



HAL
open science

Analyse du transport intracytoplasmique de la capsidie du virus de l'hépatite B : analyse des interactions entre les capsides du VHB et les chaînes du complexe de la dynéine

Quentin Osseman

► To cite this version:

Quentin Osseman. Analyse du transport intracytoplasmique de la capsidie du virus de l'hépatite B : analyse des interactions entre les capsides du VHB et les chaînes du complexe de la dynéine. Immunologie. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0304 . tel-01176843

HAL Id: tel-01176843

<https://theses.hal.science/tel-01176843>

Submitted on 16 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE sciences de la vie et de la santé
SPÉCIALITÉ Microbiologie-immunologie

Par Quentin OSSEMAN

Analyse du transport intracytoplasmique de la capsidie du virus de l'hépatite B

**Analyse des interactions entre les capsides du VHB et les chaînes du
complexe de la dynéine**

Sous la direction du Pr. Michael, KANN

Soutenue le 17 décembre 2014

Membres du jury :

Dr. Éric CHEVET	DR INSERM, Université de Bordeaux	Président
Pr. Jean Michel ROSSIGNOL	Université Paris Sud	Rapporteur
Pr. Christian POÛS	Université Paris Sud	Rapporteur
Dr. Franck PEREZ	DR CNRS, Institut Curie	Examineur
Dr. Alessia ZAMBORLINI	MCU, Cnam	Examineur
Pr. Michael KANN	Université de Bordeaux	Directeur de thèse

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. »

Aristote

Analyse des interactions entre les capsides du VHB et les chaînes du complexe de la dynéine

Le virus de l'hépatite B (VHB) utilise la machinerie transcriptionnelle nucléaire pour sa réplication. Le génome viral est transporté de la périphérie cellulaire à l'enveloppe nucléaire. Généralement, ce transport intracytoplasmique rétrograde est facilité par le réseau de Mt via l'utilisation du complexe moteur de la dynéine. Nous avons montré que le transport des capsides du VHB dépend des Mt, ce qui permet l'adressage des capsides aux complexes du pore nucléaire (NPC) ; lequel est requis pour l'étape de libération du génome de la capside dans le noyau.

Dans cette étude, nous avons utilisé des capsides provenant de virus récupérés dans du surnageant de HepG2.2.15, qui contiennent le génome mature partiellement double brin (capsides matures), et des capsides exprimées chez *E.coli*. Ces dernières sont utilisées telles quelles, capsides *E.coli* contenant de l'ARN, ou bien sont utilisées pour préparer des capsides vides. Après microinjection dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, nous avons observé que les capsides vides et les capsides matures sont transloquées aux NPC avec une cinétique similaire. Les capsides contenant de l'ARN ne sont pas identifiées aux NPCs ce qui implique que le transport des deux autres types de capsides est actif. Cela a été confirmé par la pré-injection d'anticorps anti tubuline qui neutralisent le transport assuré par les Mt.

L'attachement spécifique des capsides matures et vides aux Mt a été confirmé en utilisant des Mt polymérisés *in vitro*, nous avons montré que cette interaction nécessitait des protéines cytosoliques. En utilisant des expériences de coimmunoprécipitation et de cosédimentation nous avons identifié une chaîne légère de la dynéine (DynLL1 membre de la famille Lc8) comme partenaire des capsides. Dans les expériences de microinjection, la comicroinjection d'un excès de DynLL1 avec les capsides inhibe leur transport vers les NPCs, indiquant que DynLL1 est impliquée dans le transport actif des capsides.

DynLL2 qui n'interagit pas avec les capsides diffère de DynLL1 de seulement six acides aminés. Par mutagenèse dirigée de DynLL1, nous avons montré l'implication de deux acides aminés dans l'interaction directe avec les capsides. Ces deux acides aminés sont présents à la surface du dimère de DynLL1 et absents dans le sillon résultant de la dimérisation de DynLL1, sillon impliqué dans l'interaction avec la DynIC. Nous avons partiellement reconstitué le complexe DynIC, DynLL1 et capsides vides qui doit en partie refléter la situation *in vivo*.

Mots clés : virus de l'hépatite B, capsides, Microtubule, Dynéine, transport cytoplasmique

Analysis of interactions between HBV capsids and the chains of the dynein motor complex

Hepatitis B virus (HBV) needs the nuclear transcription machinery for replication. The virus thus depends on the transport of its genome from the cell periphery to the nuclear envelope. In general this retrograde intracytoplasmic trafficking is facilitated along Mt (MT) using motor protein complexes of the dynein family. As we showed earlier HBV capsid transport also depends upon intact MT in order to allow their arrival at the nuclear pores, which in turn is required for genome liberation from the capsid.

In the analysis we used virus-derived HBV capsids obtained from the supernatant of HepG2.2.15, which contain the mature partially double-stranded DNA genome (mature capsids) and capsids expressed in *E. coli*. The latter were applied in two forms: as unspecific *E. coli* RNA- containing capsids and as empty capsids. Upon microinjection into *Xenopus laevis* oocytes we observed that mature and empty capsids were translocated to the nuclear pores with a similar kinetic. RNA-containing capsids failed to arrive at the pores implying that transport of the two other capsid types was active. Active translocation was confirmed by pre-injecting anti tubulin antibodies which interfere with MT-mediated translocation.

