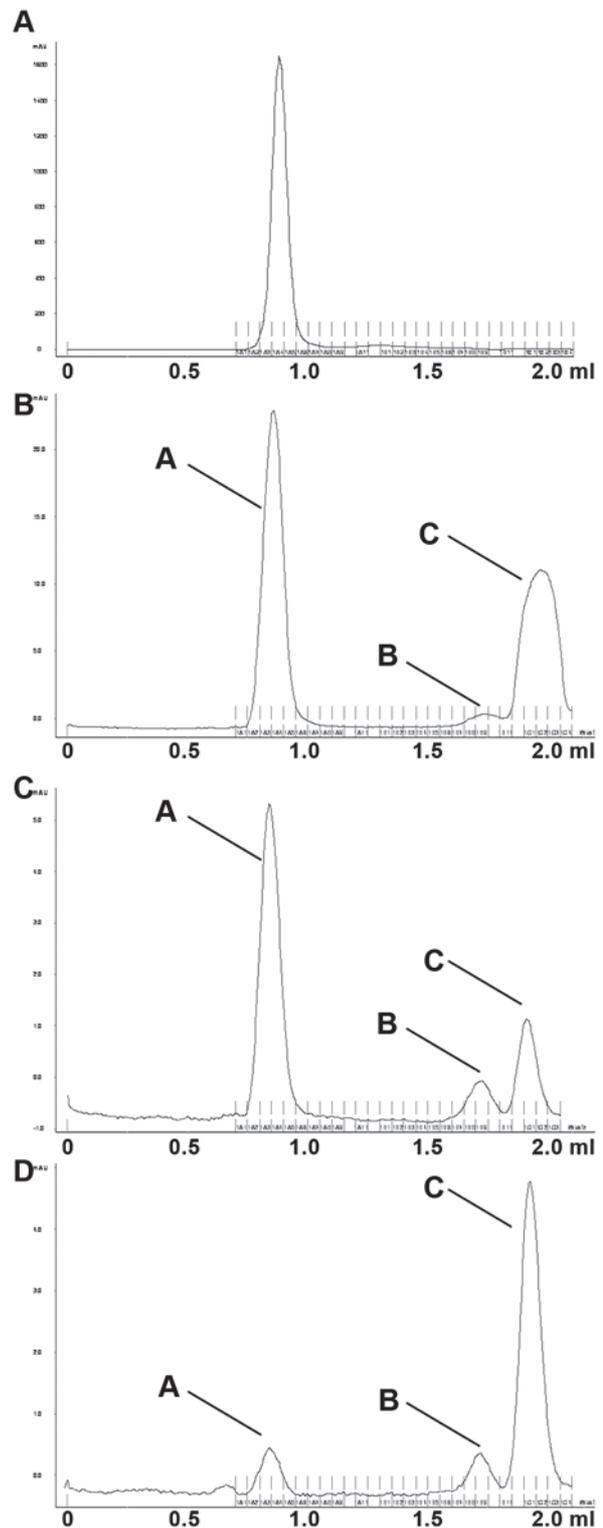
Separating a stock solution of C183S-rC revealed a single peak in fractions A4 (0.85 ml) (Fig. 3A). Its appearance in the exclusion volume of the column implies that practically all core proteins were assembled to capsids. However, when a 20 fold lower core protein amount was applied three peaks occurred (Fig. 3B): the strongest peak (peak A; 51% of total protein) appeared in fraction A3/4 (0.85 ml), which is within the exclusion limit of the column. A small peak (B, ~3%) appeared in fraction B9 (1.73 ml) and another stronger peak (peak C, 46%) was observed in fraction C1/2 (1.92 ml).

Re-application of peak A after 1 h at RT resulted in the re-appearance of peaks A, B and C (69% peak A, 10% peak B and 23% peak C; Fig. 3C). Re-injection of peak C revealed the same peaks but with a different distribution (A 11%, B 10%, C 79%) (Fig. 3D). This finding confirms that rC undergoes dissociation, as described previously [1,5].

For analyzing the immune reactivity of the fractions, we used two anti capsid antibodies: (1) polyclonal DAKO Ab reacts with entire wt capsids but only weakly with denatured core proteins



**Figure 2. Analysis of capsids by Nycodenz gradient ultracentrifugation and electron microscopy.** A–C: Nycodenz gradient ultracentrifugation using 50 ng of capsids. The graphs show the fractions (numbers below), their densities (right scales [g/ml] and dotted lines) and the radioactivity of the core protein bands based on phosphoimaging (left scales, arb. units). The autoradiographies below depict the radiography after SDS PAGE. **A.** P-rC, **B.** P-Mat-C, **C.** P-rC183S treated with 4 M urea prior to centrifugation. The figures demonstrate that P-rC exhibited a peak at 1.283 g/ml (1) while P-Mat-C showed a peak density of 1.156 g/ml (3). **D.** Electron micrograph of P-rC. Left panel: staining by phosphotungstic acid, middle panel: after incubation with Nycodenz, right panel: no stain. Note that contrast on the two right panels was enhanced as Nycodenz gives a faint contrast only. The bar represents 50 nm. The figure shows that Nycodenz diffuses into the capsids giving contrast within capsid lumen. doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g002

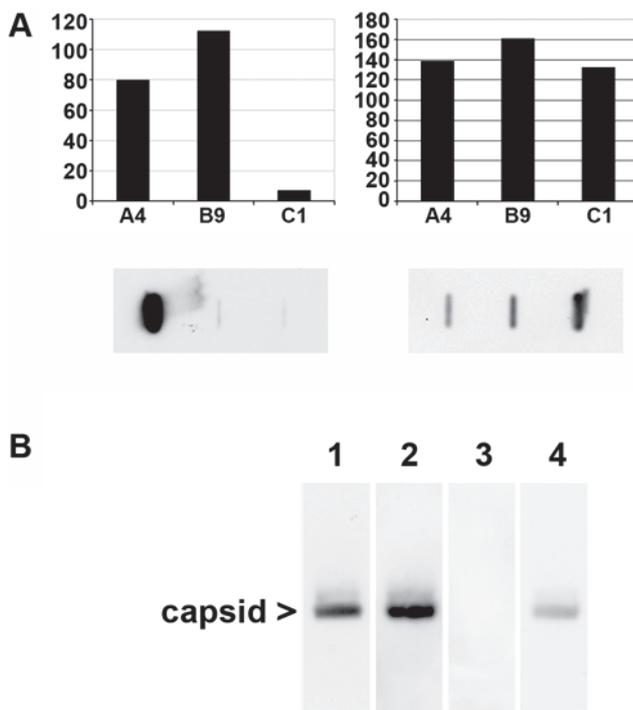


**Figure 3. Equilibrium of capsids and capsid subassemblies.** Separation of C183S rC subassemblies on Superdex 75 PC 3.2/30 columns. **A.** Separation of the stock with 100 µg/50 µl, **B.** stock of 10 µg/50 µl. **C.** Reinjection of fraction A3 (peak A from Fig. 3B) after 1 h at RT. **D.** Reinjection of fraction C1 (peak C from 3B) after 90 min at 4°C. The x-axes depict the fractions, the y-axes the OD<sub>280</sub>. The panels support the idea that capsids breathe, showing the capsid (peak A) and two capsid subassemblies (peaks B and C). Denaturation of capsids resulted in core proteins eluting in the flow through. doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g003

(<1% [18]), (2) monoclonal FAb3105 which was shown previously to bind to an epitope on core protein dimers involving the immune dominant loop (aa 77–80 and 83–84 [33]).

Determination of the immune reactivity of peaks A, B and C by dot blot is shown on Fig. 4A. The graph shows the reactivity, normalized to the protein amounts. FAb3105 reacted similarly well with all fractions giving evidence that they contained core proteins which were at least assembled to dimers. The polyclonal DAKO Ab reacted best with fraction B and somewhat less with fraction A containing the capsid. It must be considered however that the capsid peak contains the encapsidated heterogeneous *E. coli* RNA, which leads to an overestimation of the core protein amount. Reactivity with fraction C was faint. Given that peak C contained core proteins already assembled to dimers we conclude that the DAKO Ab recognizes preferably epitopes that are formed on capsid subassemblies with a higher complexity.

The interference of spike insertions with DAKO Ab binding implies binding at or close to the spikes, similar to FAb3105. We thus analyzed the antibody competition for their epitopes on rC. Fig. 4B shows that preincubation with DAKO Ab completely inhibited FAb3105 binding, suggesting overlapping binding sites.



**Figure 4. Characterization of anti capsid antibodies using capsid subassemblies.** **A.** Immune reactivity of capsids and subassemblies using DAKO Ab (left panel) and FAb3105 (right panel). The graphs show the reactivity normalized to the protein amount (arbitrary units). The fractions are given below the x-axes. The reactivity on the y-axes is depicted in arbitrary units. The panels below are dot blots using peaks A-C from Fig. 3B(DAKO Ab) or from Fig. 3D(Fab3105). The graphs show that the polyclonal DAKO Ab reacts with capsids and fraction B9, while the FAb3105 reacted with all fractions equally well. **B.** Interference between DAKO Ab and FAb3105 binding to rC separation on native agarose gel electrophoresis. 1. 1<sup>st</sup> Ab: DAKO Ab, 2<sup>nd</sup> Ab: horse radish peroxidase-labelled (POD) anti rabbit. 2. 1<sup>st</sup> Ab: FAb3105, 2<sup>nd</sup> Ab: POD anti mouse. 3. 1<sup>st</sup> Ab: DAKO Ab followed by FAb3105, 2<sup>nd</sup> Ab: POD anti mouse. 4. 1<sup>st</sup> Ab FAb3105 followed by DAKO Ab, 2<sup>nd</sup> Ab: POD anti rabbit. The blots show that preincubation with DAKO Ab totally prevented capsid interaction with FAb3105 while preincubation with FAb3105 inhibited DAKO Ab reactivity significantly but not completely. doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g004

Saturation with FAb3105 prior to DAKO Ab incubation reduced DAKO Ab binding but not entirely, potentially due to its polyclonality.

### Nuclear import changes the density of Mat-C

In order to analyze the fate of Mat-C upon nuclear entry we analyzed the sedimentation in Nycodenz after subjecting P-Mat-C to nuclear import. Import reaction was performed using digitonin-permeabilized cells, which is a well-established system for analysis of nucleo-cytoplasmic traveling and HBV genome release at the nuclear envelope [19,34]. A control reaction was performed by addition of WGA, which blocks active nuclear import by nuclear transport receptors [35]. Following import reaction, nuclei were lysed by the same non-ionic detergents used for capsid purification of Mat-C from secreted virus. A similar protocol was chosen to exclude that nuclear lysis has an impact on the subsequent capsid analysis on Nycodenz gradients.

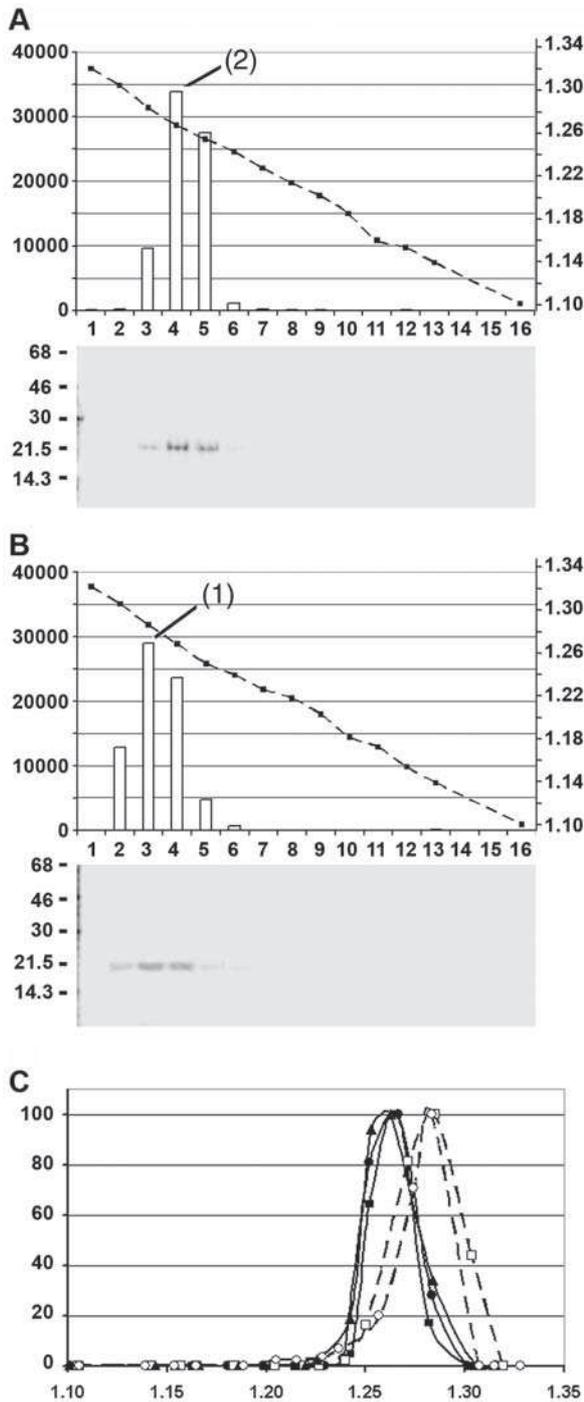
Upon WGA inhibition, 97% of P-core proteins of the P-Mat-C migrated as purified P-Mat-C without cell exposure, exhibiting a peak between 1.283 and 1.252 g/ml (Fig. 5A, peak (2)) with a maximum at 1.267 g/ml. It has been shown that P-Mat-C from transport reaction is attached to the nuclear import receptors Importin  $\alpha$  and  $\beta$  [18]. Thus, one might expect a higher density. However, precipitating with the DAKO Ab capsids that were preincubated with the cytosolic extract showed, by immune blot, that the number of coprecipitated import receptors is rather low (4 molecules per capsid, not shown). This accounts for an undetectable increase of protein mass of <13% only.

Core proteins derived from P-Mat-C following nuclear import peaked between 1.304 and 1.250 g/ml with a maximum at 1.285 g/ml (Fig. 5B, peak (1)). This maximum was identical to the one of the purified RNA-containing P-rC (1.283 g/ml). As 99% of <sup>32</sup>P core proteins were found within these fractions we concluded that all core proteins were assembled into particles without exhibiting significant amounts of dimers or subassemblies. A summary of all capsid sedimentation profiles is given in Fig. 5C. The requirement for an active nuclear import suggested however that the transition from “light” to “heavy” capsids occurred inside the nucleus.

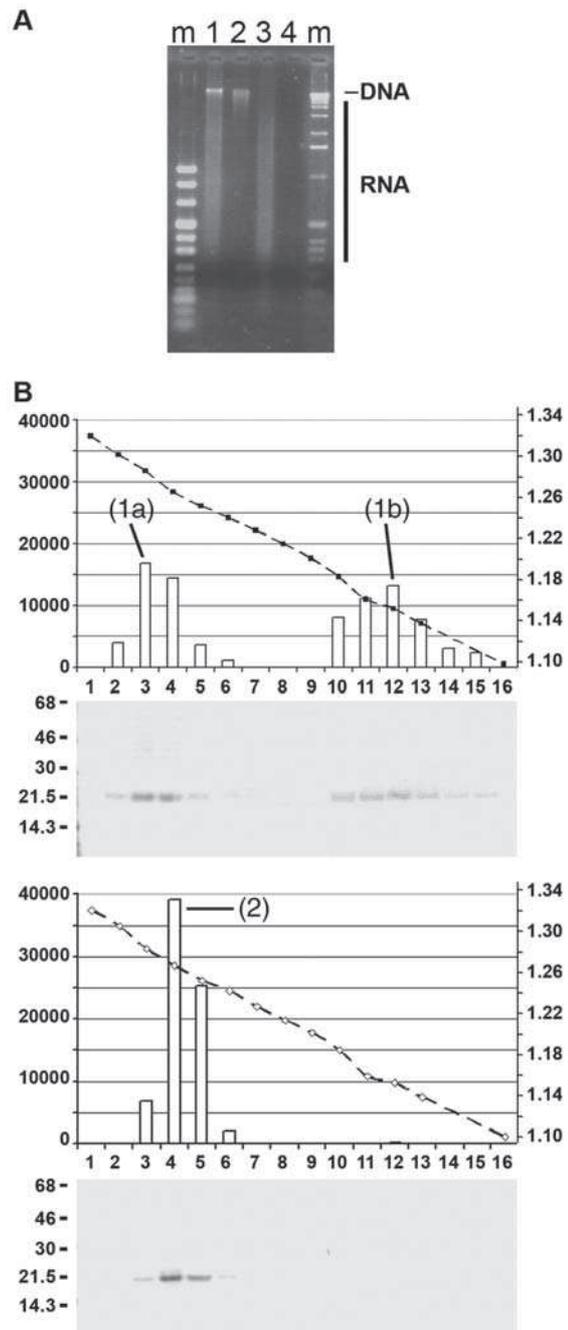
### Effect of RNA on <sup>32</sup>P-core proteins derived from nuclear import

The changed density of the DNA-filled P-Mat-C to the density of RNA-filled *E. coli*-expressed capsids upon nuclear transport implied that the DNA genome in Mat-C was replaced by RNA. Such a replacement likely involves at least partial capsid disintegration, although transitory capsid subassemblies could not be detected in our assay. Reduction of temperature or modification of salt concentration - successfully used in biophysical assays [1] - could not be applied as physiological nuclear import is temperature and salt dependent. We used an alternative approach based on the observation that HBV capsid assembly rate is enhanced by core protein RNA-interaction [36]. We treated digitonin-permeabilized cells by RNase A, which is a small 13.7 kDa protein that is far below the threshold of diffusion into the nucleus (up to 68 kDa [37]). RNA degradation was monitored by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis of the cell lysate (Fig. 6A). Specificity of degradation was shown by control digestions using DNase I (37 kDa). DNase I treatment however causes collapse of the nuclear structure with diffuse distribution of the nuclear pores (not shown).

RNase A-treated cells were used for nuclear import of P-Mat-C. Applying the nuclear lysate onto Nycodenz gradient showed two peaks, one with densities from 1.241 to 1.300 g/ml, with a



**Figure 5. Migration of Mat-C after *in vitro* nuclear import.** **A.** P-Mat-C after transport using  $4 \times 10^6$  Digitonin-permeabilized HuH-7 cells. **B.** as in the upper panels but nuclear import was blocked using WGA. Centrifugation and analysis as in Fig. 2A–C. The figures show that after nuclear transport the capsids migrated with a peak density of 1.285 g/ml (1) identical to the density of P-rC (Fig. 2A). Upon inhibition of transport by WGA, the capsids exhibited a peak at 1.267 g/ml (1), showing no difference with P-Mat-C (Fig. 2B, peak (2)). **C.** Superposition of densities and capsid migration on Nycodenz gradients. The y axis was normalized to depict the strongest signal as 100%. X axis: density in g/ml. Bold lines: P-Mat-C (full triangles), P-Mat-C from RNase A-treated WGA-blocked cells (full squares), P-Mat-C from WGA blocked cells (full circles). Dotted lines: P-Mat-C from cells (open squares), P-rC (open circles). doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g005



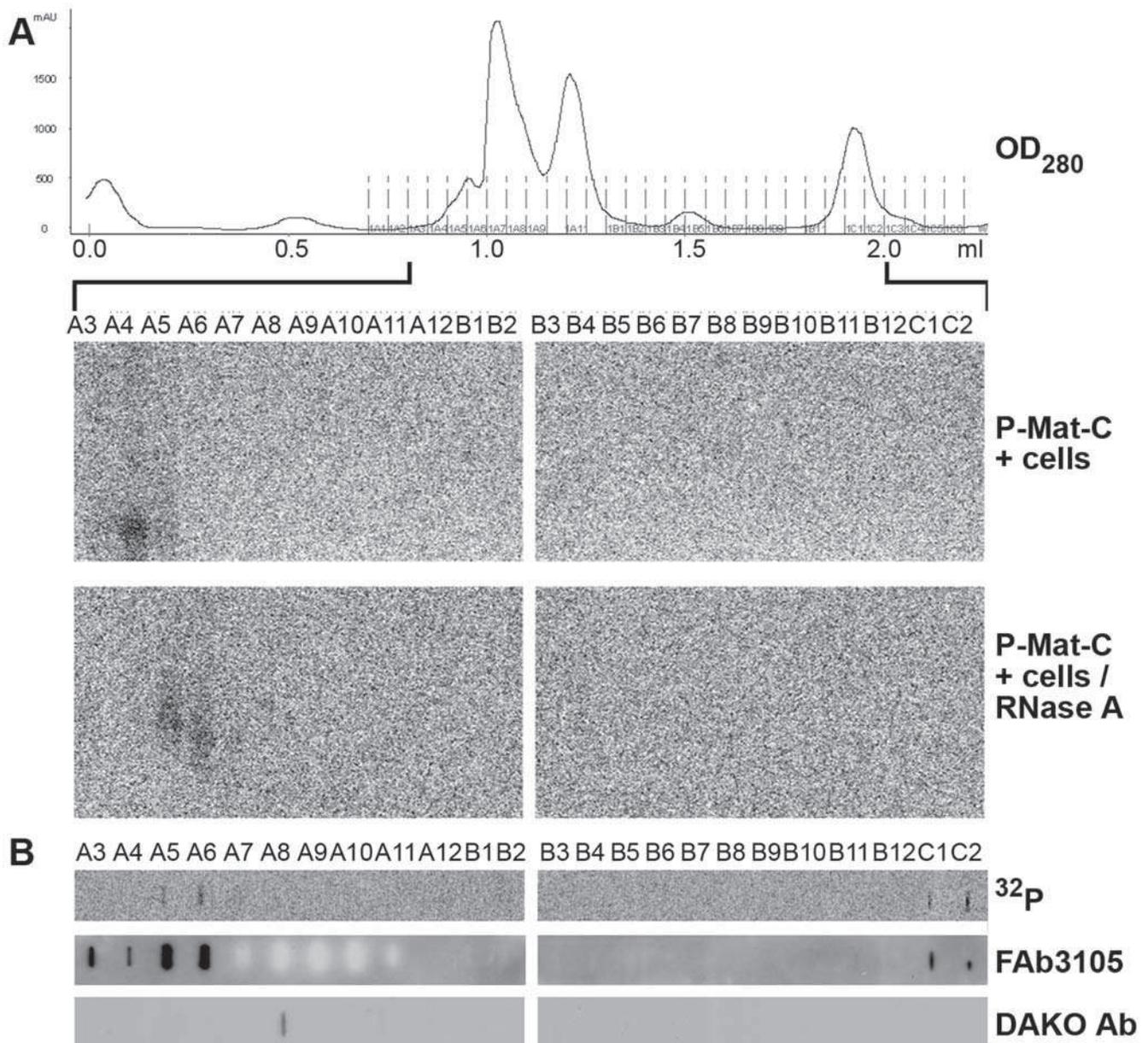
**Figure 6. Effect of RNase A treatment of Digitonin-permeabilized cells on Mat-C migration.** **A.** Control of RNase A treatment by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis. m: marker, 1: cells not treated with nucleases, 2: RNase A-treated cells, 3: DNase I-treated, 4: RNase A and DNase I-treated cells. The Figure shows that RNase A-treatment degraded the cellular RNA completely. **B.** Effect of RNase A-treatment on P-Mat-C migration on Nycodenz gradients. Upper panels: RNase A-treated cells, lower panels: as in the upper panels but upon inhibition of nuclear import by WGA. For legend see Fig. 2A–C. The figures show that RNase A-treatment results in two peaks at 1.285 g/ml (1a) and 1.156 g/ml (1b). The low density peak exhibited the same density as urea disintegrated core proteins (Fig. 1B (3)). The high density peak showed a similar migration as Mat-C after nuclear import with the same peak density but with a broader range. When import was blocked P-Mat-C showed a migration with a peak at 1.266 g/ml (2) as P-Mat-C that was not exposed to cells (Fig. 1B peak (2)). doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g006

maximum at 1.285 g/ml (Fig. 6B, peak (1a)) and a second with densities from 1.141 to 1.185 g/ml, with a maximum at 1.156 g/ml (Fig. 6B, peak (1b)). Quantification showed that 47% of the  $^{32}\text{P}$  core protein migrated in the first peak while 53% were found in the lighter fractions. The heavier peak showed the same peak density of P-Mat-C after nuclear import but with a broader distribution. The lighter one showed the same distribution as urea treated core proteins.

A control was performed by adding WGA during the import reaction. Here, core proteins migrated with the density of P-Mat-C, ranging from 1.242 to 1.282 g/ml (maximum 1.266 g/ml; Fig. 4B, peak (2)), showing that RNase A has no impact on P-Mat-C density prior to nuclear import.

#### Analysis of P-Mat-C using size exclusion chromatography

To confirm the presence of capsids, dimers and capsid subassemblies, we analyzed capsids derived from nuclear import by size exclusion chromatography. Fig. 7A (upper panel) shows the elution profile at  $\text{OD}_{280}$ . The peaks were derived from cellular proteins, as the same profiles were obtained from permeabilized cells without P-Mat-C and from RNase A-treated cells. We analyzed the presence of  $^{32}\text{P}$  capsids by native agarose gel electrophoresis (Fig. 7A, lower panels). In lysate from cells not treated with RNase A,  $^{32}\text{P}$  signals were obtained in fractions A3–5 migrating as integer rC capsids.  $^{32}\text{P}$ -core proteins from RNase A-treated cells, in contrast, were observed in fractions A5–7 and exhibited a migration slower and more diffuse than rC. No core



**Figure 7. Analysis of Mat-C after nuclear import by Superdex 75 columns and native agarose gel electrophoresis. A.** Upper panel:  $\text{OD}_{280}$  of the elution profile. The profile remained unchanged when cells were treated with RNase A. Middle panels: phosphoimager scan after native agarose gel electrophoresis. Lower panel: phosphoimager scan after native agarose gel electrophoresis using fractions from P-Mat-C added to RNase A-treated cells. **B.** Analysis of P-Mat-C from RNase A-treated cells by dot blot. Upper panel: phosphoimager scan, middle panel: detection by FAb3105, lower panel: detection by DAKO Ab.  
doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g007

proteins were observed in fractions B9 and C2 in which dimers and more complex capsid subassemblies were found. It must be considered however, that in native agarose gel electrophoresis unassembled core proteins migrate diffusely. Given that the signals were already at the detection limit, diffuse bands could have caused false negative results.

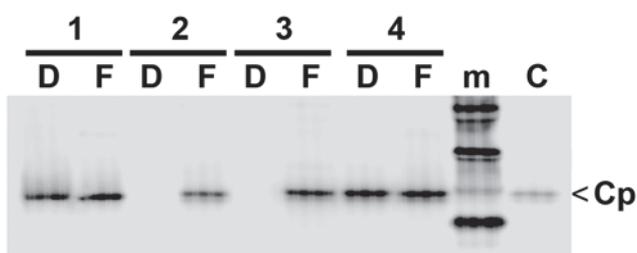
We thus analyzed the fractions derived from the RNase A-treated cells by dot blot (Fig. 7B, upper row), revealing  $^{32}\text{P}$  label in fractions C1/2 by phosphoimaging. Immune reaction of the dot blot by FAb3105 confirmed the presence of core proteins in all the  $^{32}\text{P}$ -positive fractions (Fig. 7B, middle panels). These fractions however were not reactive with DAKO Ab, which showed a faint signal only in fraction A8. As it overlaps with the peaks of cellular proteins, we assume that it results from unspecific interactions, which is in accordance with the absence of any FAb3105 or  $^{32}\text{P}$  label in this fraction.

### Analysis of light and heavy fractions from Nycodenz gradient centrifugation by anti capsid antibodies

To confirm the immune reactivity of the capsids, dimers and other capsid subassemblies, we investigated the light and the heavy fractions derived from Nycodenz gradient centrifugation by immune precipitation. Heavy fractions (2–5) from P-Mat-C exposed to untreated cells (1.250–1.304 g/ml) and heavy fractions 3–5, derived from RNase A-treated cells in which nuclear import was blocked by WGA (1.242 to 1.282 g/ml) served as controls. From the RNase A-treated sample, we analyzed the heavy fractions 2–5 (1.241 to 1.300 g/ml) and the light fractions of the same gradient (1.141–1.185 g/ml). Fig. 8 depicts that FAb3105 precipitated the  $^{32}\text{P}$ -core proteins in all heavy and light fractions from all gradients with similar efficiency. In contrast, DAKO Ab precipitated  $^{32}\text{P}$ -core proteins only from heavy fractions of P-Mat-C from untreated cells and from RNase A-treated cells in which nuclear import was blocked by WGA. No precipitate was found in the heavy and light fractions from RNase A-treated cells in which nuclear import occurred.

### Intranuclear immune fluorescence of capsids and subassemblies generated during capsid disassembly

Gradient analyses and size exclusion chromatography indicated that P-Mat-C is subject to an RNA-dependent intranuclear reassembly process upon nuclear import. For confirmation we



**Figure 8. Immune precipitation of light and heavy capsid fractions from Nycodenz gradients after nuclear import of Mat-C.** Phosphoimager scan after SDS PAGE. D: precipitation by DAKO Ab, F: precipitation by FAb3105, m: marker, C: P-Mat-C. 1: fractions 2–5 of P-Mat-C subjected to nuclear transport (1.250–1.304 g/ml), 2: fractions 2–5 from P-Mat-C added to RNase A-treated cells (1.241 to 1.300 g/ml), 3: light fractions of the same gradient (1.141–1.185 g/ml), 4: fractions 3–5, derived from RNase A-treated cells in which nuclear import was blocked by WGA (1.242 to 1.282 g/ml). m: marker, C: core proteins. The scan shows that FAb3105 precipitated core proteins from light and heavy fractions. DAKO Ab, in contrast, precipitated core proteins from heavy fractions in which capsids peaked, but not from heavy or light fraction of RNase A-treated cells.

doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g008

analyzed the intranuclear appearance of capsids and their subassemblies in individual cells. Due to the lack of a suitable infection system we used Digitonin-permeabilized cells, which are a wide-spread technique for studying nuclear import including HBV capsids [18,19,34]. Digitonin permeabilizes the plasma membrane leaving the nuclear and ER membrane intact. After addition of exogenous cargos and the addition of nuclear import receptors the fate of the cargo can be analyzed using microscopy. We added Mat-C and rabbit reticulocyte lysate, which is common source of transport receptors [34]. The localization of capsids and capsid subassemblies was determined by confocal laser scan microscopy using indirect immune fluorescence. A control stain was performed with propidium iodide (PI) in order to depict cell nuclei.

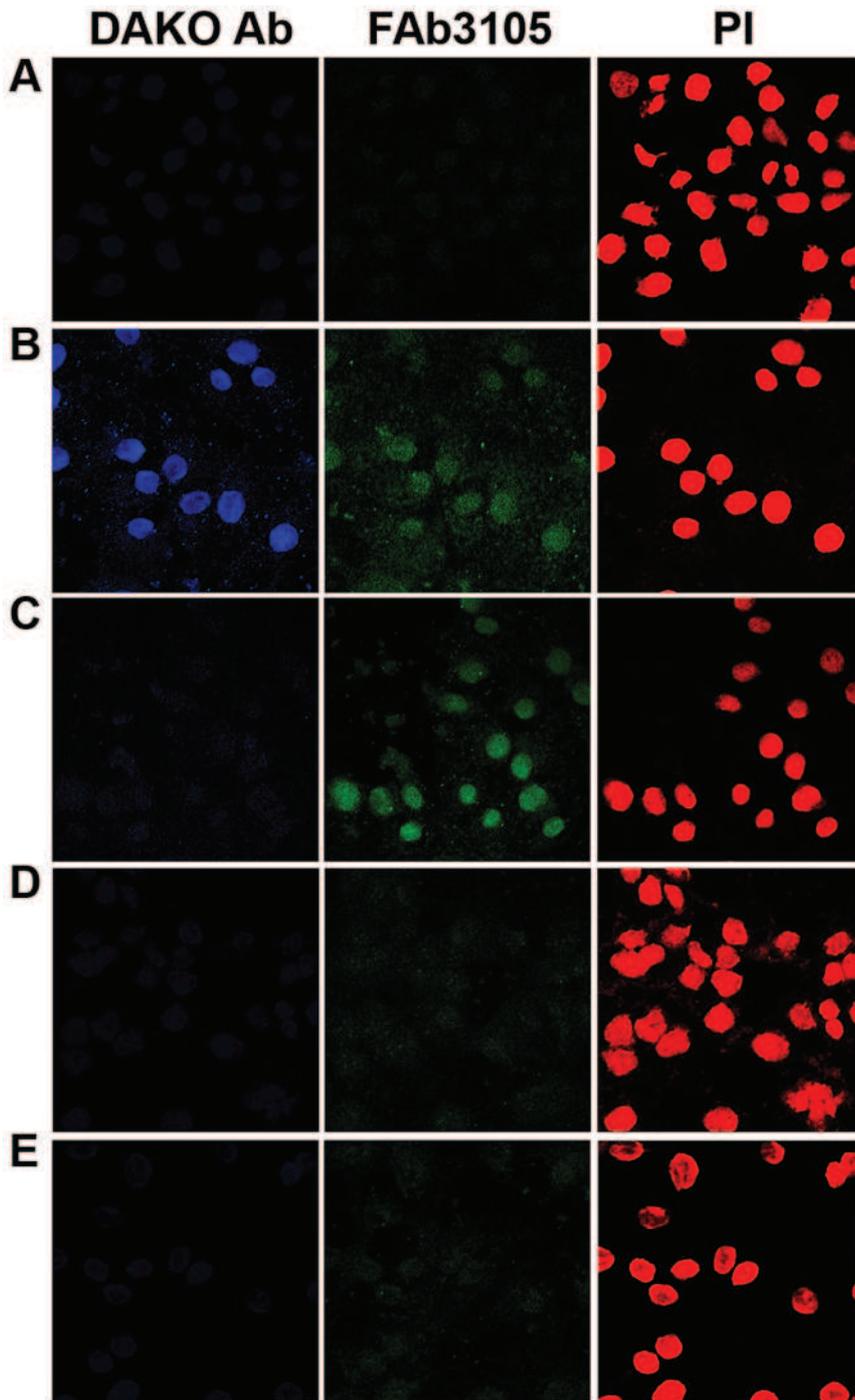
Mat-C were added to permeabilized cells that were either untreated or RNase A-treated. Controls were performed by inhibiting nuclear import using WGA and by using cells to which no capsids were added. Fig. 9 shows that both DAKO Ab and FAb3105 exhibited nuclear fluorescence after addition of Mat-C to permeabilized cells which had not been treated with RNase A. This staining pattern is in accordance with data reported previously in permeabilized and intact cells [17,19]. It is also in agreement with the typical findings in liver histology [38]. The signals of both antibodies were specific, as no fluorescences were observed in cells to which no Mat-C was added, or in which nuclear import was blocked by WGA [18]. In RNase A-treated cells however, no immune fluorescence could be observed using DAKO Ab, but strong signals were obtained using FAb3105. These findings are in accordance with the observation that capsid subassemblies present in the lysates from RNase A-treated cells were not recognized by DAKO Ab but recognized by FAb3105.

FAb3105 staining in RNase A-treated cells was significantly stronger than in cells untreated with RNase A. As both antibodies were added together this observation is in agreement with the competition for binding to capsids.

## Discussion

### Characterization of the anti capsid antibodies

Several studies describe the *in vitro* assembly of viral capsids, but there are only few investigations targeting their disassembly or their intracellular fate. *In vivo* investigations can hardly yield capsids in amounts suitable for biochemical analysis. We thus used two anti capsid antibodies and characterized at first their binding specificity for capsid subassemblies. Both antibodies, raised against entire capsids, are conformation-dependent. We used the well-studied FAb3105 in order to comparatively characterize the DAKO Ab for its reactivity against different capsid subassemblies, obtained by separation on size exclusion columns. Comparison was required, as the calibration of the column with globular proteins (see Material and Methods) showed that the migration of the subassemblies did not correspond to the MW of a single core protein (21.5 kDa) neither to a core protein multimer, so that a form-dependent retardation of the core proteins or unspecific interactions with the matrix were assumed. Both subassemblies (B, C) reacted with the FAb3105 and thus represented dimers or larger multimeric association of core proteins. Based on the known kinetics of HBV capsid assembly, we assume that peak C exhibits core protein dimers and peak B corresponds to a larger assembly state. Our experiments do not allow drawing a conclusion on how many dimers form this complex. According to the literature trimers of the dimers could be present in peak B, as this assembly state was shown to be the only distinct capsid subassembly population apart of dimers and capsids [10]. The DAKO Ab



**Figure 9. Intranuclear detection of capsids and their subassemblies after addition of Mat-C to Digitonin-permeabilized HuH-7 cells.** Indirect immune fluorescence using DAKO Ab (blue) and FAB3105 (green). To indicate the nuclei a co staining by propidium iodide (PI) was performed (red). **A:** negative control without capsids, **B:** addition of Mat-C, **C:** addition of Mat-C but on RNase A-pretreated cells, **D:** as in B but upon inhibition of nuclear import by WGA, **E:** as in C but upon WGA addition. The figure shows that upon nuclear entry in untreated cells both DAKO Ab and FAB3105 reacted with nuclear Mat-C derived capsids. RNase A-treatment in contrast allowed detection of capsid subassemblies generated during assembly-disassembly processes by FAB3105 but not by the DAKO Ab. doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g009

reacted with the capsid subassembly in peak B but poorly with the dimer fraction (C). In fact, the faint signal obtained after blotting of this fraction can be well explained by the limited formation of capsid subassemblies larger than dimers occurring between harvest from the column and blotting. We assume that the DAKO Ab either reacts with epitopes at the interface of dimers or,

alternatively, the larger subassemblies may exhibit conformational differences compared to free dimers, as it was suggested previously [1].

The antibodies competed for their substrate implying that they both attach at, or near, the capsid spikes. This was not surprising, as the loop comprises the immune dominant c/e1 epitope of the

capsids. In summary, the antibody characterizations indicate that DAKO Ab requires core protein assemblies larger than dimers, and that both antibodies exhibited sterical interference. Considering the kinetics of *in vitro* assembly [10], it must be assumed that the DAKO Ab reacts with core protein hexamers and fully assembled capsids.

### Distribution of capsids in density gradients

Anti capsid antibodies do not detect small amounts of core protein monomers. For following the migration of all states of capsids assembly on gradient we depended on sensitive and quantitative detection. We took advantage of capsid phosphorylation, which allows labelling of the core proteins by radioactivity. Phosphorylation of the capsids did not significantly affect capsid structure, as indicated by their unaltered migration on native agarose gel electrophoresis and their unchanged reactivity with the DAKO Ab (not shown). This result was expected as the number of transferred phosphates was low. In addition, data from others have shown that *E. coli*-expressed capsids are identical to liver-expressed capsids within a resolution limit of 30 Å [39]. Recently these data were confirmed with better resolution of 16 Å further showing that no gross structural changes are linked with genome maturation and envelopment [40]. Better resolution with 10 Å however showed that a hydrophobic pocket is present on DNA-containing capsids [41].