In vitro reconstitution assays confirmed the specific attachment of mature and empty capsids to MTs and showed the need of further cytosolic proteins. Using pull-down and co-sedimentation experiments we identified one dynein light chain (DYNLL1, member of the Lc8 family) as interaction partner of the capsids. Injecting an excess of recombinant DYNLL1 with empty capsids into *Xenopus laevis* oocytes inhibited capsid transport to the nuclear pores indicating that DYNLL1 was only functional interaction partner implied in active transport.

DYNLL2 did not interact with the capsids although differing from DYNLL1 by just six amino acids. Site directed mutagenesis of DYNLL1 revealed that two amino acids were critical for a direct interaction with the capsids. Both localized at the exterior of the DYNLL1 dimer and not in the groove of DYNLL1, which interacts with the dynein intermediate chain. Accordingly we could reconstitute a complex consisting of empty capsids, DYNLL1 and dynein intermediate chain as it should be in the *in vivo* situation.

Keywords : hepatitis B virus, capsids, Microtubule, Dynein, cytoplasmic transport

Remerciements

C'est le début de la fin, en effet l'écriture de mes remerciements intervient après la soutenance. Ceux-ci viennent donc ponctuer la finalisation de ce travail d'écriture après y avoir apporté quelques corrections mais aussi pour remercier toutes celles et ceux qui ont participé à mon aventure en terre bordelaise.

Dans un premier temps, je voudrais remercier tous les membres du jury pour leur implication dans la lecture du manuscrit et les questions qui m'ont été adressées le jour de la soutenance. Cela m'a permis d'atteindre mon objectif personnel qui était d'avoir une discussion de mes résultats. Merci au docteur Alessia Zamborlini pour vos questions lors de la soutenance. Merci au docteur Eric Chevet d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse. Nos chemins se sont croisés très précocement en étant nommé par l'école doctorale comme mon tuteur de thèse, j'ai beaucoup apprécié nos entretiens pendant ces quatre années mais surtout au début de ma thèse ce qui m'a permis de prendre un peu de recul vis-à-vis des premiers résultats. Merci à Jean Michel Rossignol pour cette version PDF du manuscrit de thèse où la moindre faute d'orthographe, faute de frappe, ou phrase mal construite a été traquée mais également pour vos questions et encouragements lors de la soutenance. Merci au professeur Christian Poüs et au docteur Franck Perez de m'avoir fait entrevoir une vision moins « scolaire » du réseau de microtubule. Merci à vous tous d'avoir donné de votre temps dans l'évaluation de ce travail.

Merci Michael pour ces quatre ans, bien que je sois hiérarchiquement considéré comme « ton » étudiant en thèse tu m'as très rapidement considéré comme un « chercheur » à part entière. J'ai beaucoup apprécié nos discussions des résultats, nos spéculations sur des modèles, la biblio HBV spécifique où j'ai beaucoup appris et celles plutôt bio cell où j'espère t'avoir apporté quelques nouvelles connaissances. Merci de m'avoir fait confiance il y a 4 ans en sortant d'un stage de M2 en parasito / immuno pour faire de la viro / bio cell. Je savais qu'en faisant ma thèse avec toi j'apprendrai beaucoup. Merci pour la confiance que tu as eue en me permettant d'encadrer des étudiants, en m'impliquant dans l'écriture des appels d'offres, en me laissant du temps pour le hors thèse (formations, association etc) et surtout en encourageant systématiquement mes embryons d'idées de collaboration, de nouvelles manips, de participation aux congrès...

Bien évidemment les remerciements qui suivent sont pour un duo de choc Aurélia / Jessica. Aurélia, tu as été en première ligne pour les bons résultats mais aussi les mauvais, tout le temps présente quand je me posais des questions. Merci pour ton aide lors de la préparation des présentations, la mise en place des manips, mais également de ta disponibilité pour juste discuter et un immense merci pour ces dernières semaines et le temps que tu as passé dans la relecture de ce manuscrit. Je garderai précieusement le diplôme de « docteur bricoleur déménageur multi services » que tu m'as décerné !

Jessica, ton aide de tous les moments depuis 4 ans m'a été précieuse. Elle a été croissante au cours de ma thèse. Tout simplement au départ pour des cellules puis plus récemment dans des purifications de protéine, construction de plasmide... Merci pour tout, depuis qu'on a déménagé de notre troisième étage, nous nous sommes

retrouvés comme voisin de paillasse, sache que tu as été une voisine de paillasse et une collègue idéale ; ne changes pas, continue et fais toi confiance !

Merci Christian pour ton rôle dans la correction des manuscrits (de cette thèse, mais également des appels d'offres ...). Tu as été pendant quatre ans une source d'informations importante surtout pour me faire découvrir des papiers princeps la plus part du temps antérieur à ma naissance. Merci pour ton aide lorsque j'en ai eu besoin (radioactivité, P3...) et de m'avoir laissé t'emprunter « le canard du mercredi ».