As these differences do not affect capsids size, the different densities of Mat-C and rC in Nycodenz gradients suggest that the nucleic acid content caused the difference. This assumption is in accordance with the reported densities of RNA and dsDNA in Nycodenz [32]. Entry of Nycodenz in the capsid lumen was proven by electron microscopy, and could have occurred either via the 1.5 nm-measuring holes in the capsid shell [12], or by capsid breathing.

### Effect of nuclear transport on P-Mat-C sedimentation

For analyses of the intracellular fate of HBV capsids, we investigated the dissociation reaction of HBV capsids using digitonin-permeabilized cells. Addition of P-Mat-C to permeabilized cells caused a change of migration towards the density of RNA containing capsids, but only upon active nuclear import. Although the differences appear to be minor, the superposition of the different gradients allows a clear differentiation of the sedimentation profiles (Fig. 3B).

Strikingly, P-Mat-C showed a single density peak after nuclear import, implying that virtually all capsids were converted, and that no significant subpopulations failed to deliver their encapsidated DNA into the nucleus. This high efficiency in our system suggests that it may reflect the situation in infected individuals where up to 80% of all HBV particles are infectious [20].

### Effect of nuclear RNA on nuclear capsids and capsid subassemblies

Genome release and subsequent replacement of the genome by RNA could hardly be explained by passage through holes in the threefold or quasi-threefold axis of the capsid shell [12]. It can be concluded from structural data on HBV capsids that even dissociation of one core protein hexamer upon capsid breathing would cause holes of only 4.3 – 5.7 nm. Further dissociation of the capsid is probably necessary for genome release. The required incubation period of the transport assay for obtaining detectable nuclear import (15 min) was however much longer than the short concentration-dependent association times of >50 s observed *in vitro* [29].

To observe the disassembly of capsids into subassemblies within nuclei we decelerated reassociation by removal of RNA. Both sedimentation and size exclusion chromatography showed two reaction products. The smaller product corresponded in size to urea treated C183S P-rC by sedimentation, and to peak C of the chromatography, thus likely representing core protein dimers. This assumption was confirmed by their reactivity with FAb3105 and their failure to bind to the DAKO Ab following both methods of separation.

The second product migrated similarly to RNA filled capsids, but exhibited a slightly broader peak. Size chromatography confirmed a similar but nevertheless different migration than capsids, as the peak was shifted by two fractions. Further confirmation was obtained by native agarose gel electrophoresis, after chromatography, showing a diffuse and retarded migration compared to capsids. Such a migration was reported for P-rC upon acid denaturation [18] causing protein aggregation. Immune blotting confirmed the absence of DAKO Ab reactivity arguing against capsid or core protein hexamer formation similar to that observed after acid denaturation. The remaining reactivity with FAb3105 indicated however core protein dimer formation, so that we conclude that the oligomeric reaction product consists of core protein dimers which were assembled in a misfolded manner. In fact, misdirected folding under preservation of intact dimer formation was observed recently upon addition of the HBV capsid assembly inhibitor HAP1 [42].

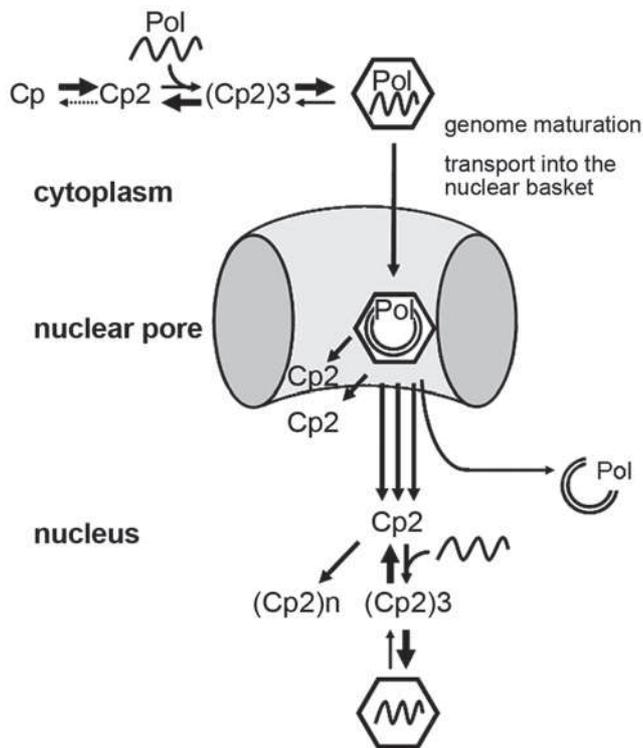
### Localization of assembly/disassembly

To confirm the intranuclear localization of the dissociation and reassociation events, we analyzed capsids and their subassemblies by indirect immune fluorescence in permeabilized cells. In accordance with gradient centrifugation and size exclusion chromatography, we observed that RNase A-treatment generated intranuclear subassemblies, which were reacting with FAb3105 but not with the DAKO Ab. Despite the absence of capsids, the nuclear presence of core protein dimers indicates that RNase A treatment did not interfere with nuclear import of core protein. This supports the conclusion that HBV capsids become imported into the nuclear basket as entire particles [43] but disassemble in the nuclear environment.

In the presence of RNA, in contrast, DAKO Ab and FAb3105-reactive assembly forms of the core protein appeared. Considering the absence of detectable capsid subassemblies between complete capsids and core protein dimers upon *in vitro* disassembly [30], this finding implies that the capsids disintegrate to core protein dimers followed by a rapid RNA-dependent reassociation to capsids, which is misdirected in the absence of RNA. As we used unphosphorylated Mat-C in this assay, these results further exclude that phosphorylation of Mat-C has had a significant impact on formation of capsids and on the capsid subassemblies.

### Conclusions

In the present paper we showed that the dissociation of the HBV capsid follows the *in vitro* association reaction in inverse direction. Our observation that core proteins reassemble to capsids inside the nucleus implies that both compartments - the cytoplasm in which initial capsid formation occurs - and the nucleus, support the assembly reaction. The environment in which disassembly occurs should be consequently before capsid entry into the free karyoplasm. A potential candidate compartment would be the nuclear basket at the karyoplasmic side of the NPC, as it provides the unique proteins of the NPC. We thus hypothesize that the capsids assemble from core proteins via dimer and hexamer formation, as it was proposed recently [10,29] (Fig. 10). The time



**Figure 10. Schematic drawing of localization-dependent assembly and disassembly of HBV capsids.** Cp2: core protein dimers, (Cp2)<sub>3</sub>: defined capsid subassemblies, (Cp2)<sub>n</sub>: core protein polymers, Pol: polymerase, icosahedra: capsid, wavy line: RNA, circles: DNA, ellipses: section of a nuclear pore complex. For details see text. doi:10.1371/journal.ppat.1000563.g010

at which the polymerase-RNA pregenome complex interacts with the capsid subassemblies has to be left open but may enhance the assembly reaction. During genome maturation and transport, the capsid is subject to capsid breathing and remains stable [17,19,43]. Apparently, the basket of the nuclear pore comprises the environment promoting capsid disintegration and genome liberation, which occurs after arrest of the capsid [19,43]. We assume that core protein dimers derived from disassembled capsids are however able to diffuse deeper into the nucleus. When the threshold concentration of nuclear core protein dimers [36] is reached, capsid formation would occur, which is probably enhanced by cellular RNA. As cytoplasmic capsids, they undergo breathing but remain stable, explaining the capsid accumulation observed in liver biopsies.

## Materials and Methods

### Preparation of capsids

Mat-C were prepared and purified from virions of the permanently Hepatitis B virion-expressing hepatoma cell line HepG2.2.15 [44] accordingly to Rabe et al [19]. The capsids of these virions, which were shown to be infectious in chimpanzees [45], contain viral DNA in a relaxed circular form. [44]. *E. coli*-derived capsids (rC) and a mutant in which the C terminal Cys was replaced by Ser (C183S rC) were expressed and prepared as described previously [12]. Electron microscopy did not show any difference between wt capsids and this mutant (not shown). While Mat-C showed strong contamination of proteins of cell culture medium (approx. 30 fold) both *E. coli*-expressed capsid preparations exhibited high purity of >90% with respect to the total

protein: SYPRO staining after SDS PAGE showed a single band of 21.5 kDa when 400 ng were loaded. Disintegration of capsids was achieved by treating C183S rC by 4 M urea for 10 min at 42°C.

### Nuclease activities in the capsid preparation

All capsid preparations were analyzed for nuclease contaminations by incubating 50 ng capsids with <sup>32</sup>P labelled nucleic acids in 50 µl transport buffer for 2 hours at 37°C in siliconized Eppendorf tubes and determining the amount of radioactive TCA precipitable material at 0 and 120 min. Five µl were removed and spotted in duplicates on Whatman 3 M filters, dried, then immersed in a beaker containing 300 ml 5% TCA and 1% PPI for 15 min on ice. Filters were rinsed 3 times 5 minutes with 300 ml 5% TCA 1% PPI, then immersed 1 minute in 70% ethanol, dried and finally counted in a liquid scintillation counter. Radiolabelled DNA was obtained by random priming of a 700 nt PCR product, whereas radiolabelled RNA was obtained by T7 transcription of a linearized plasmid containing a cloned gene downstream a T7 promoter. Radiolabelled DNA and RNA were separated from free unincorporated nucleotide either by spin column or by ethanol precipitation in the presence of ammonium acetate. Single stranded DNA was obtained by 5 min heat denaturation of DNA at 100°C followed by rapid chilling in ice.

### <sup>32</sup>P labelling of capsids

Mat-C was labelled by addition of [<sup>32</sup>P]ATP using the activity of the *in vivo* incorporated cellular protein kinase (P-Mat-C) as described previously [19] and resulted in the transfer of 2–4 P/capsid (T4) which corresponds to 0.008–0.017 P/core protein P. rC and C183S rC were labelled *in vitro* by PKC according to Kann et al. [26] (P-rC and P-C183S). In brief this phosphorylation requires partial disintegration of capsid structure by low salt treatment, followed by phosphorylation. Capsids from the stock solution were at first diluted 1:20 in water and incubated for 15 min at 40°C. 5 µg of the diluted capsids were preincubated in PKC buffer (20 mM HEPES pH 7.4; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.7 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT) together with 3 µg phosphatidylserine for 10 min at 42°C. Then 15 ng protein kinase C (Promega) and 10 µCi [<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) were added (5 µl final volume) and the kinase reaction let to proceed for 30 min at 37°C, after which 0.5 µl PBS 10X was added. In contrast to the previously reported protocol we did not performed an RNase A digest, resulting in a 50fold reduced labelling of about 0.01 P/core protein. After phosphorylation the capsids were reconstituted by adjusting the salt concentration to physiological concentrations. As we have shown previously by EM these capsids exhibit the same structure than original capsids [26].

For separation by native agarose gel electrophoresis, capsids were loaded on the gel using sample buffer without SDS. Electrophoresis was performed on 1% agarose/TAE using a TAE buffer. Blot onto PVDF membranes was performed according to Southern [46]. Quantification of radioactivity was performed by phosphoimaging using either Typhoon 9200 (Amersham Biosciences) or Pharos FX (BioRad). Quantification of immune blots was performed by ECL (PerkinElmer) using ChemiDoc XRS (BioRad).

### Transport assays using digitonin-permeabilized cells

For analysis of capsid integrity during transport on Nycodenz gradients, or on Superdex 75 PC 3.2/30 columns, 4 × 10<sup>6</sup> HuH-7 cells were permeabilized by digitonin as described previously [19], with the modification that the permeabilized cells were harvested after the washing steps prior to the transport reaction. The

transport was performed as described, but using a volume of 100  $\mu$ l comprising 50 ng P-Mat-C and rabbit reticulocyte lysate. If required, 100  $\mu$ g/ml of wheat germ agglutinin (WGA) was added during the washing steps. After incubation, cells were lysed using 1% NP-40/PBS/5 mM MgCl<sub>2</sub> for 1 h at 37°C. After lysis, Triton X-100 was added to a final concentration of 0.2%, followed by 10 min incubation at 37°C and subsequent sonification (6 $\times$ 15 sec). The sample of 200  $\mu$ l was then subjected to analysis. RNase A-treatment was performed for 15 min at 37°C at a final concentration of 4  $\mu$ g/ $\mu$ l.

Transport assays for immune detection, immune staining and subsequent confocal laser scan microscopy were done accordingly to Rabe et al. [19]. Immune staining was performed with the polyclonal rabbit anti capsid antibody (1:200, DAKO Ab) and with the monoclonal mouse anti capsid protein antibody (1:200, Fab3105, Institute of Immunology CO., LTD, Tokyo, Japan). Cy5-labelled anti rabbit antibody (1:400, Dianova) and FITC-labelled anti mouse antibody (1:200, Dianova) served as secondary antibodies. Nuclei were stained with propidium iodide (1:5000).

### Nycodenz gradient centrifugation

Two hundred  $\mu$ l of samples were added onto 3.6 ml continuous Nycodenz/TN gradient (1.11–1.32 g/ml) in a SW60 rotor. Centrifugation was done for 22 h at 10°C and 36,000 rpm. Fractions of 220  $\mu$ l were harvested. Density  $d$  was determined by refractometry ( $\sigma$ ) using the formula:  $d = (\sigma \times 3,287) - 3,383$ . The fractions were vortexed prior to density determination.

### Size-exclusion chromatography

Capsid preparation was centrifuged for 5 min at 17 000 g before being processed through the size-exclusion column. The apparent molecular size of the proteins was analyzed by chromatography on a Superdex 75 PC 3.2/30 column (GE Healthcare), which has a fractionation range of 3 to 70 kDa. The column was equilibrated with transport buffer (20 mM HEPES pH 7.3, 2 mM Magnesium acetate, 110 mM Potassium acetate, 5 mM Sodium acetate, 1 mM EGTA and 1 mM DTT). Proteins (50  $\mu$ l) were eluted with a flow rate of 40  $\mu$ l/min and recorded by continuously monitoring the absorbance at 280 nm. The column was calibrated with the following standard proteins: ovalbumin (43

kDa; 1.13 ml), chymotrypsinogen A (25 kDa; 1.26 ml), RNase A (13.7 kDa; 1.36 ml) and the void volume was determined with dextran blue (>2000 kDa).

### Immune blot and immune precipitations

Quantification of the capsids were done by immune blot accordingly to Rabe et al. (11) using either the polyclonal rabbit anti capsid antibody (1:5000, DAKO Ab) or the monoclonal mouse anti capsid protein antibody (1:2500, Fab3105). As secondary antibody, a horse radish peroxidase anti rabbit or anti mouse antibody (1:10000, Dianova) were used. Detection was performed by ECL (PerkinElmer) using ChemiDoc XRS (BioRad). For immune precipitations 3.5 $\times$ 10<sup>6</sup> sheep anti rabbit- or anti mouse-conjugated biomagnetic beads (Dyna) were added to 22  $\mu$ g DAKO Ab or mouse anti capsid protein antibody (Fab3105) and incubated in 0.1% BSA/PBS overnight at 4°C on a rotating wheel. Afterwards unbound antibodies were removed by washing the beads three times with 0.1% BSA/PBS. The antibody saturated beads were subjected to light and heavy capsid fractions from Nycodenz gradients in the presence of 0.1% BSA and incubated overnight at 37°C on a rotating wheel. The precipitate was washed three times in 0.1% BSA/PBS, one time in 0.1% Nonidet P-40/PBS, transferred into a new cup and again washed three times with PBS. The samples were loaded onto a 4–12% Bis-Tris gradient gel SDS-PAGE (NuPAGE) and transferred onto a PVDF (VWR International) by electro blotting. Precipitated capsid proteins were detected by their intrinsic radioactive signals using phosphoimaging.

### Acknowledgments

We thank Inara Akpjana and Larisa Kovalevska (Riga) for rC expression and purification and Andris Kazaks for construction of the C183S P-rC mutant. We are grateful to Wolfram Gerlich (Giessen) for his critical comments on the manuscript.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CC MC MK. Performed the experiments: BR MD AB MF. Analyzed the data: PP. Contributed reagents/materials/analysis tools: IS PP. Wrote the paper: MK.

### References

- Ceres P, Zlotnick A (2002) Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry* 41: 11525–11531.
- Bothner B, Dong XF, Bibbs L, Johnson JE, Siuzdak G (1998) Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry. *J Biol Chem* 273: 673–676.
- Li Q, Yafal AG, Lee YM, Hogle J, Chow M (1994) Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature. *J Virol* 68: 3965–3970.
- Lewis JK, Bothner B, Smith TJ, Siuzdak G (1998) Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6774–6778.
- Hilmer JK, Zlotnick A, Bothner B (2008) Conformational equilibria and rates of localized motion within hepatitis B virus capsids. *J Mol Biol* 375: 581–594.
- Martin-Fernandez M, Longshaw SV, Kirby I, Santis G, Tobin MJ, et al. (2004) Adenovirus type-5 entry and disassembly followed in living cells by FRET, fluorescence anisotropy, and FLIM. *Biophys J* 87: 1316–1327.
- Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75: 477–486.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A (2000) Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* 20: 4922–4931.
- Shahin V, Hafezi W, Oberleithner H, Ludwig Y, Windoffer B, E, et al. (2006) The genome of HSV-1 translocates through the nuclear pore as a condensed rod-like structure. *J Cell Sci* 119: 23–30.
- Stray SJ, Bourne CR, Punna S, Lewis WG, Finn MG, et al. (2005) A heteroaryldihydropyrimidine activates and can misdirect hepatitis B virus capsid assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8138–8143.
- Zlotnick A, Cheng N, Conway JF, Booy FP, Steven AC, et al. (1996) Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry* 35: 7412–7421.
- Crowther RA, Kiselev NA, Botcher B, Berriman JA, Borisova GP, et al. (1994) Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77: 943–950.
- Nassal M, Rieger A, Steinau O (1992) Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking. *J Mol Biol* 225: 1013–1025.
- Seifer M, Standring DN (1994) A protease-sensitive hinge linking the two domains of the hepatitis B virus core protein is exposed on the viral capsid surface. *J Virol* 68: 5548–5555.
- Summers J, A OC, Millman I (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 4597–4601.
- Bartenschlager R, Schaller H (1988) The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *Embo J* 7: 4185–4192.
- Rabe B, Glebe D, Kann M (2006) Lipid-mediated entry of hepatitis B virus capsids in non-susceptible cells allows highly efficient replication and the analysis of the early infection events. *J Virol* 80: 5465–5473.
- Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 145: 45–55.
- Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A, Kann M (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9849–9854.

20. Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV (2004) Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2129–2134.
21. Bartenschlager R, Schaller H (1992) Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *Embo J* 11: 3413–3420.
22. Gazina EV, Fielding JE, Lin B, Anderson DA (2000) Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J Virol* 74: 4721–4728.
23. Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ (2005) Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 79: 9810–9820.
24. Guidotti LG, Martinez V, Loh YT, Rogler CE, Chisari FV (1994) Hepatitis B virus nucleocapsid particles do not cross the hepatocyte nuclear membrane in transgenic mice. *J Virol* 68: 5469–5475.
25. Birnbaum F, Nassal M (1990) Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol* 64: 3319–3330.
26. Kann M, Gerlich WH (1994) Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol* 68: 7993–8000.
27. Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG (1999) The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* 3: 771–780.
28. Zlotnick A, Cheng N, Stahl SJ, Conway JF, Steven AC, et al. (1997) Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9556–9561.
29. Zlotnick A, Johnson JM, Wingfield PW, Stahl SJ, Endres D (1999) A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry* 38: 14644–14652.
30. Singh S, Zlotnick A (2003) Observed hysteresis of virus capsid disassembly is implicit in kinetic models of assembly. *J Biol Chem* 278: 18249–18255.
31. Hatton T, Zhou S, Standring DN (1992) RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* 66: 5232–5241.
32. Rickwood D, Ford T, Graham J (1982) Nycodenz: a new nonionic iodinated gradient medium. *Anal Biochem* 123: 23–31.
33. Belnap DM, Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, et al. (2003) Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10884–10889.
34. Adam SA, Marr RS, Gerace L (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* 111: 807–816.
35. Finlay DR, Newmeyer DD, Price TM, Forbes DJ (1987) Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J Cell Biol* 104: 189–200.
36. Seifer M, Standring DN (1995) Assembly and antigenicity of hepatitis B virus core particles. *Intervirology* 38: 47–62.
37. Paine PL, Moore LC, Horowitz SB (1975) Nuclear envelope permeability. *Nature* 254: 109–114.
38. Furuta S, Nagata A, Kiyosawa K, Takahashi T, Akahane Y (1975) HBs-Ag, HBe-Ag and virus-like particles in liver tissue. *Gastroenterol Jpn* 10: 208–214.
39. Kenney JM, von Bonsdorff CH, Nassal M, Fuller SD (1995) Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure* 3: 1009–1019.
40. Dryden KA, Wieland SF, Whitten-Bauer C, Gerin JL, Chisari FV, et al. (2006) Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* 22: 843–850.
41. Roseman AM, Berriman JA, Wynne SA, Butler PJ, Crowther RA (2005) A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15821–15826.
42. Bourne CR, Finn MG, Zlotnick A (2006) Global structural changes in hepatitis B virus capsids induced by the assembly effector HAP1. *J Virol* 80: 11055–11061.
43. Pante N, Kann M (2002) Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm. *Mol Biol Cell* 13: 425–434.
44. Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G (1988) Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol* 62: 2836–2844.
45. Acs G, Sells MA, Purcell RH, Price P, Engle R, et al. (1987) Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4641–4644.
46. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503–517.

# Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation

Linda Wittkop,<sup>1†</sup> Alexandra Schwarz,<sup>1†</sup>  
Aurelia Cassany,<sup>2</sup> Stefanie Grün-Bernhard,<sup>1</sup>  
Mildred Delaleau,<sup>2</sup> Birgit Rabe,<sup>1§</sup>  
Christian Cazenave,<sup>2</sup> Wolfram Gerlich,<sup>1</sup>  
Dieter Glebe<sup>1¶</sup> and Michael Kann<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Virology, Justus Liebig University, Frankfurter Strasse 107, D-35392 Giessen, Germany.

<sup>2</sup>UMR-CNRS 5234 Microbiologie Cellulaire et Moleculaire et Pathogenicit  (MCMP), 146 rue Leo Saignat, Universit  Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France.

## Summary

**Capsids of hepatitis B virus and other hepadnaviruses contain a cellular protein kinase, which phosphorylates the capsid protein. Some phosphorylation sites are shown to be essential for distinct steps of viral replication as pregenome packaging or plus strand DNA synthesis. Although different protein kinases have been reported to phosphorylate the capsid protein, varying experimental approaches do not allow direct comparison. Furthermore, the activity of a specific protein kinase has not yet been correlated to steps in the hepadnaviral life cycle. In this study we show that capsids from various sources encapsidate active protein kinase C $\alpha$ , irrespective of hepatitis B virus genotype and host cell. Treatment of a virion expressing cell line with a pseudosubstrate inhibitor showed that inhibition of protein kinase C phosphorylation did not affect genome maturation but resulted in capsid accumulation and inhibited virion release to the medium. Our results imply that different protein kinases have distinct functions within the hepadnaviral life cycle.**

Received 24 February, 2009; revised 13 January, 2010; accepted 20 January, 2010. \*For correspondence. E-mail michael.kann@u-bordeaux2.fr; Tel. (+33) 0 5 57 57 17 60; Fax (+33) 0 5 57 57 17 66. Present addresses: <sup>†</sup>INSERM U897, Centre of Epidemiology and Biostatistics (ISPED), Bordeaux School of Public Health, 146 rue Leo Saignat, Universit  Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France; <sup>§</sup>AiCuris GmbH & Co. KG, Friedrich-Ebert-Str. 475, D-42117 Wuppertal, Germany. <sup>¶</sup>Equal contribution. <sup>¶</sup>Second last author.

## Introduction

Hepatitis B virus (HBV) is an important human pathogen, which is responsible for approximately one million deaths each year. Worldwide an estimated 350 million individuals are chronically infected and potentially develop liver cirrhosis or liver cell carcinoma. There are eight genotypes (A–H; Schaefer, 2007) exhibiting differences in the level of replication and their sensitivity to antiviral treatment (Tillmann, 2007). HBV contains a capsid within an envelope of lipids and three surface proteins. The viral genome, as present in the capsid of the virion, is a partially double stranded relaxed circular DNA (rcDNA) molecule. Capsid envelopment and subsequent egress into the blood stream is accompanied by secretion of excessively produced surface proteins (HBsAg).

Viral replication involves reverse transcription of the RNA pregenome (PG) that becomes encapsidated into the capsid within the cytoplasm. Specificity of encapsidation is mediated by the viral polymerase (Pol) interacting with PG. Maturation of the viral genome, which leads to the rcDNA is a complex process, involves reverse transcription and subsequent plus strand DNA synthesis [reviewed by Kann and Gerlich (2005)]. Noteworthy, Pol-mediated HBV genome maturation occurs only within viral capsids and is a prerequisite for envelopment and viral egress (Gerelsaikhan *et al.*, 1996).

The HBV capsid is formed by a single protein species, termed core protein. The first 140 aa of the core protein are essential for capsid assembly, forming a protein shell with holes of 1.5 nm diameter (Zlotnick *et al.*, 1997). The C-terminal domain from aa 141–183 (or 185 in some genotypes) is flexible. In unphosphorylated capsids expressed in *Escherichia coli*, or in capsids that have not undergone genome maturation the C-terminus is localized inside capsids lumen but it becomes exposed upon phosphorylation or genome maturation (Rabe *et al.*, 2003). This domain contains six potential serine phosphorylation sites (five in genotype H), which are targets for cellular protein kinase(s) (PK). PK activity is found in HBV capsids from different origins (Albin and Robinson, 1980; Gerlich *et al.*, 1982).

Substitutions of the serine residues by alanine or glutamic or aspartic acid, intended to mimic

non-phosphorylated or phosphorylated serines, suggest that phosphorylation regulates PG packaging, plus strand DNA synthesis and capsid stability (Lan *et al.*, 1999; Gazina *et al.*, 2000; Köck *et al.*, 2004; Melegari *et al.*, 2005). However, mutational analyses represent a permanent non-phosphorylated or phosphorylated situation and can not mimic the dynamics of ongoing phosphorylation or dephosphorylation. The latter phenomenon was described for duck hepatitis B virus (DHBV) core proteins (Perlman *et al.*, 2005) which, however, shows a different arrangement of nucleic acid binding and phosphorylation sites.

While phosphorylation is evidently important, the identity of the PK, the extent of phosphorylation and the time at which phosphorylation occurs, remain ambiguous. Likewise, the use of different techniques and source materials make a comparison of the results difficult.

For instance, a 46 kDa ribosome-associated PK was identified in capsids (Kau and Ting, 1998) while SR protein-specific PK 2 (SRPK) was shown to phosphorylate a Glutathion-S-Transferase (GST) core fusion protein (Daub *et al.*, 2002), which cannot assemble to particles (Koletzki *et al.*, 1999). Some authors used purified PKs (Enomoto *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Okabe *et al.*, 2006), others HuH-7 cell lysate (Kau and Ting, 1998; Daub *et al.*, 2002) to phosphorylate either *E. coli*-expressed unphosphorylated capsids (Kau and Ting, 1998; Enomoto *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Okabe *et al.*, 2006) or HuH-7 cell line-expressed substrates, which had been already subject to phosphorylation upon expression (Daub *et al.*, 2002).

It should be considered that: (i) phosphorylation with a purified PK only reflects the potential activity of the PK on the target protein but competing PKs may dominate the reaction *in vivo*, (ii) Co-purification of PK from a lysate in the presence of ATP (Daub *et al.*, 2002) likely reflects suboptimal conditions as the contact time between PK and target site is short, (iii) identification by PK sensitivity to chemical inhibitors, as applied in 46 kDa ribosome-associated PK identification (Kau and Ting, 1998) or protein kinase A (Kang *et al.*, 2006), has concentration-dependent side-effects on other PKs and (iv) as phosphorylation and genome maturation are linked, the progress of genome maturation may affect the PK activity. Consequently, studies using virus-derived capsids, which contain the mature HBV genome or intracellular capsids with immature genomes or capsids derived from the nucleus being devoid of the genome may lead to conflicting results and cannot directly be compared.

We focused on protein kinase C (PKC) as this PK was identified by monoclonal antibodies specific for the isoforms  $\alpha/\beta/\gamma$  in capsids derived from human liver (Kann and Gerlich, 1994), a result confirmed by others (Duclos Vallee *et al.*, 1998). These capsids are mainly derived

from cell nuclei and are devoid of the viral genome. In order to exclude that PKC encapsidation is limited to this non-viable capsid type, we first characterized the PK in virion-derived capsids from different sources. In view of the limited specificity of most PK inhibitors, we used the cell-permeable myristylated pseudosubstrate 19–27, which binds specifically to the catalytic centre of PKC $\alpha/\beta$ . We restricted the application to low concentrations in order to avoid unspecific inhibition of other PKs.

We studied inhibitions in virion-derived capsids from different genotypes as well as in virion-derived and intracellular capsids from the HBV-expressing cell line HepG2.2.15. Observing that the same PKC isoform was present in all capsids we analysed the effect on the cellular secretion pathway used by HBV. The pseudosubstrate did neither influence Pol activity nor genome maturation nor did it affect the ratio or the amount of PKC phosphorylation on the viral life cycle in HepG2.2.15 cells.

## Results

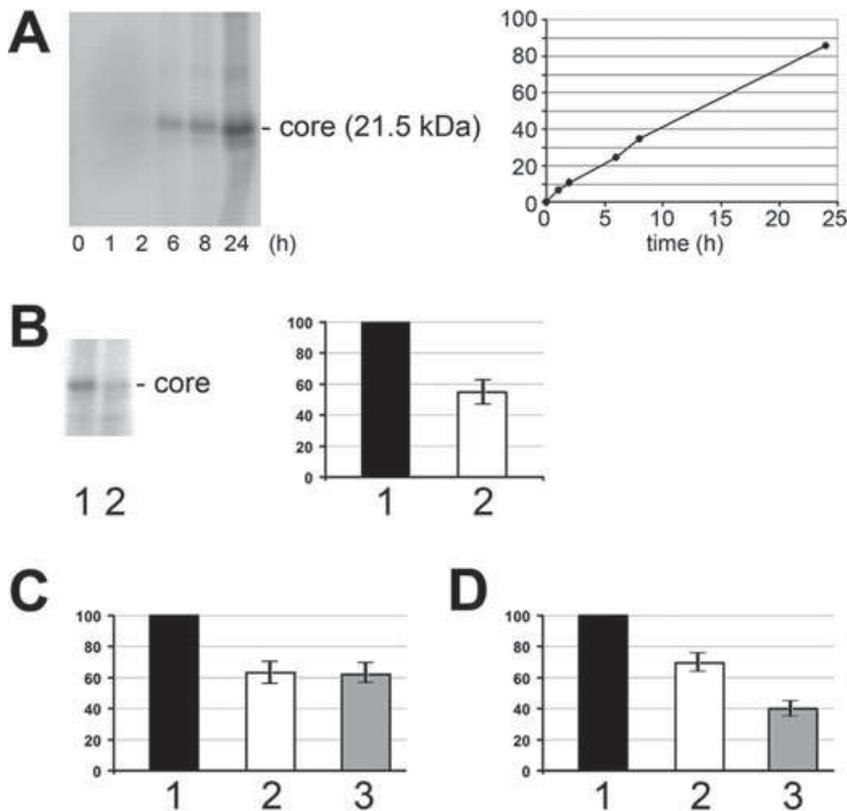
### *Kinetics of endogenous capsid phosphorylation*

First we evaluated the kinetics of phosphorylation using capsid derived from a serum containing HBV genotype C. Figure 1A depicts a linear, non-saturated kinetic throughout the entire observation period. Comparison of the incorporated radioactive phosphates with *in vitro* PKC-phosphorylated *E. coli*-derived capsids revealed that ~0.5 phosphates per core protein became transferred within 24 h. Capsid phosphorylation was done after immune precipitation of virions with an anti-HBs antibody following detergent treatment to release the capsids. This showed that the PK was HBV-associated (data not shown).

### *Inhibition of capsid phosphorylation by PKC pseudosubstrate*

The linear non-saturated kinetic allowed the quantification of the capsid-associated PK activity in the presence of the inhibitor. Because of the molecular weight (MW) of the pseudosubstrate (1256 Da) we preincubated the capsids with the inhibitor for 1 h before ATP was added. Figure 1B shows that addition of  $1 \times IC_{50}$  reduced PK activity to 55%. Because quantification showed a standard deviation of ~7% the observed inhibition was considered to be significant and in accordance with the predicted 50% inhibition at this inhibitor concentration.

Although highly conserved, the C-terminus of the core protein shows heterogeneities. To study the potential impact of the HBV genotype we analysed core protein phosphorylation using capsids of genotype D. These capsids were derived from virions, which have been secreted from the stably HBV transfected cell line



**Fig. 1.** Endogenous capsid phosphorylation. A. Kinetic with genotype C capsids. Left panel: phosphoimager scan after SDS-PAGE. Right panel: quantitative analysis in %. The radioactivity of the 21.5 kDa core band was determined as phosphor stimulated luminescence (PSL) subtracted by the background.

B–D. Inhibition of the endogenous protein kinase reaction in capsids of different origin. Quantifications are depicted in %, relative to the untreated control. Space bars indicate one standard deviation. 1: untreated control. 2 and 3: inhibitor-treated samples.

B. Capsids from serum-derived virions (genotype C) in the presence of  $1 \times IC_{50}$  and 1 h preincubation. Left panel: phosphoimager scan after SDS-PAGE. Right panel: quantification.

C. Virion-derived capsids from HepG2.2.15 cells (genotype D). 2: Inhibition with  $1 \times IC_{50}$ , 3: Inhibition with  $10 \times IC_{50}$ . Preincubations were done for 1 h.

D. Capsids from serum-derived virions (genotype D) in the presence of  $10 \times IC_{50}$ . 2: preincubation for 1 h. 3: preincubation for 3 h. The figures showed that PKC $\alpha/\beta$  is present in all capsid preparations, irrespectively to HBV genotype and host cell.

HepG2.2.15. This cell line is known to produce HBV that is able to infect chimpanzees (Wieland *et al.*, 2004). Figure 1C shows that addition of the pseudosubstrate inhibitor caused an inhibition to 65% compared with capsids from untreated control cells. This result indicates that neither the genotype nor host cell affects the nature of the encapsidated PK. Moreover, as serum-derived and cell line-derived capsids were purified by different protocols – serum-derived capsids involved a CsCl flotation, while HepG2.2.15 cell-derived capsids were purified by sucrose gradients – we conclude that the PK was not sedimenting with the same velocity as the capsids but was physically linked.

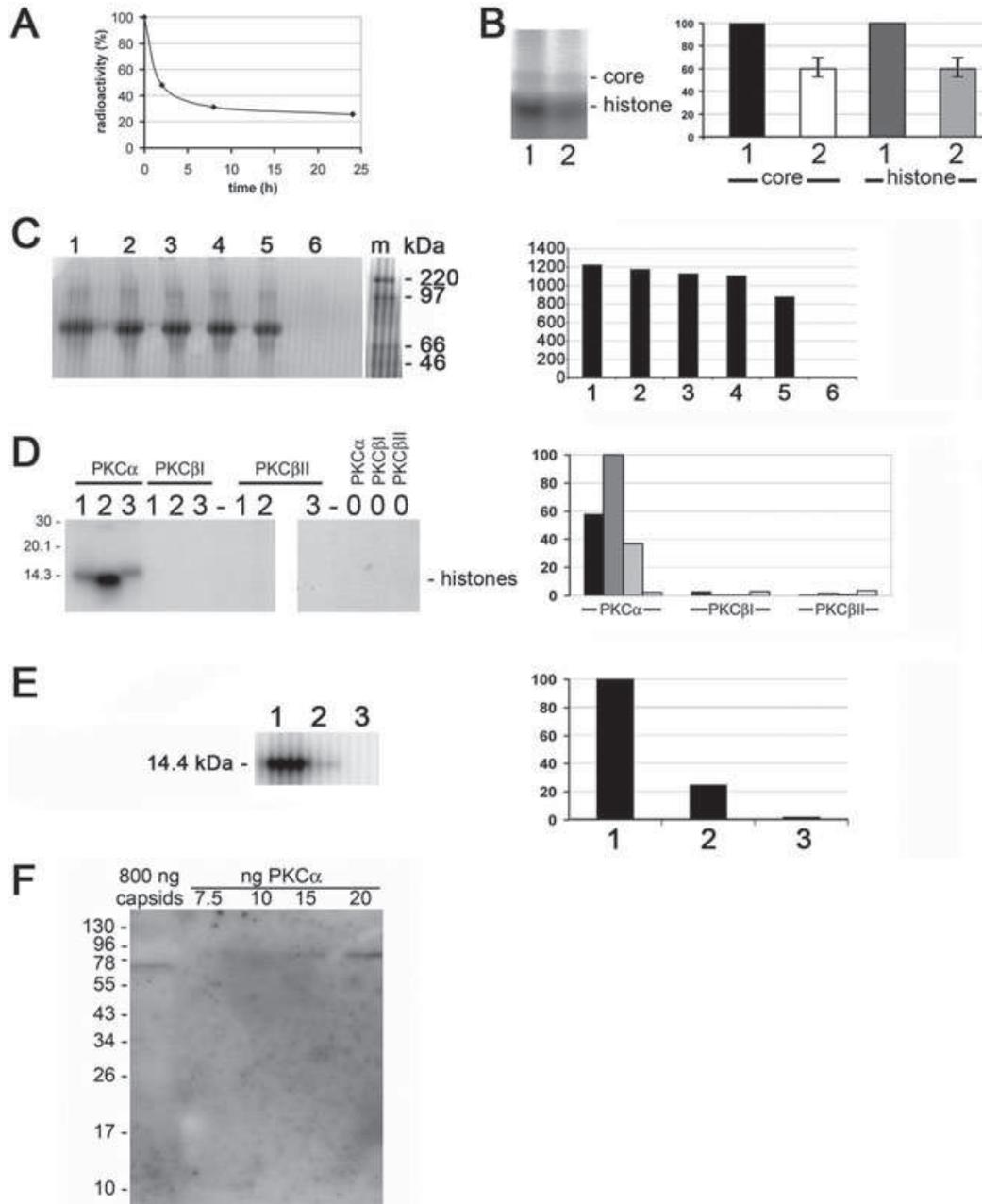
We next evaluated the effect of higher inhibitor concentrations, anticipating further reduction of the capsid-associated PK activity. We added  $10 \times IC_{50}$  to the HepG2.2.15 cell line-derived capsids and monitored a non-significant additional inhibition to 65% (Fig. 1C). A comparable reduction to 70% was observed when capsids of the same genotype D but from serum were used (Fig. 1D). However, extending inhibitor preincubation three times prior to the onset of the phosphorylation reduced the PK activity to 40% (Fig. 1D).

The missing impact of an increased inhibitor concentration indicated that the inhibitor has not had unlimited access to the PK, i.e. that the accessibility of the PK for the pseudosubstrate was restricting inhibition. Such

limited access can be caused by reversible or irreversible capsid disintegration. To obtain evidence we labelled the genome of virion-derived capsids, expressed in HepG2.2.15 cells, by addition of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP using the endogenous polymerase activity. As the HBV polymerase activity depends on its encapsidation into the capsids, labelling requires integer capsids. For monitoring access to capsids lumen, we added DNase I and analysed the amount of protected radiolabelled HBV genomes by phosphoimaging after agarose gel electrophoresis. The kinetic showed that ~50% of the genomes were degraded after 2 h (Fig. 2A). At the latest time point, after 24 h, ~25% of the genomes remained protected. DNase I has a MW of 37 kDa, which hardly allows diffusion through the pores of the capsid. We thus assumed that the capsids have undergone at least partial disintegration.

Further experimental evidence was obtained by the addition of an equimolar mixture of histone H1, H2A, H2B, H3 and H4 to the phosphorylation reaction of serum-derived HBV capsids (genotype C). Histones were selected as they contain multiple phosphorylation sites, which are similar to the C-terminus of the core protein (Karpenko *et al.*, 1997; Manigold *et al.*, 2003). In a parallel experiment phosphorylation was inhibited by addition of the pseudosubstrate ( $1 \times IC_{50}$ , 1 h preincubation).

In both inhibitor-treated and untreated control, core protein and histone phosphorylation were determined by



**Fig. 2.** Accessibility of capsid lumen to exogenous macromolecules.

A. The HBV genomes of virion-derived capsids from HepG2.2.15 supernatant (genotype D) were labelled by the endogenous Pol and incubated with DNase I. The graph shows the DNase I-protected radioactive genomes.

B. Capsids from serum-derived virions (genotype C) were phosphorylated by their endogenous protein kinase activity. Phosphorylation was performed in the presence of histones either in the absence (1) or the presence (2) of the inhibitor ( $1 \times IC_{50}$ ). Left panel: phosphoimager scan after SDS-PAGE, right panel: quantification in % relative to the untreated control.

C. Activity test of PKs on *E. coli* lysate. Left panel: phosphoimager scan 1: PKCα, 2: PKCβI, 3: PKCβII, 4: PKCα/β/γ, 5: PKA, 6: no PK, m: marker. The MW is given on the right. Right panel: quantification in PSL. The figure shows that all PKs exhibit a similar activity on an *E. coli* protein with ~70 kDa.

D. *In vitro* phosphorylation of different histones by the different PKC isoforms. Left panel: phosphoimager scan after SDS-PAGE. 0: no histones, 1: histone H2A, 2: histone H2B, 3: histone H3. The protein kinases are depicted on top. Right panel: quantification of the phosphorylation in %. The numbering of the samples corresponds to (A); the PKC isoforms are given below the panel.

E. Inhibition of PKCα by the inhibitor. Left panel: phosphoimager scan. Right panel: quantification in % after BG subtraction. 1: no inhibitor, 2:  $1 \times IC_{50}$ , 3:  $10 \times IC_{50}$ .

F. Immune blot capsids derived from the supernatant of Hep2.2.1.5 cells using anti-PKCα antibody. The signal derived from 800 ng of capsids was compared with a standard dilution series of purified PKC. The amount of PKC standard is given on top to the panel. The MW of the standard is depicted on the left. The figure shows that a PKC of ~75 kDa is encapsidated in the capsids.

phosphoimaging (Fig. 2B). The inhibitor reduced core protein phosphorylation to ~60% and phosphorylation of the histones was reduced to the same extent. This finding implicates that either low amounts of capsid-associated PK escaped the capsid or that – more likely – the smaller histones have entered capsids lumen.

The phosphoprotein at 14.3 kDa could represent histones H2A, H2B or H3. We thus asked which of the different histone proteins was phosphorylated by different PKC isoforms. We used recombinant PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I and PKC $\beta$ II, which exhibited similar activities on a lysate of *E. coli* using [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (Fig. 2C). *E. coli* lysate was chosen as *E. coli* does not express PKs. Accordingly, incubation of the lysate with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP but in the absence of the exogenous PK did not show any radioactive phosphoprotein (Fig. 2C). For testing the activity of the individual PKs on histones we performed a phosphorylation reaction with each PK and histones H2A, H2B and H3 separately. Figure 2D shows that no radioactive product was found in the absence of histones. Significant activity was only found for PKC $\alpha$ , which exhibited a maximal phosphorylation on histone H2B.

For confirmation that recombinant PKC $\alpha$  exhibits a similar inhibition by the pseudosubstrate we incubated histone H2A with PKC $\alpha$  in the presence of  $1 \times IC_{50}$  and  $10 \times IC_{50}$ . Figure 2E shows that  $1 \times IC_{50}$  suppressed phosphorylation to 27% and that  $10 \times IC_{50}$  reduced PKC $\alpha$  activity to 5% of the untreated control. This inhibition was higher than the inhibition of the capsid-associated PK, which is in accordance with the hypothesis of a limited inhibitor access to the encapsidated PK.

For final proof that PKC $\alpha$  was encapsidated we subjected capsids from the supernatant of HepG2.2.15 cells to Western blotting using a monoclonal anti-PKC $\alpha$  antibody. For semi-quantification we added a dilution series of purified PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$  extract to the gel. The extract, which was derived from rat brain, contains significant amounts of PKC $\alpha$  (Wetsel *et al.*, 1992). Figure 2F shows that the antibody reacted with a band of ~75 kDa, which corresponds to the MW of 76 kDa. It migrates, however, slightly smaller than the control PKCs, which exhibited an apparent MW of ~80 kDa (Wetsel *et al.*, 1992).

#### Intracellular effects of PKC inhibition

The pseudosubstrate was myristylated and thus cell-permeable (Eichholtz *et al.*, 1993). This allowed the evaluation of PKC $\alpha/\beta$  inhibition on the viral life cycle using the HepG2.2.15 cells. To exclude effects of cell division, known to reduce intracellular capsid concentration, both untreated control and inhibitor-treated cells were incubated in the absence of fetal calf serum (FCS), which restricted the observation period to 5 days.

The effect of the inhibitor treatment by  $1 \times IC_{50}$  was evaluated by measuring the transfer of radioactive phosphate to equal amounts of intracellular capsids. In order to allow comparison with the data obtained from virus-derived capsids we performed an immune precipitation with a capsid-specific antibody (Rabe *et al.*, 2009) excluding phosphorylation analysis of unassembled core protein. As depicted in Fig. 3A capsid phosphorylation by the exogenous radioactive ATP was reduced to 45% in the pseudosubstrate-treated cells. This finding shows that the inhibitor successfully entered the cells and also suggests that intracellular capsids contained the same PK as virion-derived capsids.

For further characterization of the encapsidated PK, we incubated the same amounts of intracellular capsids from untreated and inhibitor-treated cells with the different histones separately (Fig. 3B). Both capsid and histone phosphorylation were reduced to ~50%. Significant histone phosphorylation was only observed for histone H2B as it was seen for recombinant PKC $\alpha$ .

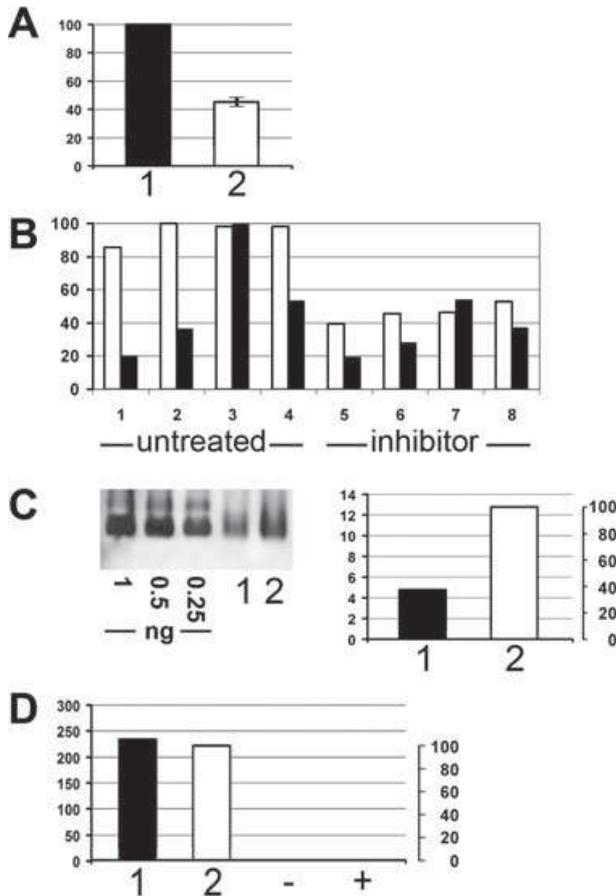
Inhibition of phosphorylation may have altered capsid assembly, stability or core protein synthesis. We thus quantified the number of intracellular capsids in untreated and inhibitor-treated cells by Western blot after native agarose gel electrophoresis. This technique allows the selective detection of assembled capsids because of their migration and the specificity of the antibody (Kann *et al.*, 1999). Figure 3C shows that inhibitor treatment caused a 2.7-fold accumulation. Based on the number of cells we calculated that in average 930 capsids were found per cell in contrast to 340 in the untreated control.

Antibodies against core antigen are generally directed against conformational epitopes and require high quantities of protein for detection after SDS-PAGE. To circumvent this obstacle that hardly allows quantification of total core protein we analysed the abundance of HBeAg in the cell culture supernatant. Core protein and HBeAg are translated from two co-linear, supergenomic mRNAs, which are transcribed under the control of the same (preC/C) promoter. In contrast to the core protein, the slightly longer HBeAg precursor contains an amino terminal signal peptide leading to the secretion of HBeAg after proteolytic cleavage.

Figure 3D shows very similar, high levels of HBeAg expression in untreated and pseudosubstrate-treated cells implying that neither core nor PG transcription was impaired.

#### Effects on virion and HBsAg secretion

To discriminate whether the increased levels of intracellular capsids after PKC inhibition were caused by enhanced stability or by a block of envelopment, we investigated the effect of PKC $\alpha/\beta$  inhibition on virus



**Fig. 3.** Intracellular effects of PKC inhibition on the HBV life cycle. 1: capsids from untreated, 2: from inhibitor-treated HepG2.2.15 cells.

**A.** Inhibition of the endogenous protein kinase in identical amounts of intracellular capsids. Quantifications are depicted in %, relative to the untreated control. Space bars indicate one standard deviation. The capsids were immune precipitated prior to the gel run.

**B.** Phosphorylation of intracellular capsids and different exogenous histones in the presence or absence of the inhibitor ( $1 \times IC_{50}$ ). The graph depicts the quantification after SDS-PAGE by phosphoimaging. Incorporation of  $^{32}P$  into the core protein (white columns) and the histones (black columns) is shown in % relative to the untreated control. 1–4: phosphorylation without inhibitor, 5–8 in the presence of the inhibitor. 1 and 5: no histones, 2 and 6: histone H2A, 3 and 7: histone H2B, 4 and 8: histone H3.

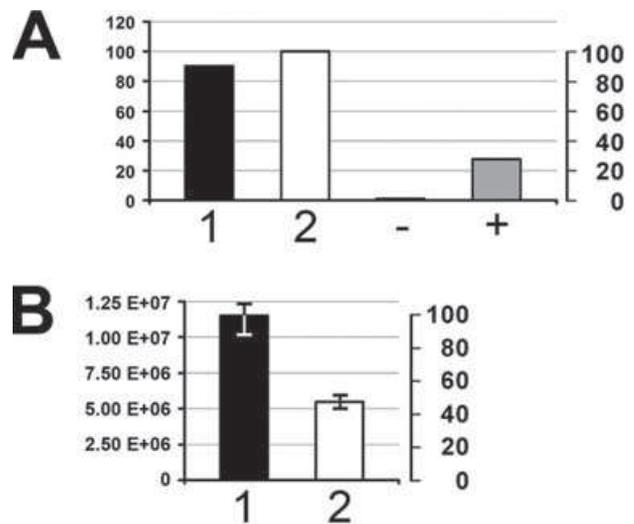
**C.** Amplification of intracellular capsids upon inhibitor treatment. Left panel: immune blot of intracellular capsids after native agarose gel electrophoresis. The left three lanes show a standard dilution series of *E. coli*-expressed capsids. Right panel: total amount of capsids per  $\sim 1.6 \times 10^8$  cells in ng (left scale) and in % (right scale).

**D.** Secretion of HBeAg. The left numbers give the signal/cut-off ratios (S/CO) in the samples after 5 days; the right scale depicts the values in %. 1 (black column): untreated cells. 2 (white column): inhibitor-treated cells. -: negative control, +: positive control. The negative control shows S/CO of 0.12, the positive control 2.56 S/CO.

secretion. Because vesicle shuttling strongly depends on phosphorylation by various PKs (Pelkmans *et al.*, 2005) we analysed the effect on surface protein secretion in parallel. Figure 4A shows that HBsAg secretion was

essentially unaltered, whereas release of HBV into the medium was significantly inhibited to 48% by the PKC inhibitor (Fig. 4B). Based on the cell number, secretion decreased from 143 virions per cell to 69 within the 5 day observation period (Table 1).

There are reports on the secretion of naked capsid, which are devoid of surface proteins. This fraction was reported to be minor in transiently transfected human hepatoma cell line HuH-7 (Schormann *et al.*, 2006) but higher in HepAD38 cells (Bremer *et al.*, 2009). Inhibitor treatment may have changed the proportion between naked capsids and enveloped virus. We thus precipitated



**Fig. 4.** Effects of inhibitor treatment on secretion of HBsAg and virions. Analysis of 1: untreated cells. 2: inhibitor-treated cells after 5 days. -: negative control, +: positive control.

**A.** Secretion of HBsAg. The numbers left give the signal/noise ratios (S/N) in the samples, the right scale shows the results in %.

**B.** Virions in the supernatant per sample. Left: medians, the bars indicate the range. Right: % secretion. While the HBsAg secretion was not affected, the inhibitor treatment of cells reduced the secretion from 143 to 63 virions per cell.

**Table 1.** Effect of PKC pseudosubstrate 19–27 on different hepadnaviral parameters.

Sample	Untreated	Pseudosubstrate inhibited
<b>Intracellular</b>		
Capsids/cell	340	930
PK activity/capsid (%)	100	45
HBV DNA/cell	292 <sup>a</sup>	254 <sup>a</sup>
HBV DNA/capsid	0.85 <sup>a</sup> /0.89 <sup>b</sup>	0.27 <sup>a</sup> /0.35 <sup>b</sup>
cccDNA/cell	2.2 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>
<b>Extracellular</b>		
Secreted virions/cell/5 days	143	69
PK activity/capsid (%)	100	65
HBsAg secretion/5 days (S/N)	90	100
HBeAg secretion/5 days (S/CO)	234	222

a. PCR.

b. Southern blot.

**Table 2.** Immune precipitation and genome quantification of the supernatants from untreated and inhibitor-treated HepG2.2.15 cells.

	Untreated		Inhibitor	
	Supernatant	Precipitated <sup>a</sup>	Supernatant	Precipitated <sup>a</sup>
Anti-capsid	38%	62%	33%	67%
Anti-HBs	42%	58%	45%	55%

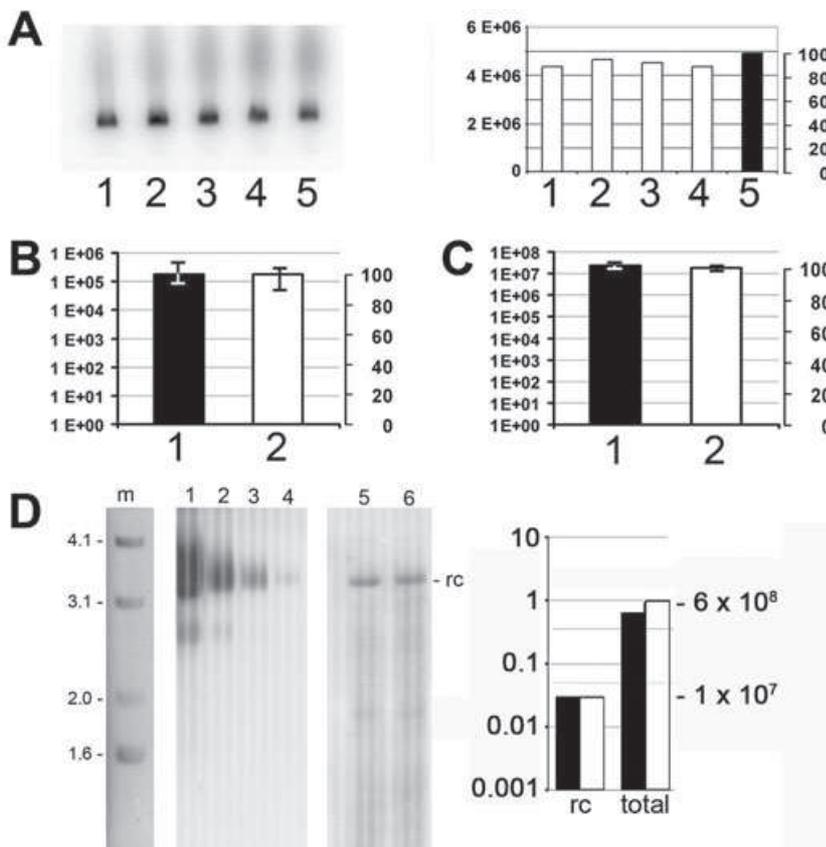
a. Derived from the number of genomes detected in the supernatant.

the supernatant of untreated and inhibitor-treated HepG2.2.15 cells by immune precipitations using anti-HBs and anti-capsid antibodies. We quantified the HBV genomes in the supernatant of the precipitations as in our hands PCRs on precipitated virus give imprecise results. We subjected the same amount of genome equivalents to the precipitations in order to prevent differences in the precipitations because of a changed stoichiometry of antibodies and virus/capsids. Table 2 shows that a significant number of genomes could be precipitated by the anti-capsid antibody, indicating a significant proportion of non- or partially encapsidated virus. This observation is similar to recent findings on HepAD38 cells (Bremer *et al.*, 2009).

However the fraction of non- or partially enveloped viruses did not change significantly upon inhibitor treatment (62% untreated cells, 67% inhibitor treated cells). When using the anti-HBs antibody 58% of the genomes from untreated cells became precipitated. A similar amount of genomes became precipitated (55%) using the supernatant of inhibitor-treated cells, again being in accordance with HepAD38 cells.

#### Effects on genome maturation

**Endogenous polymerase activity.** Phosphoserine 170 is essential for second strand DNA synthesis, and viral DNA synthesis is necessary for capsid envelopment. Inhibition of phosphorylation at Ser 170 may have thus suppressed virus secretion indirectly by inhibiting the polymerase activity. To exclude an effect of the pseudosubstrate on the viral polymerase we first evaluated the polymerase activity of intracellular HepG2.2.15 cell-derived capsids that comprise mostly immature genomes. Treatment with the reverse transcriptase inhibitor Foscarnet or an inhibitor of second strand DNA synthesis (Actinomycin D) (Offensperger *et al.*, 1988) reduced the endogenous Pol

**Fig. 5.** Effects of the inhibitor on genome maturation in HepG2.2.15 cells.

**A.** Endogenous polymerase activity in intracellular capsids from untreated HepG2.2.15 cells. Left panel: phosphoimager scan after native agarose gel electrophoresis. Right panel: quantification in PSL (left scale) and in % (right scale). Capsids were preincubated for 1: 3 h  $10 \times IC_{50}$ , 2: 1 h  $10 \times IC_{50}$ , 3: 3 h  $1 \times IC_{50}$ , 4: 1 h  $1 \times IC_{50}$ , 5: untreated control.