Les prochains remerciements sont destinés aux étudiants qui ont intégré l'équipe HBV lors de leurs stages. Par ordre : merci Elodie pour ton aide lorsque le projet a démarré, sans ce gros travail de purification de protéines, je n'en serais peut-être pas là aujourd'hui. Merci Jérôme, je garderai en mémoire les galères de Western Blot avec cette chaine intermédiaire mais on a fini par y arriver et merci Chloé pour ton « implication surmotivée » dans la caractérisation des cellules énucléées.

Merci à ceux qui ont été membres de l'équipe HBV : Mildred nous nous étions rencontrés lors des TP de Master 1 quand j'étais étudiant, merci pour ton aide pour y voir plus clair au milieu de toutes ces capsides quand j'ai débarqué au labo. Merci Somar pour nos discussions Immuno/HBV. Aurélie, on l'aura enfin publié ce papier ! Merci Sébastien, bien que tu sois à mi-temps entre Bordeaux et Montpellier, je dois avouer que je rigolais un peu plus lorsque tu étais à Bordeaux ! Tu m'as permis de mettre un orteil lors des enseignements de master. Merci Dominique, bien que tu ne sois pas étiqueté HBV tu as eu un rôle important dans les constructions des mutants. Merci Kenza, depuis tes stages en licence et M1 sur HBV tu es maintenant aux prises avec le parvovirus au pays du soleil levant, tu m'auras bien aidé quand j'ai mis un doigt dans la biologie du AAV...

I have to thank Nelly and especially Shelly, for your contribution in oocytes microinjection. Thank you Shelly, because you continued the EM acquisitions after my departure. After quantification and data's digestion. We obtained all this *in cellulo* important results. Nelly, this two months visit in your lab still in my memory. I would like to thank all the team: Lixin, Wei, Maria, Nikta, Jonathan and Pierre for your help in the lab and in UBC/Vancouver geography, sushis degustation and discussions...

J'aimerais également remercier nos collaborateurs : B. Sodeik pour les plasmides permettant l'expression des différentes chaînes de la dynéine, le professeur P. Pumpens pour les préparations de capsides données dès que nous en avons besoin. J'en profite également pour remercier Daniel Brethes et Manuel Rojo pour le prêt du rotor TLA100 que j'ai utilisé de nombreuses fois pour les cosédimentations. Pour m'avoir donné cette précieuse information lors de nos échanges à propos des microtubules, merci Benoit. Parce que la microscopie représente une part importante de ce projet merci à Nathalie Dugot Senant lorsque je rencontrais des soucis au confocal, à Sébastien Marais pour l'utilisation d'ImageJ et à Sabrina Lacomme pour les clichés en TEM de nos capsides vides.

Merci aux « adénos », bien que nos labos soient séparés au tout début cela n'a pas empêché depuis que nous sommes réunis en un seul endroit de créer cette émulation et cette bonne ambiance. Merci Harry pour tes questions aux labmeetings et ton aide lorsque j'en avais besoin. Fabienne, ou plutôt « Shiva » avec 8 bras et

cette capacité à lancer un paquet de manip en un temps réduit, merci de ta pédagogie et de m'avoir impliqué dans les TD et TP des masters pendant deux années. Tetsuro, you showed me what it means to make bibliography. Merci Marie Edith pour ta gentillesse, ton humilité, tes anecdotes. Muriel, tu auras été une source incroyable de bouquins et d'auteurs que je n'avais pas lus (certains le reste encore !) et merci Cindy pour ton coup de main sur la macro coloc. Les Adénos suivants et pas les moins importants tant ils ont tous été présents au cours de ces quatre années. Merci Ruben quand on s'est retrouvé pendant nos thèses à déménager deux demi labos pour n'en faire qu'un, nos échanges de bon plans software, réunions associatives au pub etc. Merci Rémi, après ton retour d'Allemagne j'ai retrouvé un voisin de bureau compatriote du nord ! Merci pour ton aide, nos discussions sérieuses et moins sérieuses, les pubs quizz et tout le reste ! Mes remerciements suivant iront aux dernières arrivées: Merci Sisley, pour tes questions en M2 même si à posteriori tu les trouves idiotes, j'arriverai peut être à me souvenir des quelques trucs équestres que tu as pris le temps de m'expliquer ! Merci Charlotte, tu es arrivée hyper motivée en M2, je garderai en souvenir que tu fais toujours partie des premières pour aller boire une pinte au pub. Merci Irene, plutôt discrète au tout début, avec ton accent ensoleillé j'identifiais facilement quand tu parlais. J'ai apprécié avoir été dans le même bureau que vous trois et j'en garderai de très bons souvenirs. Bon courage à vous pour la suite et fin de vos thèses.

Pendant un peu plus d'une année, j'ai eu la joie de travailler au troisième étage à coté de vous : Cathy, Corinne, Laure, Françoise, Véro. Merci à vous toutes pour votre accueil lorsque je suis arrivé et pour vos sourires, histoires, compagnies... et même si ce n'était pas « la même génération » (petite anecdote d'un de nos déjeuners !!!) et si certaines d'entre vous ont également déménagé depuis, j'ai toujours apprécié venir vous voir. Merci Fatima, la cellule a pris place dans nos anciennes pièces et a grandis, merci pour ta disponibilité quand je venais te mobiliser pour des interventions lors des événements organisés par l'association et ton soutien pour mon dernier congrès.

Isabelle, dès les premiers jours j'ai vite identifié une compatriote ch'ti (tout cela à cause d'un fanion dans ton bureau) merci pour tout ce que tu as fait administrativement et non administrativement parlant car je suis venu régulièrement au cours de ces quatre ans. Merci encore car tu ne m'as jamais « fouttu à l'uch » et oui je n'ai pas l'accent mais je connais quelques expressions bien de chez nous !

Je voudrais également remercier tous les membres de l'unité en commençant par les thésards passés (Ophélie, Paul, Fabien, Benoit, Sofiane), présents (Anaïs, Chloé, Aytham). Ainsi que les jeunes retraités Thérèse et Michel C. Merci à Cyril et Christina qui m'ont parfois dépanné respectivement en logiciel et matériel. Merci à tous les autres avec qui j'ai pu interagir pendant ma thèse : Simon, Michel, Vincent, Marie-line, Jacqueline, sans oublié Hamid, Nathalie et surtout Cathy pour ce que tu fais pour nous tous les jours. Cela facilite grandement la mise en place de nos expériences. Je remercie Pathy P, Jennifer, Pantxika, Valérie vous êtes devenues nos nouvelles voisines du déjeuner suite à notre déménagement Vos histoires, anecdotes, blagues et débats ont égayé et rendu très comique nos déjeuners. J'ai une pensé également pour ceux qui sont partis : Pathy L. lorsque l'on s'est pris la tête sur les profils de mes protéines, Loïc pour les tuyaux spots de surf qu'on s'est partagé et tous les autres.

Parce que cette thèse finalement résulte aussi un peu de mon master, j'en remercie l'équipe pédagogique mais plus particulièrement Thierry pour les conseils que tu m'as donnés pendant les 2 années de Master. Merci Denis de m'avoir dit oui en stage de M1 et de m'avoir fait découvrir la vie de labo. Cette expérience a initié mon envie d'essayer de faire une thèse. Je remercie toute l'équipe dans laquelle j'ai vécu pendant ces deux mois, Nico 2, Célia, et Derrick dont je n'oublie pas les conseils quand je réalise un poster encore aujourd'hui. Mélanie, je t'embêtais régulièrement lorsque Denis était en enseignement, merci pour tout ce que tu as fait à ce moment-là mais également merci pour tout depuis ce M1. Il n'a pas manqué grand-chose pour que je fasse ma thèse sous ta direction, j'ai quand même continué à t'embêter en venant régulièrement demander des infos, des réactifs etc. Plus largement, je remercie toutes les personnes de parasito/myco.

Je ne peux m'empêcher d'avoir une pensée pour Charlotte Behr qui m'a accueilli et encadré en M2 et m'a permis d'acquérir de la rigueur dans ma démarche intellectuelle. Je remercie également les membres de l'équipe à l'époque : Giulia, Marianne, Cécile et Julien pour votre aide à la paillasse, en culture, au cytomètre... Merci Séverine pour ton temps, ton investissement, tes corrections de fautes d'orthographe et toute l'aide que tu m'as apportée. Je me suis plu au CIRID pendant ces quelques mois et j'en remercie tout le monde et plus particulièrement Jean François Moreau. Julie, tu as eu un rôle très important avant, pendant et après le concours, je n'oublie pas cette demande de financement que tu as faite dès le lendemain des résultats et ta compréhension lorsque je t'ai fait part de l'opportunité de cette thèse avec Michael, merci pour tout.

Parce qu'il n'y a pas eu que la thèse pendant quatre ans mais aussi un investissement associatif, je voudrais remercier tous ceux que j'y ai côtoyés au fur et à mesure des années au sein des doc 66 qui sont devenus les TBM doc's. Nous avons réussi à organiser les événements que nous nous étions fixés parfois de justesse. Merci à vous tous Marianne, Ruben, Edgar, Emilie, Rémi, Aurore, Laure, Alice, Emilie, Anne Sophie, Kévin, Antonin... Merci à Virginie Rocher pour son aide et à Jean Rosenbaum de nous avoir fait confiance. Merci aux autres assos avec qui nous avons collaboré sur certains projets.

Merci aux quelques Lillois qui sont restés présents après mon départ vers Bordeaux Alix, Audrey et Maxime. Merci Jean-Marc, tu as été l'un des premiers contacts bordelais hors université, entre matchs de hockey, matchs de rugby, badminton, discussions vidéo-ludiques, cinématographiques et littéraires les raisons pour ne pas penser à la thèse n'ont pas manqué avec toi ! Un merci à Ketty d'avoir pris un peu de temps pour corriger certaines parties de ce manuscrit. Merci, les potes de promo du master Benoit, Clément, Stéphane j'aurai fait un an de rab pendant que vous continuiez chacun de votre côté, merci pour ces années où l'on a sauvé plein de ballons et pris de sacrés rouleaux !