**B.** Quantification of cccDNA in 1: untreated, 2: inhibitor-treated cells. The graph shows the medians; the bars indicate the range. The left scale show the absolute numbers of genomes, the right scale the quantification in %. The detection limit was  $10^2$  copies for cccDNA; no signal obtained for  $10^5$  copies of rcDNA.

**C.** Total intracellular HBV DNA. For legend see (B).

**D.** Southern hybridization of intracellular HBV genomes upon inhibitor treatment of HepG2.2.15 cells. Left panel: m: marker, 1–4: plasmid standard representing  $6.7 \times 10^9$ ,  $6.7 \times 10^8$ ,  $6.7 \times 10^7$  and  $6.7 \times 10^6$  copies respectively. 5–6: DNA of intracellular capsids from HepG2.2.15 cells. 5: untreated cells, 6: 5 days  $1 \times IC_{50}$  treated cells. Right panel: quantification after phosphoimager scan. The numbers on the left give the copy numbers per capsid. The right scale shows the absolute data from  $6 \times 10^8$  capsids. Black columns: untreated cells, white columns: 5 days  $1 \times IC_{50}$ . The graphs show that neither genome maturation, which leads to rcDNA formation, nor the amount of replication intermediates were affected by the inhibitor.

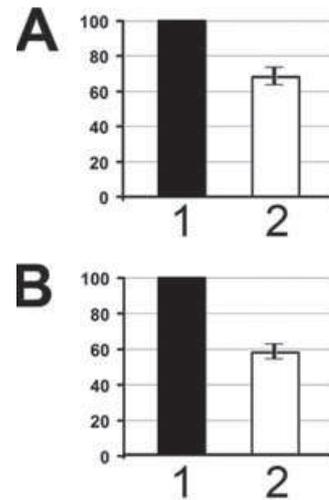
activity to 6% and 41% respectively (data not shown). This implies that in most capsids genome maturation is at an early stage and that Pol and its substrate is available.

For evaluation of Pol activity in the presence of the pseudosubstrate we initiated the endogenous polymerase reaction after inhibitor pretreatment as it was done for the PK. Figure 5A shows that the inhibitor did not affect Pol, which excludes an effect of the PKC inhibitor on the viral polymerase.

**Analysis of intracellular HBV DNA.** Previous experiments on DHBV revealed that virus secretion is an important regulator for cccDNA amplification (Summers *et al.*, 1990). After adenovirus-mediated transfer of HBV such regulation could not be observed, implying substantial differences in the regulation of envelopment (Sprinzl *et al.*, 2001). We thus analysed whether the inhibited secretion upon pseudosubstrate treatment affected the amount of nuclear cccDNA. Using cccDNA-specific HBV PCR (Rabe *et al.*, 2006) we found that pseudosubstrate treatment did not significantly affect cccDNA [medians:  $1.76 \times 10^5$  copies without inhibitor vs.  $1.73 \times 10^5$  copies with inhibitor in  $8 \times 10^4$  cells. This corresponds to 2.2 copies per cell (Fig. 5B)]. This is in agreement with the low copy number of 1.5 per cell, which is found upon natural infection in HBeAg-positive patients (Laras *et al.*, 2006).

We next quantified total intracellular HBV DNA using real-time HBV DNA PCR of the X ORF. This region was selected as it is the first part of the genome that becomes reverse transcribed to DNA. Thus even early stages of genome maturation can be detected. We found that inhibitor treatment with  $1 \times IC_{50}$  did not reduce HBV DNA significantly from 292 and 254 copies per cell (Mann-Whitney test; median  $2.0 \times 10^7$  vs.  $2.3 \times 10^7$  copies per sample; Fig. 5C). The large pool of intracellular DNA-containing capsids in comparison with secreted virions is in agreement with findings in the chimpanzee model (Murray *et al.*, 2006).

Inhibitor treatment may have altered the ratio between the different forms of HBV DNA in the capsids, i.e. rcDNA and replication intermediates. We thus subjected the DNA from the same number of intracellular HBV capsids from untreated and  $1 \times IC_{50}$ -treated HepG2.2.15 cells to Southern blotting. Figure 5D shows that rcDNA and replication intermediates could be detected on the same levels. Using phosphoimaging the obtained signals were compared with those of a dilution series of an HBV full-length genome-containing plasmid for quantification. Figure 5D (right panel) depicts that the vast majority of HBV DNA was immature replication intermediates. Quantification revealed approximately one copy per capsid in both inhibitor-treated and untreated cells. Because of the heterogeneous migration some inaccuracy must be however considered. Significantly less abundant was the rcDNA



**Fig. 6.** Effects of the inhibitor on PK activity in virions from inhibitor-treated cells.

A. Relative PK activity in virion-derived capsids from 1: untreated and 2: inhibitor-treated cells. Phosphorylations were performed in absence of the inhibitor during phosphorylation.

B. Relative PK activity in virion-derived capsids from inhibitor-treated cells in 1: the absence; 2: in the presence of  $1 \times IC_{50}$ .

form (1 per 50 capsids), which was however unchanged upon inhibitor treatment. Taken together the inhibitor treatment did neither change the amount of HBV DNA in the capsids nor the abundance of the different HBV DNA forms. Because genome maturation depends on formation of PG and Pol-containing capsids these data further show that PG packaging was not changed.

**PK activity in virus-derived capsids from inhibitor-treated cells.** We asked next whether the secreted capsids from inhibitor-treated cells still contained PKC. We first subjected the pseudosubstrate to virion-derived capsids from inhibitor-treated and untreated HepG2.12.5 cells. Figure 6A shows that capsids from inhibitor-treated cells exhibited a 65% reduced PK activity, similar to the inhibition observed for the intracellular capsids.

Assuming one or no PK molecule per capsid, the particles could contain either an inhibited or a non-inhibited PK or no PKC. The reduced PK activity found in the capsids from pseudosubstrate-treated cells can thus be interpreted as a mixture of capsids in which some capsids contain an active PK and others that have undergone phosphorylation prior to virion formation.

In order to analyse the PK in the virions released from inhibitor-treated cells, we performed the phosphorylation in the presence and in the absence of the pseudosubstrate. We found that the reaction was further inhibited to 60% (Fig. 6B), indicating that the PKC was not replaced by another PK.

## Discussion

### *Characterization of the protein kinase in capsids derived from different hosts*

Phosphorylation of the HBV capsid is a long-known phenomenon (Albin and Robinson, 1980) but its importance for the viral life cycle as well as the nature of the PK is poorly understood. Based on our previous investigations using liver-derived capsids we focused our study on PKC. The pseudosubstrate was chosen because its specificity allows the differentiation of the different PKC isoforms and a clear distinction from other PKs (Hvalby *et al.*, 1994; Seewald *et al.*, 1999). Point mutations of the inhibitor sequence totally abolish its inhibitory potential (House *et al.*, 1987; Eichholtz *et al.*, 1993). Because of unspecific effects that occur frequently upon high inhibitor concentrations we restricted our evaluations to IC<sub>50</sub>.

We showed that the phosphorylation followed a linear kinetic, which allows to detect inhibitory effects quantitatively. The kinetic was however slow and PK inhibition needed preincubation of the capsids with the inhibitor. We hypothesized that this slow kinetic was due to the limited access of the peptide inhibitor to the lumen of the capsid where the PK should localize. This assumption is in agreement with the accessibility of the viral genome to DNase I and to previously published reports on capsid breathing (Ceres and Zlotnick, 2002; Rabe *et al.*, 2009).

Consistent with the delayed inhibition Kau and Ting (Kau and Ting, 1998) and Kann *et al.* (Kann *et al.*, 1993) could not observe a sensitivity of the capsid-associated kinase to the PKC inhibitor H89 (MW 519) in short-term kinetics or without preincubation.

In agreement with the entry of DNase I into capsids lumen we observed that exogenously added histones were phosphorylated. The phosphorylation pattern, as it was demonstrated for intracellular capsids, depicted a dominant labelling of histone H2B. This finding is in agreement with the observation that only histone H2B shows a well-defined serine phosphorylation site for PKC (Motif Scan, [http://scansite.mit.edu/motifscan\\_seq.phtml](http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml)).

The consecutive *in vitro* phosphorylation of different histones by recombinant PKC isoforms showed further that only PKC $\alpha$  but not PKC $\beta$  or PKC $\gamma$  exhibited this phosphorylation pattern. Noteworthy the latter two isoforms are most abundant in brain tissue while PKC $\alpha$  is widespread expressed, including hepatocytes (Goldberg and Steinberg, 1996). Analysing capsids from different sources we showed that PKC $\alpha$  activity was present in all types of capsids, independently of the HBV genotype. Moreover, PKC $\alpha$  could not be replaced by another PK upon inhibitor treatment of HepG2.2.15 cells. This remarkable specificity was supported by the observation that the host cell had no impact on PKC encapsidation although the PK expression pattern in primary and immortalized

hepatocytes differs significantly (Kim *et al.*, 1998; Tsuboi *et al.*, 2004).

Western blotting confirmed the presence of PKC $\alpha$  in the capsids. The faint band made a reliable quantification impossible but considering that the inhibition of capsid phosphorylation by the inhibitor at  $1 \times \text{IC}_{50}$  was similar to 50% we conclude that PKC $\alpha$  was the dominant if not the only active PK in the capsids.

### *Function of PKC in the hepadnaviral life cycle*

The effect of PKC inhibition on different HBV parameters is summarized in Table 1. The finding that secretion of virions was inhibited to half upon inhibitor treatment led to the search for the underlying mechanism. PKCs are well known to have multiple, barely understood effects on vesicle shuttling. The importance on exocytosis is a matter of controversial discussion as PKC inhibition was found to have either no effect (Nordmann *et al.*, 1991) or an inhibitory effect (Zhu *et al.*, 2002). We thus studied the exocytosis of HBsAg that largely comprises subviral particles (SVP). SVP exhibit the same proteins than the virion and react with the same antibodies. Our observation of an unchanged HBsAg secretion upon inhibitor treatment therefore suggests that the inhibition of virion secretion occurs prior to envelopment of the capsid by the surface proteins assuming that SVP and virions are released by the same pathway. In fact studies on HBV-transgenic mice indicate that both virions and SVP derive from the ER membrane (Liou *et al.*, 2008). There are however conflicting data supporting that virions and SVP use different pathways. Tunicamycin treatment for instance affects only virion secretion (Lu *et al.*, 1995). Moreover different host proteins of the ESCRT-III complex (endosomal sorting complex required for transport) were shown to interfere with capsid-surface protein interaction (Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007). Although there is no evidence that PKC is involved in these pathways we cannot firmly exclude that the pseudosubstrate has affected HBV virion formation by interfering with these host proteins.

As the envelopment depends upon genome maturation inside the viral capsid (Gerelsaikhani *et al.*, 1996) we analysed the potential impact of inhibitor treatment on different markers of HBV genome conversion. We found that neither the endogenous polymerase activity nor the rcDNA formation nor the amount of replication intermediates was altered. These findings indicate that neither the RNA- nor the DNA-dependent polymerase functions of Pol were impaired. Given the dual requirement of core and Pol expression for Pol activity these data show indirectly that PG transcription, mRNA transport to cytoplasm as well as Pol and core protein synthesis remained unchanged. This assumption was supported by the

unchanged amount of HBsAg found in the supernatant of the inhibitor treated cells.

Analysis of intracellular capsids showed much more capsids than HBV genomes. This finding agrees with the presence of genome-free capsid particles found in HBV-infected human livers. However, inhibitor treatment was accompanied by increased numbers of intracellular capsids. Calculation on individual cells (Table 1) revealed an increase from 340 to 920 capsids. Evidently the decrease in virion secretion – from 143 to 69 in 5 days – cannot account for such an accumulation. As the level of viral protein expression is very likely unchanged we assume that PKC $\alpha$  phosphorylation reduces capsid stability. Inhibition of PKC $\alpha$  would thus cause more capsids and less unassembled core proteins. Capsids however show a much higher half-life than unassembled HBV core proteins [ $> 24$  h vs. 3 h, respectively (Deres *et al.*, 2003)] well explaining capsid accumulation upon inhibitor treatment. Although it must be considered that HBV and DHBV core proteins show significant differences a phosphorylation-driven destabilization is in accordance with similar observations on DHBV (Köck *et al.*, 2003; Basagoudanavar *et al.*, 2007).

The increased amount of intracellular capsids upon PKC $\alpha$  inhibition was combined with an approximately threefold decrease of DNA genomes per capsid. This finding implies a reduced encapsidation capacity of the capsids, which is in accordance with previous observations showing that phosphorylation of serine residues 162 is essential for PG packaging (Gazina *et al.*, 2000).

However, the total number of viral DNA genomes per cell remained similar suggesting that the decrease of secreted virions upon inhibitor treatment is a consequence of a reduced envelopment of capsids. This assumption is in accordance with data derived from DHBV in which mutation of DHBC serine 245 into a non-phosphorylatable alanine reduces virus secretion (Köck *et al.*, 2003).

In light of our results we postulate that different PK phosphorylate different sites in the core protein C-terminus that contribute to different functions of the HBV life cycle: the reduced encapsidation capacity upon PKC $\alpha$  inhibition implies that Ser162 phosphorylation becomes reduced while phosphorylation of Ser170 that supports second strand DNA synthesis is not mediated by PKC $\alpha$ .

## Experimental procedures

### Preparation of capsids

P-rC was generated by *in vitro* phosphorylation of *E. coli*-derived capsids using PKC and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP to control successful reaction (Kann and Gerlich, 1994). *E. coli*-derived capsids were expressed and prepared as described previously (Crowther

*et al.*, 1994). Quantification of capsids was done by immune blotting of the capsids after native agarose gel electrophoresis (Kann *et al.*, 1999).

### Purification of HBV from human sera

The complex protocol for virion purification was described elsewhere (Glebe and Gerlich, 2004). In brief, precleared sera were subjected to sucrose gradient centrifugation, followed by CsCl flotation and subsequent second sucrose gradient centrifugation. The gradient medium was removed by ultrafiltration of the HBsAg-positive fractions. The HBV-positive fraction of the first sucrose gradient was shown to be infectious for primary hepatocytes of *Tupaia belangeri*. Upon silver stain no contaminating proteins were visible.

### Cell culture

A total of  $10^6$  HepG2.2.15 cells were seeded per well of a six-well dish. After incubation over night (o.n.) in DMEM/2% FCS the medium was replaced by serum-free medium. At this time the inhibitor was added in half maximal inhibitory concentration ( $1 \times IC_{50}$ , determined on purified PKC) when indicated. Every day half of the medium was replaced by new DMEM containing inhibitor. Using these conditions cells divide less than once within 5 days to  $1.6 \times 10^6$ .

### Purification from cell culture supernatant

Preparation of mature capsids from virions from the permanently virion-expressing hepatoma cell line HepG2.2.15 (Sells *et al.*, 1988) was done according to Rabe *et al.* (Rabe *et al.*, 2003), involving sucrose gradient centrifugation. This cell line expresses infectious HBV (Sells *et al.*, 1988).

### Purification of intracellular capsids

Intracellular capsids were purified from the same cell line using the following protocol. Ten 16 cm dishes of HepG2.2.15 cells were grown in DMEM medium, containing 10% FCS until 80% confluence. The medium was replaced by DMEM/1% FCS and cells were grown for further 4 days. Cells were washed twice in PBS, harvested by a rubber policeman and sedimented for 5 min at 200 g and 4°C. Cells were resuspended in 0.1% Nonidet P-40/PBS and sonified on ice. Cellular nucleic acids were digested by addition of 20 U ml $^{-1}$  DNase I/20  $\mu$ g ml $^{-1}$  RNase A in 15 mM MgCl $_2$  for 15 min at 37°C. This short incubation was chosen as capsid instability may allow entry of nucleases upon longer incubation periods (Ceres and Zlotnick, 2002; Rabe *et al.*, 2009). The lysate was centrifuged for 20 min at 10 000 g. The supernatant was adjusted to 0.75% Nonidet P-40/5 mM CaCl $_2$ /20 U ml $^{-1}$  S7-Nuclease and incubated for further 15 min at 37°C before EDTA was added to 15 mM. The lysate was centrifuged for 10 min at 4°C and 18 000 g. The capsids in the supernatant were loaded on a 1 ml 25% (w/v) sucrose cushion and sedimented for 2 h at 10°C and 50 000 r.p.m. in an SW60 rotor (Beckman). The sediment was resuspended in 500  $\mu$ l of PBS, centrifuged for 5 min at 4°C and 18 000 g. The capsid-containing

supernatant was adjusted to 2 mM DTT in order to prevent disulfide bond formation and stored in aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Western blot

Mature capsids purified from HepG2.2.15 cell culture supernatant (800 ng) and PKC purified from rat brain (Promega) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 11% gels, followed by immune blot detection of proteins transferred to polyvinylidene fluoride membrane (PVDF). PKC was detected by using mouse monoclonal antibody raised against amino acids 373–672 of PKC $\alpha$  of human origin (Santa Cruz) at a dilution of 1:50. Primary antibody was detected with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies directed against mouse (Jackson ImmunoResearch) at a dilution of 1:10 000. Detection of the signal was performed using a pico-sensitive enhanced-chemoluminescence detection system (Pierce).

#### PK and polymerase reactions

Surface proteins of the virions were removed with non-ionic detergent Nonidet P-40 and dithiothreitol according to Kaplan *et al.* (Kaplan *et al.*, 1973). As revealed by immune precipitations using a monoclonal anti-surface protein antibody (H166, Abbott), this reaction does not remove all surface proteins but allows complete precipitation of the capsids with an anti-capsid antibody (DAKO) (not shown). A total of  $5 \times 10^7$  capsids were preincubated with the pseudosubstrate inhibitor in 20 mM Tris-HCl pH 7.5/10 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25% BSA, 0.375% Nonidet P-40 in a total volume of 26  $\mu\text{l}$  at  $37^{\circ}\text{C}$ . Time points and concentration of the inhibitor varied and are given in *Results*. Phosphorylation was initiated by addition of 40  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (800 Ci mmol<sup>-1</sup>) and performed o.n. at  $37^{\circ}\text{C}$ . At these conditions ATP was present in a  $\sim 100$  000-fold excess to the number of phosphorylation sites. In some experiments histones (Roche) were added together with the ATP. Noteworthy, diacylglycerol (DAG) – an activator of different PKCs was not added as PKC action on arginine-rich substrates is DAG-independent (Leventhal and Bertics, 1993).

If indicated, for instance for analysis of the PK activity in intracellular capsids, capsids were immune precipitated with an anti-capsid antibody that does not interact with non-assembled core proteins (Kann *et al.*, 1999) using biomagnetic beads. A total of  $6 \times 10^6$  biomagnetic beads (Invitrogen), coated to saturation with this anti-capsid antibody (DAKO), were incubated with the capsids o.n. at  $4^{\circ}\text{C}$  on a rotating wheel. Washing was performed once with 500  $\mu\text{l}$  of PBS, followed by four washes with 500  $\mu\text{l}$  of PBS/1% Tween 20. Proteins bound to the beads were separated by 15% SDS-PAGE. The gel was exposed to a phosphorimager screen after drying. The bands were visualized in a Fuji Bioimager BAS 1000 and quantified using the software TINA (Fuji). Using this protocol all radioactive capsids were precipitated (not shown).

In order to analyse the accuracy of determination 10 quantifications were done on each of five phosphorylations. Coefficient of variation was found to be  $\sim 7\%$  independent of signal strength.

The endogenous polymerase reaction was performed according to Kaplan *et al.* (1973). After preincubation of  $5 \times 10^7$  capsids with or without the inhibitor in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl/50 mM Tris-HCl pH

8.0/50 mM NaCl/7 mM MgCl<sub>2</sub>/0.1% Nonidet P-40, polymerization was started by addition of 0.02 mM dNTP/10  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci mmol<sup>-1</sup>).

For the analysis of histone phosphorylation, 20  $\mu\text{g}$  of each histone (H2A, H2B, H3) were phosphorylated using 0.45 mU of PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II) in 20 mM Hepes (pH 7.4)/10 mM MgCl<sub>2</sub>/0.1 mM CaCl<sub>2</sub>/10  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP/1 mM ATP o.n. at  $30^{\circ}\text{C}$ . The reaction was stopped by the addition of SDS-PAGE loading buffer and the proteins were separated on 18% SDS-PAGE (Tris-Glycin gel). After gel drying <sup>32</sup>P-labelled proteins were visualized by phosphorimaging. Analysis and quantification was done using the software *ImageQuant*.

#### DNase I sensitivity of HBV capsids

Endogenous polymerase reaction was performed according to Kann *et al.* (1997). After removal of unincorporated nucleotides by G50 spin columns 8 ng of capsids was incubated in 20 mM Hepes, pH 7.3, 2 mM MgAc, 110 mM KAc, 5 mM NaAc, 10 mM MgCl<sub>2</sub> with 50 U of DNase I (Roche) for various times that are indicated in *Results*. Reaction was stopped and Pol removed by addition of 10  $\mu\text{g}$  of proteinase K in 25 mM CaCl<sub>2</sub> o.n. at  $56^{\circ}\text{C}$ . Prior to phenol/chloroform extraction and EtOH precipitation a radioactive standard plasmid DNA was added as an internal standard. DNA was separated by agarose gel electrophoresis followed by drying of the gel and subsequent phosphorimaging.

#### Southern blot

Intracellular capsid from  $8 \times 10^6$  untreated and inhibitor-treated HepG2.2.15 cells were purified according to Rabe *et al.* (2003). After quantification by native agarose gel electrophoresis and subsequent immune detection (Kann *et al.*, 1999), the HBV DNA from 1 ng of capsids was isolated using the *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche) according to vendor's protocol. DNA separation on an agarose gel, depurination, and Southern blot on nylon membrane (Hybond XL) were performed using standard protocols. After cross-linking for 2 h at  $80^{\circ}\text{C}$  the membrane was preincubated for 30 min at  $65^{\circ}\text{C}$  in *Rapid Hyb buffer* (GE-Healthcare). Hybridization probe was prepared by random priming using the purified, plasmid-derived HBV sequence from nt 963–1984. Labelling resulted in  $5 \times 10^9$  c.p.m./8 ng probe. After hybridization for 2 h at  $65^{\circ}\text{C}$  in *Rapid Hyb buffer*, membrane was washed with SSC with decreasing salt concentrations (2  $\times$  10 min 2 $\times$  SSC/0.1% SDS, 2  $\times$  10 min 1 $\times$  SSC/0.1% SDS, 2  $\times$  15 min 0.1 $\times$  SSC/0.1% SDS at  $65^{\circ}\text{C}$ ; 10 min 0.1 $\times$  SSC at RT). After drying the membrane HBV DNA was detected by phosphorimaging. Analysis and quantification was done using the software *ImageQuant*.

#### Quantification of HBV markers

Quantification of capsids was done by immune blotting after native agarose gel electrophoresis. The amounts of capsids were determined by comparing the signal with a geometrical standard dilution series. The protocol of immune detection is described extensively elsewhere (Kann *et al.*, 1999; Rabe *et al.*, 2006). Extraction and determination of total HBV DNA by real-time PCR was performed according to Jursch *et al.* (Jursch *et al.*, 2002) in two runs using triplicates. Amplification of the correct product was

confirmed by the melting curve of the Hyprobe-amplification product and by determination of the correct size. Quantification of cccDNA was performed after Hirt extraction (Hirt, 1967). PCR, as it was described elsewhere (Rabe *et al.*, 2006), was done in duplicates from five different samples in three separate PCR runs. HBV surface proteins (HBsAg) and hepatitis B e antigen (HBeAg) were determined by ELISA (IMX-MEIA, Abbott) using a dilution series of a calibrated HBV-positive reference plasma, which was calibrated as described by Gerlich and Thomssen (Gerlich and Thomssen, 1975).

### Acknowledgements

We thank Sigrun Broehl, Giessen for the preparation of the HBVs from human sera, and Corinna Bremer for confirmatory PCR together with WG. This work was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to MK (SFB 535/B5) and DG (SFB 535/A2). Further support was obtained by a grant of 'la region Aquitaine' to MD and the Agence National de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS) to AC.

### References

- Albin, C., and Robinson, W.S. (1980) Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol* **34**: 297–302.
- Basagoudanavar, S.H., Perlman, D.H., and Hu, J. (2007) Regulation of hepadnavirus reverse transcription by dynamic nucleocapsid phosphorylation. *J Virol* **81**: 1641–1649.
- Bremer, C.M., Bung, C., Kott, N., Hardt, M., and Glebe, D. (2009) Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbiol* **11**: 249–260.
- Ceres, P., and Zlotnick, A. (2002) Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry* **41**: 11525–11531.
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Bottcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V., and Pumpens, P. (1994) Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**: 943–950.
- Daub, H., Blencke, S., Habenberger, P., Kurtenbach, A., Dennenmoser, J., Wissing, J., *et al.* (2002) Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* **76**: 8124–8137.
- Deres, K., Schröder, C.H., Paessens, A., Goldmann, S., Hacker, H.J., Weber, O., *et al.* (2003) Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science* **299**: 893–896.
- Duclos Vallee, J.C., Capel, F., Mabit, H., and Petit, M.A. (1998) Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *J Gen Virol* **79**: 1665–1670.
- Eichholtz, T., de Bont, D.B., de Widt, J., Liskamp, R.M., and Ploegh, H.L. (1993) A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J Biol Chem* **268**: 1982–1986.
- Enomoto, M., Sawano, Y., Kosuge, S., Yamano, Y., Kuroki, K., and Ohtsuki, K. (2006) High phosphorylation of HBV core protein by two alpha-type CK2-activated cAMP-dependent protein kinases *in vitro*. *FEBS Lett* **580**: 894–899.
- Gazina, E.V., Fielding, J.E., Lin, B., and Anderson, D.A. (2000) Core protein phosphorylation modulates pre-genomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J Virol* **74**: 4721–4728.
- Gerelsaikhan, T., Tavis, J.E., and Bruss, V. (1996) Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* **70**: 4269–4274.
- Gerlich, W., and Thomssen, R. (1975) Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume. *Dev Biol Stand* **30**: 78–87.
- Gerlich, W.H., Goldmann, U., Müller, R., Stibbe, W., and Wolff, W. (1982) Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *J Virol* **42**: 761–766.
- Glebe, D., and Gerlich, W.H. (2004) Study of the endocytosis and intracellular localization of subviral particles of hepatitis B virus in primary hepatocytes. *Methods Mol Med* **96**: 143–151.
- Goldberg, M., and Steinberg, S.F. (1996) Tissue-specific developmental regulation of protein kinase C isoforms. *Biochem Pharmacol* **51**: 1089–1093.
- Hirt, B. (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**: 365–369.
- House, C., Wettenhall, R.E., and Kemp, B.E. (1987) The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase C. *J Biol Chem* **262**: 772–777.
- Hvalby, O., Hemmings, H.C., Jr, Paulsen, O., Czernik, A.J., Nairn, A.C., Godfraind, J.M., *et al.* (1994) Specificity of protein kinase inhibitor peptides and induction of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4761–4765.
- Jursch, C.A., Gerlich, W.H., Glebe, D., Schaefer, S., Marie, O., and Thraenhart, O. (2002) Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **190**: 189–197.
- Kang, H.Y., Lee, S., Park, S.G., Yu, J., Kim, Y., and Jung, G. (2006) Phosphorylation of hepatitis B virus Cp at Ser87 facilitates core assembly. *Biochem J* **398**: 311–317.
- Kann, M., and Gerlich, W.H. (1994) Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol* **68**: 7993–8000.
- Kann, M., and Gerlich, W.H. (2005) *Hepatitis B Virus and Other Hepadnaviridae. Structure and Molecular Virology*. Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo: Churchill Livingstone.
- Kann, M., Thomssen, R., Köchel, H.G., and Gerlich, W.H. (1993) Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus. *Arch Virol Suppl* **8**: 53–62.
- Kann, M., Bischof, A., and Gerlich, W.H. (1997) *In vitro* model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* **71**: 1310–1316.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., and Helenius, A. (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **145**: 45–55.
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H., and Robinson, W.S. (1973) DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* **12**: 995–1005.
- Karpenko, L.I., Ryazankin, I.A., Chikaev, N.A., Kolesnikova, L.V., and Ilyichev, A.A. (1997) Localization of the amino

- terminus of the hepatitis B virus core antigen within the core particle. *Virus Res* **52**: 15–23.
- Kau, J.H., and Ting, L.P. (1998) Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* **72**: 3796–3803.
- Kim, T.H., Bowen, W.C., Stolz, D.B., Runge, D., Mars, W.M., and Michalopoulos, G.K. (1998) Differential expression and distribution of focal adhesion and cell adhesion molecules in rat hepatocyte differentiation. *Exp Cell Res* **244**: 93–104.
- Köck, J., Kann, M., Putz, G., Blum, H.E., and von Weizsäcker, F. (2003) Central role of a serine phosphorylation site within duck hepatitis B virus core protein for capsid trafficking and genome release. *J Biol Chem* **278**: 28123–28129.
- Köck, J., Nassal, M., Deres, K., Blum, H.E., and von Weizsäcker, F. (2004) Hepatitis B virus nucleocapsids formed by carboxy-terminally mutated core proteins contain spliced viral genomes but lack full-size DNA. *J Virol* **78**: 13812–13818.
- Koletzki, D., Biel, S.S., Meisel, H., Nugel, E., Gelderblom, H.R., Krüger, D.H., and Ulrich, R. (1999) HBV core particles allow the insertion and surface exposure of the entire potentially protective region of Puumala hantavirus nucleocapsid protein. *Biol Chem* **380**: 325–333.
- Lambert, C., Doring, T., and Prange, R. (2007) Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* **81**: 9050–9060.
- Lan, Y.T., Li, J., Liao, W., and Ou, J. (1999) Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology* **259**: 342–348.
- Laras, A., Koskinas, J., Dimou, E., Kostamena, A., and Hadziyannis, S.J. (2006) Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology* **44**: 694–702.
- Leventhal, P.S., and Bertics, P.J. (1993) Activation of protein kinase C by selective binding of arginine-rich polypeptides. *J Biol Chem* **268**: 13906–13913.
- Liou, W., Sung, Y.J., Tao, M.H., and Lo, S.J. (2008) Morphogenesis of the hepatitis B virion and subviral particles in the liver of transgenic mice. *J Biomed Sci* **15**: 311–316.
- Lu, X., Mehta, A., Dwek, R., Butters, T., and Block, T. (1995) Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion. *Virology* **213**: 660–665.
- Manigold, T., Bocker, U., Chen, J., Gundt, J., Traber, P., Singer, M.V., and Rossol, S. (2003) Hepatitis B core antigen is a potent inducer of interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and patients with hepatitis B infection. *J Med Virol* **71**: 31–40.
- Melegari, M., Wolf, S.K., and Schneider, R.J. (2005) Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* **79**: 9810–9820.
- Murray, J.M., Purcell, R.H., and Wieland, S.F. (2006) The half-life of hepatitis B virions. *Hepatology* **44**: 1117–1121.
- Nordmann, J.J., Stuenkel, E.L., and Malviya, A.N. (1991) Exocytosis in neurohypophysial nerve terminals is not coupled to protein kinase C translocation. *Biochem J* **273** (Part 2): 493–496.
- Offensperger, W.B., Walter, E., Offensperger, S., Zeschnigk, C., Blum, H.E., and Gerok, W. (1988) Duck hepatitis B virus: DNA polymerase and reverse transcriptase activities of replicative complexes isolated from liver and their inhibition *in vitro*. *Virology* **164**: 48–54.
- Okabe, M., Enomoto, M., Maeda, H., Kuroki, K., and Ohtsuki, K. (2006) Biochemical characterization of suramin as a selective inhibitor for the PKA-mediated phosphorylation of HBV core protein *in vitro*. *Biol Pharm Bull* **29**: 1810–1814.
- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., and Zerial, M. (2005) Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* **436**: 78–86.
- Perlman, D.H., Berg, E.A., O'Connor, P.B., Costello, C.E., and Hu, J. (2005) Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 9020–9025.
- Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A., and Kann, M. (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9849–9854.
- Rabe, B., Glebe, D., and Kann, M. (2006) Lipid-mediated entry of hepatitis B virus capsids in non-susceptible cells allows highly efficient replication and the analysis of the early infection events. *J Virol* **80**: 5465–5473.
- Rabe, B., Delaleau, M., Bischof, A., Foss, M., Sominskaya, I., Pumpens, P., et al. (2009) Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog* **5**: e1000563.
- Schaefer, S. (2007) Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* **13**: 14–21.
- Schormann, W., Kraft, A., Ponsel, D., and Bruss, V. (2006) Hepatitis B virus particle formation in the absence of pre-genomic RNA and reverse transcriptase. *J Virol* **80**: 4187–4190.
- Seewald, S., Schmitz, U., Seul, C., Ko, Y., Sachinidis, A., and Vetter, H. (1999) Lysophosphatidic acid stimulates protein kinase C isoforms alpha, beta, epsilon, and zeta in a pertussis toxin sensitive pathway in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* **12**: 532–537.
- Sells, M.A., Zelent, A.Z., Shvartsman, M., and Acs, G. (1988) Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol* **62**: 2836–2844.
- Sprinzi, M.F., Oberwinkler, H., Schaller, H., and Protzer, U. (2001) Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier. *J Virol* **75**: 5108–5118.
- Summers, J., Smith, P.M., and Horwich, A.L. (1990) Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* **64**: 2819–2824.
- Tillmann, H.L. (2007) Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* **13**: 125–140.
- Tsuboi, Y., Ichida, T., Sugitani, S., Genda, T., Inayoshi, J., Takamura, M., et al. (2004) Overexpression of extracellular signal-regulated protein kinase and its correlation with proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* **24**: 432–436.

- Watanabe, T., Sorensen, E.M., Naito, A., Schott, M., Kim, S., and Ahlquist, P. (2007) Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 10205–10210.
- Wetsel, W.C., Khan, W.A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A.E., Phung, H.M., *et al.* (1992) Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol* **117**: 121–133.
- Wieland, S.F., Spangenberg, H.C., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004) Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2129–2134.
- Zhu, H., Hille, B., and Xu, T. (2002) Sensitization of regulated exocytosis by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 17055–17059.
- Zlotnick, A., Cheng, N., Stahl, S.J., Conway, J.F., Steven, A.C., and Wingfield, P.T. (1997) Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9556–9561.

# **Bibliographie**

Andrade, M. A., C. Petosa, et al. (2001). "Comparison of ARM and HEAT protein repeats." J Mol Biol **309**(1): 1-18.

Askjaer, P., V. Galy, et al. (2002). "Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living caenorhabditis elegans embryos." Mol Biol Cell **13**(12): 4355-70.

Bachi, A., I. C. Braun, et al. (2000). "The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates." RNA **6**(1): 136-58.

Ball, J. R. and K. S. Ullman (2005). "Versatility at the nuclear pore complex: lessons learned from the nucleoporin Nup153." Chromosoma **114**(5): 319-30.

Beck, J. and M. Nassal (2007). "Hepatitis B virus replication." World J Gastroenterol **13**(1): 48-64.

Bednenko, J., G. Cingolani, et al. (2003). "Importin beta contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport." J Cell Biol **162**(3): 391-401.

Belnap, D. M., N. R. Watts, et al. (2003). "Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus." Proc Natl Acad Sci USA **100**(19): 18884-9.

Ben-Efraim, I. and L. Gerace (2001). "Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import." J Cell Biol **152**(2): 411-7.

Benhenda, S., D. Cougot, et al. (2009). "Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis." Adv Cancer Res **103**: 75-109.

Blumberg, B. S., H. J. Alter, et al. (1965). "A "New" Antigen in Leukemia Sera." JAMA **191**: 541-6.

Blumberg, B. S., B. J. Gerstley, et al. (1967). "A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis." Ann Intern Med **66**(5): 924-31.

Bottcher, B., S. A. Wynne, et al. (1997). "Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy." Nature **386**(6620): 88-91.

Bronowicki, J.P. (2006). "Nosocomial infection by HBV: an underrated risk factor?" Gastroenterol Clin Biol **30**(12): 1346-8.

Bruss, V. (1997). "A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation." J Virol **71**(12): 9350-7.

Bruss, V. (2004). "Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid." Virus Res **106**(2): 199-209.

- Bruss, V. and D. Ganem (1991). "Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion." J Virol **65**(7): 3813-20.
- Budkowska, A., P. Bedossa, et al. (1995). "Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain." J Virol **69**(2): 840-8.
- Cassany, A. and L. Gerace (2009). "Reconstitution of nuclear import in permeabilized cells." Methods Mol Biol **464**: 181-205.
- Catimel, B., T. Teh, et al. (2001). "Biophysical characterization of interactions involving importin-alpha during nuclear import." J Biol Chem **276**(36): 34189-98.
- Ceres, P. and A. Zlotnick (2002). "Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids." Biochemistry **41**(39): 11525-31.
- Chen, Z. Y., A. C. Cheng, et al. (2007). "Antiviral effects of PNA in duck hepatitis B virus infection model." Acta Pharmacol Sin **28**(10): 1652-8.
- Christophe, D., C. Christophe-Hobertus, et al. (2000). "Nuclear targeting of proteins: how many different signals?" Cell Signal **12**(5): 337-41.
- Chu, C. M. and Y. F. Liaw (1997). "Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study." J Gastroenterol Hepatol **12**(9-10): S218-22.
- Cingolani, G., C. Petosa, et al. (1999). "Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha." Nature **399**(6733): 221-9.
- Cohen S., S. Au et al (2011). "How viruses access the nucleus." Biochim Biophys Acta **1813**(9): 1634-45.
- Conti, E. and E. Izaurralde (2001). "Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 310-9.
- Conti, E., M. Uy, et al. (1998). "Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha." Cell **94**(2): 193-204.
- Cooper, A., N. Paran, et al. (2003). "The earliest steps in hepatitis B virus infection." Biochim Biophys Acta **1614**(1): 89-96.
- Cronshaw, J. M., A. N. Krutchinsky, et al. (2002). "Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex." J Cell Biol **158**(5): 915-27.
- Crowther, R. A., N. A. Kiselev, et al. (1994). "Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy." Cell **77**(6): 943-50.