Merci à ma famille d'avoir été présente les rares fois où je prenais le temps de revenir dans le nord. Merci à mes parents de ne m'avoir encouragé à poursuivre mes projets même lorsque ceux-ci impliquaient un déménagement à 800 km. Cindy, Déborath (j'inclus Manu : l'un n'allant pas sans l'autre), Mickael vous vous êtes débrouillés pour venir me voir plusieurs fois et cela me faisait du bien, vous êtes des sœurs et frère géniaux. Il va falloir songer à prendre l'avion pour venir me voir sur la prochaine destination ! Merci au reste de ma famille : mes grands-mères et tous les

autres pour avoir été là. Les repas de famille à 13 sont devenus des repas de famille à 20 et on parvient toujours à s'y réunir donc merci à Laurie, Tété, Françoise, Didier, Cécilia, Mathieu, Cédric, Corentin, et un merci un peu plus prononcé pour toi Mélanie car tu auras lu quasiment l'intégralité de cette thèse sans rien y comprendre !

Ce dernier MERCI sera pour Julie, nous avons débarqué ensemble à Bordeaux ! Merci de ta compréhension quand j'ai voulu quitter Lille. Six ans plus tard on peut se dire que nous avons fait le bon choix ! J'en profite pour remercier ta famille et tes amies qui sont devenues un peu les miennes. Tu as toujours été derrière moi. Quand j'avais ces horaires particuliers en M2, lorsque j'ai prospecté un peu partout en France pour trouver une thèse même si ces pistes impliquaient des déménagements. Tu m'as encouragé lorsque j'ai eu des opportunités de conférences et de collaborations même si cela entraînaient une absence de plusieurs semaines. Notre chapitre dans le sud-ouest se clôt, à nous de trouver où nous écrirons le prochain.

Avant-propos

Malgré un vaccin efficace, plus de 250 millions d'individus vivent avec le Virus de l'Hépatite B (VHB) et on comptabilise 500000 à 700000 décès associés au virus chaque année. Le VHB est considéré par l'OMS comme une priorité de santé publique majeure. Sans effet cytopathogène, les maladies induites par le VHB sont liées à la réponse immunitaire contre les cellules infectées. Les traitements administrés visent à augmenter la réponse immunitaire et/ou inhiber la réplication du virus. Ces traitements ne sont pas spécifiques du VHB et par conséquent pas toujours efficaces. C'est pourquoi la recherche fondamentale sur le VHB est nécessaire afin de mieux comprendre le cycle de réplication du virus et de comprendre la pathologie associée au VHB.

Notre équipe travaille sur les étapes précoces de l'infection. Sous cette étiquette « étape précoce » nous étudions plus exactement « l'entrée des virus ». Le VHB doit pendant son cycle viral passer par le noyau pour que le virus puisse se répliquer. L'entrée du VHB est donc un enchaînement de mécanismes cellulaires détournés/utilisés par le virus pour s'attacher aux cellules, y pénétrer, être transporté dans le cytoplasme jusqu'à la périphérie nucléaire puis être transloqué dans le noyau. Le transport cytoplasmique est donc requis pour la pathogénèse.

Ce n'est que très récemment que la communauté scientifique a effectué des progrès significatifs dans la compréhension du mécanisme d'entrée du VHB dans les cellules hépatiques en identifiant le NTCP, comme un récepteur. Les mécanismes permettant l'entrée des virus (endocytose) et la libération des capsides dans le cytoplasme restent à ce jour peu documentés. Si l'on considère la taille des capsides (36nm) ainsi que la viscosité du cytoplasme, beaucoup plus élevée que celle de l'eau en raison de ses différents constituants, le transport cytoplasmique ne peut s'expliquer par une diffusion passive des particules virales et des cargos (Luby-Phelps 1994; Luby-Phelps 2000; Luby-Phelps 2013). Nous avons montré que ce transport du VHB est un mécanisme actif dépendant du réseau de Mt (Rabe et al 2006). L'utilisation du réseau de Mt par les capsides du VHB est un concept admis dans la communauté scientifique, cependant aucun détail n'est connu concernant les modalités de transport cytoplasmique. J'ai donc essayé de comprendre comment les capsides étaient transportées dans le cytoplasme. Pour ce travail j'ai utilisé différentes

préparations de capsides soit purifiées à partir de cellules eucaryotes soit des capsides recombinantes exprimées dans un système hétérologue.

Dans un premier temps, j'ai essayé de déterminer le rôle des Mt dans ce transport. Sont-ils les transporteurs *via* une interaction directe ? Les capsides du VHB utilisent la dynamique des Mt *via* le mécanisme de tapis roulant (treadmilling) ou la polymérisation/dépolymérisation des Mt. Si les Mt ne sont que le support du transport cela suggère un hypothétique rôle des protéines associées aux Mt (MAPs). Parmi les différentes MAPs, est-ce les MAPs stabilisatrices et régulatrices qui ont un rôle dans le transport des capsides du VHB ? Ou alors le virus détourne-t-il les transporteurs cellulaires des Mt ; les MAPs motrices dont font partie les complexes de la kinésine et de la dynéine ? Dans ce manuscrit de thèse figurera dans l'introduction la présentation du cytosquelette cellulaire, et plus précisément du réseau de Mt ainsi que les protéines associées aux Mt. Dans une seconde, partie sera présenté le Virus de l'hépatite B d'un point de vue biochimique, puis de manière plus globale en présentant le cycle viral du VHB.