- D'Angelo, M. A. and M. W. Hetzer (2008). "Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes." Trends Cell Biol **18**(10): 456-66.
- Dane, D. S., C. H. Cameron, et al. (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." Lancet **1**(7649): 695-8.
- Davison, F., G. J. Alexander, et al. (1987). "Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication." J Hepatol **4**(1): 37-44.
- De Falco, S., M. G. Ruvoletto, et al. (2001). "Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells." J Biol Chem **276**(39): 36613-23.
- Dehesa-Violante, M. and R. Nunez-Nateras (2007). "Epidemiology of hepatitis virus B and C." Arch Med Res **38**(6): 606-11.
- Eckhardt, S. G., D. R. Milich, et al. (1991). "Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus." J Virol **65**(2): 575-82.
- Fahrenkrog, B., B. Maco, et al. (2002). "Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex." J Struct Biol **140**(1-3): 254-67.
- Fan, X. C. and J. A. Steitz (1998). "HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15293-8.
- Fattovich, G., F. Bortolotti, et al. (2008). "Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors." J Hepatol **48**(2): 335-52.
- Fernandez-Martinez, J. and M. P. Rout (2009). "Nuclear pore complex biogenesis." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 603-12.
- Fernholz, D., M. Stemler, et al. (1991). "Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein." J Hepatol **13 Suppl 4**: S102-4.
- Ferrando-May, E., V. Cordes, et al. (2001). "Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis." Cell Death Differ **8**(5): 495-505.
- Fontes, M. R., T. Teh, et al. (2000). "Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha." J Mol Biol **297**(5): 1183-94.
- Fornerod, M. and M. Ohno (2002). "Exportin-mediated nuclear export of proteins and ribonucleoproteins." Results Probl Cell Differ **35**: 67-91.

- Franco, A., M. Paroli, et al. (1992). "Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes." J Exp Med **175**(5): 1195-205.
- Freivalds, J., A Dislers, et al. (2011). "Highly efficient production of phosphorylated hepatitis B core particles in yeast *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif **75**(2): 218-24.
- Funk, A., M. Mhamdi, et al. (2007). "Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism." World J Gastroenterol **13**(1): 91-103.
- Galibert, F., E. Mandart, et al. (1979). "Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*." Nature **281**(5733): 646-50.
- Gazina, E. V., J. E. Fielding et al. (2000). "Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B virus." J Virol **74**(10): 4721-8.
- Glebe, D. and S. Urban (2007). "Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry." World J Gastroenterol **13**(1): 22-38.
- Goldfarb, D. S., A. H. Corbett, et al. (2004). "Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor." Trends Cell Biol **14**(9): 505-14.
- Goldfarb, D. S., J. Garipey, et al. (1986). "Synthetic peptides as nuclear localization signals." Nature **322**(6080): 641-4.
- Goldstein, S. T., F. Zhou, et al. (2005). "A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact." Int J Epidemiol **34**(6): 1329-39.
- Gomaa, A. I., S. A. Khan, et al. (2008). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis." World J Gastroenterol **14**(27): 4300-8.
- Gong, Z. J., S. De Meyer, et al. (1999). "Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection." Hepatology **29**(2): 576-84.
- Gorlich, D., P. Henklein, et al. (1996). "A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus." EMBO J **15**(8): 1810-7.
- Gorlich, D. and U. Kutay (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 607-60.
- Greber U. F., M. Suomalainen et al. (1997). "The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry." EMBO J **16**(19): 5998-6007.
- Gripon, P., S. Rumin et al. (2002). "Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus." Proc Natl Acad Sci USA **99**(24): 15655-60.

- Guidotti, L.G., B. Matzke, et al. (1995). "High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice." J Virol **69**(10): 6158-69.
- Harreman, M. T., P. E. Cohen, et al. (2003). "Characterization of the auto-inhibitory sequence within the N-terminal domain of importin alpha." J Biol Chem **278**(24): 21361-9.
- Hartmann-Stuhler, C. and R. Prange (2001). "Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein." J Virol **75**(11): 5343-51.
- Hartmann, E. and D. Gorlich (1995). "A Ran-binding motif in nuclear pore proteins." Trends Cell Biol **5**(5): 192-3.
- Hetzer, M. W., T. C. Walther et al (2005). "Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery." Ann Rev Cell Dev Biol **21**: 347-80.
- Holaska, J. M., B. E. Black, et al. (2001). "Calreticulin Is a receptor for nuclear export." J Cell Biol **152**(1): 127-40.
- Huang, C., M. H. Xie, et al. (2011). "A structured RNA in hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element represses alternative splicing in a sequence-independent and position-dependent manner." FEBS J.
- Huang, Z. M. and T. S. Yen (1995). "Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts." Mol Cell Biol **15**(7): 3864-9.
- Huang, Z. M., W. Q. Zang, et al. (1996). "Cellular proteins that bind to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element." Virology **217**(2): 573-81.
- Huovila, A. P., A. M. Eder, et al. (1992). "Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment." J Cell Biol **118**(6): 1305-20.
- Hwang, Y.K., N.K. Kim et al. (2002). "HLA-A2 1 restricted peptides from the HBx antigen induce specific CTL responses in vitro and in vivo." Vaccine **20**(31-32): 3770-7.
- Inchauspe, G. and M. L. Michel (2007). "Vaccines and immunotherapies against hepatitis B and hepatitis C viruses." J Viral Hepat **14 Suppl 1**: 97-103.
- Izaurrealde, E., U. Kutay, et al. (1997). "The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus." EMBO J **16**(21): 6535-47.
- Jakel, S. and D. Gorlich (1998). "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells." EMBO J **17**(15): 4491-502.
- Jilbert, A.R., Mason W.S., Kann M. (2008). "Hepatitis B virus replication." Hepatitis B virus Lai C.L., Locarnini S. International Medical Press (1): 4 1-13.

- Kalderon, D., B. L. Roberts, et al. (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." Cell **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kane, M. A. (1996). "Global status of hepatitis B immunisation." Lancet **348**(9029): 696.
- Kann M and W. H. Gerlich (1997). Replication of hepatitis B virus. In *The Molecular Medicine of Hepatitis*; pp. 63–77. Edited by TJ Harrison & A Zuckerman. New York: John Wiley & Sons.
- Kann, M. and W. H. Gerlich (1994). "Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus." J Virol **68**(12): 7993-8000.
- Kann, M., A. Schmitz, et al. (2007). "Intracellular transport of hepatitis B virus." World J Gastroenterol **13**(1): 39-47.
- Kann, M., B. Sodeik, et al. (1999). "Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex." J Cell Biol **145**(1): 45-55.
- Kann, M., R. Thomssen, et al. (1993). "Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus." Arch Virol Suppl **8**: 53-62.
- Katen, S. and A. Zlotnick (2009). "The thermodynamics of virus capsid assembly." Methods Enzymol **455**: 395-417.
- Kelly, D. and S. Skidmore (2002). "Hepatitis C-Z: recent advances." Arch Dis Child **86**(5): 339-43.
- Keminer, O. and R. Peters (1999). "Permeability of single nuclear pores." Biophys J **77**(1): 217-28.
- Khayat, R., L. Tang, et al. (2005). "Structure of an archaeal virus capsid protein reveals a common ancestry to eukaryotic and bacterial viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 18944-9.
- Kohler, M., C. Speck, et al. (1999). "Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import." Mol Cell Biol **19**(11): 7782-91.
- Krishnan, V. V., E. Y. Lau, et al. (2008). "Intramolecular cohesion of coils mediated by phenylalanine--glycine motifs in the natively unfolded domain of a nucleoporin." PLoS Comput Biol **4**(8): e1000145.
- Kutay, U., F. R. Bischoff, et al. (1997). "Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor." Cell **90**(6): 1061-71.

- Kutay, U., E. Izaurralde, et al. (1997). "Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex." EMBO J **16**(6): 1153-63.
- Kutay, U., G. Lipowsky, et al. (1998). "Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor." Mol Cell **1**(3): 359-69.
- Lambert, C., T. Doring, et al. (2007). "Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin." J Virol **81**(17): 9050-60.
- Lan, Y. T., J. Li, et al. (1999). "Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication." Virology **259**(2): 342-8.
- Le Duff, Y., M. Blanchet, et al. (2009). "The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent." J Virol **83**(23): 12443-51.
- Lee, J., M. K. Shin, et al. (2004). "Three novel cis-acting elements required for efficient plus-strand DNA synthesis of the hepatitis B virus genome." J Virol **78**(14): 7455-64.
- Li, H. C., E. Y. Huang, et al. (2010). "Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles." PLoS Pathog **6**(10): e1001162.
- Lipowsky, G., F. R. Bischoff, et al. (2000). "Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes." EMBO J **19**(16): 4362-71.
- Liu, J., A. J. Prunuske, et al. (2003). "The COPI complex functions in nuclear envelope breakdown and is recruited by the nucleoporin Nup153." Dev Cell **5**(3): 487-98.
- Liu, N., L. Ji, et al. (2004). "cis-Acting sequences that contribute to the synthesis of relaxed-circular DNA of human hepatitis B virus." J Virol **78**(2): 642-9.
- Lott, K. and G. Cingolani (2011). "The importin beta binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport." Biochim Biophys Acta **1813**(9): 1578-92.
- Lucifora, J., S. Arzberger et al. (2011). "Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after injection" J Hepatol.
- Lurman, A. (1885). "Eine Icterus epidemic." Berlin klin wochenschr **22**(20): 3.
- Macara, I. G. (2001). "Transport into and out of the nucleus." Microbiol Mol Biol Rev **65**(4): 570-94, table of contents.
- MacCallum, F. O. (1947). "Homologous serum hepatitis " Lancet **2**: 691.

- Macovei, A., C. Radulescu, et al. (2010). "Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells." J Virol **84**(1): 243-53.
- Malmassari, S., Y.C. Lone et al. (2005). "In vivo hierarchy of immunodominant and subdominant HLA-A\*0201-restricted T-cell epytopes of HBx antigen of hepatitis B virus." Microbes Infect **7**(4): 626-34.
- Mangold, C. M. and R. E. Streeck (1993). "Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein." J Virol **67**(8): 4588-97.
- Marcellin, P., T. Asselah, et al. (2005). "Treatment of chronic hepatitis B." J Viral Hepat **12**(4): 333-45.
- Martin K and A Helenius (1991). "Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus." J Virol **65**(1): 232-44.
- Mason, A., M. Wick et al. (1993). "Hepatitis B virus replication in diverse cell types during chroniqe hepatitis B virus infection." Hepatology **18**(4): 781-9.
- Maul, G. G. (1977). "The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution." Int Rev Cytol Suppl(6): 75-186.
- Maupas, P., A. Goudeau, et al. (1976). "Immunisation against hepatitis B in man." Lancet **1**(7974): 1367-70.
- Michael, W. M., M. Choi, et al. (1995). "A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway." Cell **83**(3): 415-22.
- Michael, W. M., P. S. Eder, et al. (1997). "The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein." EMBO J **16**(12): 3587-98.
- Moroianu, J. (1998). "Distinct nuclear import and export pathways mediated by members of the karyopherin beta family." J Cell Biochem **70**(2): 231-9.
- Moroianu, J., G. Blobel, et al. (1995). "Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 2008-11.
- Moroianu, J., G. Blobel, et al. (1997). "RanGTP-mediated nuclear export of karyopherin alpha involves its interaction with the nucleoporin Nup153". Proc Natl Acad Sci USA **94**(18): 9699-704.
- Muhlhausser, P., E. C. Muller, et al. (2001). "Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones." EMBO Rep **2**(8): 690-6.

- Mukherjee, S., M. V. Thorsteinsson, et al. (2008). "A quantitative description of in vitro assembly of human papillomavirus 16 virus-like particles." J Mol Biol **381**(1): 229-37.
- Nachury, M. V. and K. Weis (1999). "The direction of transport through the nuclear pore can be inverted." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9622-7.
- Nakielnny, S., S. Shaikh, et al. (1999). "Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain." EMBO J **18**(7): 1982-95.
- Neurath, A. R., N. Strick, et al. (1992). "Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein." J Exp Med **175**(2): 461-9.
- Ni, Y., J. Sonnabend, et al. (2010). "The pre-s2 domain of the hepatitis B virus is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected virus assembly." J Virol **84**(8): 3879-88.
- Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." Nature **386**(6627): 779-87.
- Palmeri, D. and M. H. Malim (1999). "Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha." Mol Cell Biol **19**(2): 1218-25.
- Pante, N., R. Bastos, et al. (1994). "Interactions and three-dimensional localization of a group of nuclear pore complex proteins." J Cell Biol **126**(3): 603-17.
- Pante, N. and M. Kann (2002). "Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm." Mol Biol Cell **13**(2): 425-34.
- Patel, S. S., B. J. Belmont, et al. (2007). "Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex." Cell **129**(1): 83-96.
- Patient, R., C. Hourieux, et al. (2009). "Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles." Cell Microbiol **11**(11): 1561-70.
- Patient, R., C. Hourieux, et al. (2007). "Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking." J Virol **81**(8): 3842-51.
- Peters, R. (2005). "Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality." Traffic **6**(5): 421-7.
- Plafker, K. and I. G. Macara (2000). "Facilitated nucleocytoplasmic shuttling of the Ran binding protein RanBP1." Mol Cell Biol **20**(10): 3510-21.

- Pollack, J. R. and D. Ganem (1994). "Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis." J Virol **68**(9): 5579-87.
- Pontisso, P., M. G. Ruvoletto, et al. (1992). "The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface." J Gen Virol **73** ( Pt 8): 2041-5.
- Prince, A. M. (1968). "An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis." Proc Natl Acad Sci U S A **60**(3): 814-21.
- Pujol, F. H., M. C. Navas, et al. (2009). "Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma." Cancer Lett **286**(1): 80-8.
- Rabe, B., D. Glebe, et al. (2006). "Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events." J Virol **80**(11): 5465-73.
- Rabe, B., A. Vlachou, et al. (2003). "Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9849-54.
- Ribbeck, K. and D. Gorlich (2001). "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes." EMBO J **20**(6): 1320-30.
- Ribbeck, K. and D. Gorlich (2002). "The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion." EMBO J **21**(11): 2664-71.
- Robbins, J., S. M. Dilworth, et al. (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." Cell **64**(3): 615-23.
- Roe, T., T. C. Reynolds et al. (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends of mitosis." EMBO J **12**(5): 2099-108.
- Roseman, A. M., J. A. Berriman, et al. (2005). "A structural model for maturation of the hepatitis B virus core." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15821-6.
- Rout, M. P., J. D. Aitchison, et al. (2003). "Virtual gating and nuclear transport: the hole picture." Trends Cell Biol **13**(12): 622-8.
- Rout, M. P., J. D. Aitchison, et al. (2000). "The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism." J Cell Biol **148**(4): 635-51.
- Rout, M. P. and G. Blobel (1993). "Isolation of the yeast nuclear pore complex." J Cell Biol **123**(4): 771-83.

- Ryu, D.K., S. Kim et al. (2008). "Hepatitis B virus polymerase suppresses translation of pregenomic RNA via a mechanism involving its interaction with 5' stem loop structure." Virology **373**(1): 112-23.
- Salfeld, J., E. Pfaff, et al. (1989). "Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus." J Virol **63**(2): 798-808.
- Schmitz, A., A. Schwarz, et al. "Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket." PLoS Pathog **6**(1): e1000741.
- Seeger, C. and W.S. Mason (2000). "Hepatitis B virus biology." Microbiol Mol Biol Rev **64**(1): 51-68.
- Seifer, M., S. Zhou, et al. (1993). "A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in xenopus oocytes." J virol **67**(1): 249-57.
- Shah, S. and D. J. Forbes (1998). "Separate nuclear import pathways converge on the nucleoporin Nup153 and can be dissected with dominant-negative inhibitors." Curr Biol **8**(25): 1376-86.
- Shah, S., S. Tugendreich, et al. (1998). "Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr." J Cell Biol **141**(1): 31-49.
- Shepard, C. W., E. P. Simard, et al. (2006). "Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination." Epidemiol Rev **28**: 112-25.
- Shim, H.Y., X. Quan et al. (2010). "Heat shock protein 90 facilitates formation of the HBV capsid via interacting with the HBV core protein dimers." Virology **410**(1):161-9.
- Siomi, H. and G. Dreyfuss (1995). "A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein." J Cell Biol **129**(3): 551-60.
- Siomi, M. C., P. S. Eder, et al. (1997). "Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins." J Cell Biol **138**(6): 1181-92.
- Smith, G. J., 3rd, J. E. Donello, et al. (1998). "The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function." Nucleic Acids Res **26**(21): 4818-27.
- Smythe, C., H. E. Jenkins, et al. (2000). "Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of Xenopus eggs." EMBO J **19**(15): 3918-31.

Stahl, M., M. Retzlaff, et al. (2007). "Chaperone activation of the hepadnaviral reverse transcriptase for template RNA binding is established by the Hsp70 and stimulated by the Hsp90 system." Nucleic Acids Res **35**(18): 6124-36.

Standring, D. N., J. H. Ou, et al. (1988). "A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(22): 8405-9.

Stannard, L. M., J. Moodie, et al. (1973). "Electron microscopic study of the distribution of the Australia antigen in individual sera of 50 serologically positive blood donors and two patients with serum hepatitis." J Clin Pathol **26**(3): 209-16.

Steggerda, S. M. and B. M. Paschal (2002). "Regulation of nuclear import and export by the GTPase Ran." Int Rev Cytol **217**: 41-91.

Steven, A. C., J. F. Conway, et al. (2005). "Structure, assembly, and antigenicity of hepatitis B virus capsid proteins." Adv Virus Res **64**: 125-64.

Stoffler, D., B. Feja, et al. (2003). "Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport." J Mol Biol **328**(1): 119-30.

Strawn, L. A., T. Shen, et al. (2004). "Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport." Nat Cell Biol **6**(3): 197-206.

Sukegawa, J. and G. Blobel (1993). "A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm." Cell **72**(1): 29-38.

Thompson, A., S. Locarnini, et al. (2007). "The natural history and the staging of chronic hepatitis B: time for reevaluation of the virus-host relationship based on molecular virology and immunopathogenesis considerations?" Gastroenterology **133**(3): 1031-5.

Tran, E. J. and S. R. Wentz (2006). "Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge." Cell **125**(6): 1041-53.

Ullman, K. S., S. Shah, et al. (1999). "The nucleoporin nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export." Mol Biol Cell **10**(3): 649-64.

Walter, E., R. Keist, et al. (1996). "Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocyte in vitro and in vivo" Hepatology **24**(1): 1-5.

Walther, T. C., M. Fornerod, et al. (2001). "The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins." EMBO J **20**(20): 5703-14.

Walther, T. C., H. S. Pickersgill, et al. (2002). "The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import." J Cell Biol **158**(1): 63-77.

Wen, W., J. L. Meinkoth, et al. (1995). "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus." Cell **82**(3): 463-73.

Wittkop, L., A. Schwarz, et al. "Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation." Cell Microbiol.

Wynne, S. A., R. A. Crowther, et al. (1999). "The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid." Mol Cell **3**(6): 771-80.

Yeh,C.T.,Y.F. Liaw, et al. (1990). "The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport." J Virol **64**(12): 6141-7.

Zeitler, B. and K. Weis (2004). "The FG-repeat asymmetry of the nuclear pore complex is dispensable for bulk nucleocytoplasmic transport in vivo." J Cell Biol **167**(4): 583-90.

Zhou, S. and D. N. Standring (1992). "Cys residues of the hepatitis B virus capsid protein are not essential for the assembly of viral core particles but can influence their stability." J Virol **66**(9): 5393-8.

Zlotnick, A., N. Cheng, et al. (1996). "Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein." Biochemistry **35**(23): 7412-21.

Zlotnick, A., J. M. Johnson, et al. (1999). "A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly." Biochemistry **38**(44): 14644-52.

Zoulim, F. (2005). "New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA." J Hepatol **42**(3): 302-8.

Zoulim, F., J. Saputelli, et al (1994). "Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo." J Virol **68**(3):2026-30.