Sommaire

Remerciements	5
Sommaire	12
Liste des abréviations :	16
Liste des figures :	18
Liste des tableaux :	21
Introduction.....	22
PARTIE I : le cytosquelette cellulaire.....	23
I : Les filaments d'actine.....	24
II : Les filaments intermédiaires.....	25
III : Le réseau de Mt.....	26
IV : Structure des Mt.....	26
IV.1 : Tubuline et polymérisation des Mt.....	26
IV.2: Organisation structurale des Mt.....	28
IV.3 : Dynamiques des Mt.....	29
IV.4 : Les Mt <i>in vivo</i>	33
IV.5 : Fonctions des Mt.....	35
IV.6 : Microtubules <i>in vitro</i>	36
V : Les MAPs :	36
V.1 : Les MAP structurales	36
V.2 : MAP motrice : la complexe de la Kinésine.....	37
V.3 : MAP motrice : le complexe de la Dynéine.....	39
V.3.1 : Différentes isoformes de dynéine cytoplasmique.....	39
V.3.3 : Structure et composition.....	41
V.3.4 : Les chaînes légères	43
V.3.4 : Interactions DynIC DynLC cargos	49
V.3.4 : La dynactine : le complexe adaptateur	51
VI : Import nucléaire (introduction)	52
PARTIE II : le virus de l'hépatite B.....	55
I : Historique.....	55
II : Taxonomie, prévalence, transmission et évolution de la maladie.....	55
III : Vaccin et traitement.....	57
IV : Biologie moléculaire du virus de l'hépatite B.....	59
IV.1 : Structure des virions.....	59
IV.2 : Génome viral	60
IV.3 : Protéines structurales.....	62
IV.3.1 : Protéines de l'enveloppe.....	62
IV.3.2: Protéine HBc et capsides.....	64
IV.4 : Protéines non structurales	67
	12

IV.4.1 : Polymérase virale.....	68
IV.4.2 : Protéine HbX	69
IV.4.3: Protéine préHBc et antigène HBe	69
V: Cycle de réplication du VHB.....	70
V.1 : Entrée du virus	72
V.2 : Migration de la capsid via le réseau de Mt.....	73
V.3 : Import nucléaire et libération du génome	74
V.4 : Réparation et conversion du génome viral.....	75
V.6 : Transport des ARN viraux dans le cytoplasme.....	76
V.7 : Formation de la capsid et encapsidation de l'ARNpg	77
V.8 : Rétro-transcription de l'ARNpg.....	77
V.8.1 : Initiation et synthèse du brin long d'ADN négatif	77
V.8.2 : Synthèse du brin positif.....	78
V.9 : Enveloppement des capsides et bourgeonnement des particules virales	79
Objectif de l'étude	81
Matériels et méthodes	83
Matériels :	84
<i>I : Produits chimiques et matériels.....</i>	<i>84</i>
<i>II : Culture cellulaire et bactérienne</i>	<i>85</i>
<i>IV : Plasmides</i>	<i>86</i>
<i>V : Amorces pour séquençage et mutagénèse.....</i>	<i>87</i>
<i>VI : Anticorps</i>	<i>88</i>
<i>VII : Appareils et Kits</i>	<i>89</i>
<i>VIII : Tampons :</i>	<i>90</i>
Méthodes :	91
<i>II : Partie Biologie moléculaire :</i>	<i>91</i>
I.1 : Transformation des bactéries.....	91
I.2 : Amplification et purification des plasmides.....	92
I.3 : Digestion enzymatique des plasmides	92
I.4 : Mutagénèse.....	92
I.4 : Séquençage	93
I.5 : Gel d'agarose.....	94
<i>II : Partie Biochimie :</i>	<i>94</i>
II.1 : Induction et surexpression des protéines.....	94
II.2 : Purification des protéines.....	95
II.3 : Dosage protéique.....	95
II.3.1 : Par la méthode de Bradford	95
II.3.2 : Au NanoDrop.....	96
II.4 : Électrophorèse et transfert	96
II.1.2: Gel d'agarose en condition native (NAGE).....	96
II.1.3 Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS PAGE).....	96

II.1.5: Marquage au bleu de Coomassie.....	97
II.1.4: Transfert.....	98
II.1.5: Western blot.....	99
II.1.6: Révélation (ECL) et acquisitions.....	99
II.2 : Capsides	100
II.2.1 : Préparation de capsides matures (HepG2.2.15).....	100
II.2.2 : Capsides vides : traitement RNaseA.....	100
II.3 : Polymérisation <i>in vitro</i> des Mt.....	101
II.4 : Co immuno précipitation.....	102
II.5 : Co sédimentation.....	103
III Partie Biologie cellulaire.....	103
III.1 : Conditions de culture cellulaire	103
III.1.1 : Culture des cellules BSL2	103
III.1.3 : Culture des HepG2.2.15.....	104
III.2 : Microinjection U2OS	105
III.3 : Enucléation des cellules	106
III.4 : Immunofluorescence	106
III.5 : Microscopie.....	107
III.6 : Préparation des ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	108
III.7 : Injection des ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	108
III.8 : Inclusion des ovocytes en résine.....	109
III.9 : Coupe au microtome et observation en microscopie électronique à transmission.....	110
Résultats.....	112
I : Caractérisation des capsides vides	113
I.1 : Digestion de l'ARNm et réassemblage.....	113
I.2 : Stabilité des capsides vides.....	114
II : Transport cytoplasmique vers le noyau : expériences <i>in cellulo</i>	115
II.1 : Injection de capsides VHB dans des ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	115
II.1.1 : Localisation des capsides aux NPC	116
II.1.2 : Quantification des NPC et capsides.....	117
II.1.3 : Capsides et complexe du pore nucléaire (NPC).....	118
II.1.3 : Distribution des capsides aux NPC	120
II.1.3.1 : Distribution quantitative des capsides aux NPC.....	120
II.1.3.2 : Localisation des capsides dans le NPC	122
II.1.4 : Transport dans le cytoplasme	123
II.1.4.1 : Injection dans des ovocytes de xénope pré-injectés	123
II.1.4.2 : Micro injection dans les cellules U2OS	125
III : Capsides du VHB et Mt.....	127
III.1 Capside du VHB et Mt polymérisés <i>in vitro</i>	127
III.2 : Coimmunoprécipitation des capsides avec les Mt.....	129
IV : Dynéine : médiateur de l'interaction capside Mt	131
IV.1 : GST dynéine : production et purification des protéines recombinantes	131

IV.2 : Dimérisation des protéines purifiées : vers la formation d'un complexe	136
IV.3 : Interaction avec la capsid du VHB.....	137
IV.3.1 : Coïmmunoprécipitation	138
IV.3.2 : Cosédimentation.....	141
IV.4 ; La famille Lc8 LL1 / LL2 comparaisons.....	141
IV.5 : GST LL1 mutants : production et purification des protéines recombinantes	142
IV.6 : Dimérisation des protéines mutantes	143
IV.7 : Interactions avec la capsid du VHB	145
IV.8 : Formation de l'hétéro complexe dynéine-capsides.....	147
IV.8.1 : Clivage de GST LL1, purification de DynIC 295	147
IV.8.2 : Formation d'un hétérocomplexe : capsides + LL1 + DynIC 295.....	149
V : LL1 médiateur de l'interaction dynéine/capsides : conséquences <i>in vitro</i> et <i>in cellulo</i>	150
V.1 : Compétition <i>in vitro</i> (colocalisation de Mt / capsides)	150
V.2 : Compétition <i>in vivo</i> (microinjection d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>)	152
V.2.1 : Quantification des NPC et capsides.....	152
V.2.2 : Capsides et complexe du pore nucléaire (NPC)	153
VI : L'énigme du détachement des Mt les cellules énucléées nouvel outil d'analyse ?	154
VI.1 : Caractérisation des cellules énucléées.....	155
VI.2 : Infection des cellules énucléées	160
Conclusions discussion	162
Annexe	176
Appendice.....	190
Références bibliographiques	192

Liste des abréviations :

a.a.: acide aminé

AAA : ATPases Associated with various cellular Activities

ABPs : Actin Binding Proteins

Ac : Anticorps

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ADNccc : ADN circulaire covalamment clos

ADNrc : ADN relâché partiellement double brin

Ag: Antigène:

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm: ARN messenger

ARNpg: ARN pré-génomique

BAG : Boucle AntiGénique

GST: Glutathion S Transférase

HBc : protéine core du VHB

HBe ; Antigène HBe du VHB

HBx : protéine X du VHB

HC : Heavy chain

IC : Intermediate Chain

IF: Immuno Fluorescence

KIF : Kinesin Family member

LHBs : protéine de surface L du VHB

LIC : Light Intermediate Chain

MAPs : Microtubules Associated Protéins

MHBs : protéine de surface M du VHB

MHR : Major Hydrophilic loop

Mt : Microtubules

MTOC: Microtubule Organizing Center

NAGE: Native Agarose Gel Electrophoresis

NPC: Nuclear Pore Complex

Nup: Nucléopore

RRL : lysat de reticulocyte de lapin

RT: Room Temperature, temperature ambiante

SDS PAGE : Sodium DodécylSulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

SHBs : protéine de surface S du VHB

STOP proteines : Stable Tubule Only Polypeptide protéines

TEM : Microscopie Electronique à Transmission

VHB : Virus de l'Hépatite B

WB : Western Blot

Liste des figures :

Figure 1 : Cytosquelette cellulaire	23
Figure 2 : Constitution et structure d'un Mt.....	27
Figure 3 : Organisation des Mt : « lattices » A et B.....	28
Figure 4 : Nucléation de Mt via la structure γ -Turc.....	30
Figure 5 : Instabilité dynamique des Mt	31
Figure 6 : Vitesse de polymérisation des Mt	32
Figure 7 : Le treadmilling (tapis roulant).....	32
Figure 8 : Structures de la kinésine 1 et de la kinésine 2 :.....	38
Figure 9 : Structure du complexe de la dynéine cytoplasmique 1	41
Figure 10 : Domaines caractérisés de la DynIC	43
Figure 11 : Structures des DynLC : DynTctex1 et DynLL1 / DynRb	44
Figure 12 : Interaction cargo DynLc8 et DynTctex.....	50
Figure 13 : Interaction entre DynIC et les DynLC (DynTctex DynLc8 et DynRb).....	51
Figure 14 : Structure du complexe de la dynactine.....	52
Figure 15 : Structure du NPC	53
Figure 16 : Prévalence de l'Ag HBs dans le monde en 2005.....	56
Figure 17 : Développement chronique de l'infection en fonction de l'âge d'infection	57
Figure 18 : Particule de Dane, forme filamenteuse et sphérique	60
Figure 19 : Organisation des cadres de lecture du génome de VHB	61
Figure 20 : Modèles topologiques des trois protéines de surface.	63
Figure 21 : Protéine HBc du VHB	64
Figure 22 : Structures cristallographiques du monomère de HBc, du dimère et de la capsid	65
Figure 23 : La polymérase virale et ses différents domaines.....	68
Figure 24 : Cycle viral du VHB.....	71
Figure 25 : Import nucléaire des capsides du VHB.....	75
Figure 26 : Réparation du génome viral.....	76
Figure 27 : Réplication du génome de VHB.....	78
Figure 28 : Mutagenèse dirigée de Dyn LL1	93
Figure 29 : Montages du transfert liquide et du transfert sous vides	98
Figure 30 : Représentation schématique du protocole de cosédimentation	103

Figure 31 : Schéma du protocole d'énucléation de cellules.....	106
Figure 32 : Prélèvement des ovocytes et injection	109
Figure 33 : Inclusion des ovocytes injectés en résine EPON, coupe, et coloration positive	110
Figure 34 : Digestion de l'ARN des capsides <i>E.coli</i> et réassemblage des capsides	113
Figure 35 : Stabilité des capsides vides par observation en TEM	115
Figure 36 : Localisation des capsides aux NPC à 60 min.....	116
Figure 37 : Histogramme des pourcentages de NPC contenant au moins une capside	118
Figure 38 : Histogramme du nombre moyen de capsides par NPC.....	119
Figure 39 : Distribution qualitative des capsides au NPC	121
Figure 40 : Distribution des capsides au sein du NPC.....	122
Figure 41 : Localisation des capsides matures aux NPC dans des ovocytes pré injectés	124
Figure 42 : Immunofluorescence de cellules U2OS microinjectées avec des capsides vides	125
Figure 43 : IF de cellules U2OS microinjectées avec des capsides ARN <i>E.coli</i>	126
Figure 44 : IF de cellules U2OS microinjectées avec des capsides ARN <i>E.coli</i>	127
Figure 45 : Colocalisation de Mt polymérisés <i>in vitro</i> avec les différentes capsides	128
Figure 46 : Quantification du taux de colocalisation des capsides avec les Mt.....	129
Figure 47 : Coimmunoprécipitation des Mt.....	130
Figure 48 : Schéma des protéines recombinantes GST dynéine.....	132
Figure 49 : Surexpression et purification des GST dynéine.....	134
Figure 50 : Analyse des GST dynLC purifiées.....	135
Figure 51 : Schéma de l'interaction entre l'homodimère de DynLC (DynLL1)/ et la DynIC.....	136
Figure 52 : Précipitation de la DynIC <i>via</i> les GST dynLC purifiées.....	137
Figure 53 : Coimmunoprécipitation des GST dynéine avec les capsides du VHB...	139
Figure 54 : Interaction entre les capsides vides et GST Lc8 par cosédimentation ...	141
Figure 55 : Comparaison des séquences protéiques de Dyn LL1 et Dyn LL2	142
Figure 56 : Analyse des GST LL1* purifiées	143
Figure 57 : Précipitation de la DynIC <i>via</i> les GST LL1* purifiées.....	144
Figure 58 : Interactions entre les capsides vides ou ARN <i>E.coli</i> et GST LL1* par cosédimentation	145

Figure 59 : Structure du dimère de LL1 en vue latérale et de face	147
Figure 60 : Schéma protéines recombinantes GST LL1 et GST DynIC 295	147
Figure 61 : Clivage de GST LL1 et purification de GST DynIC 295	148
Figure 62 : Formation d'un hétérocomplexe capsid / DynLL1 / DynIC 295	149
Figure 63 : Colocalisations capsides vides / Mt en présence ou non de GST LL1 ..	151
Figure 64 : Pourcentage de NPC contenant au moins une capsid vide	153
Figure 65 : Histogramme du nombre moyen de capsides par NPC	154
Figure 66 : Pourcentage de cellules énucléées à 1h en fonction des lignées cellulaires	156
Figure 67 : Immunofluorescence des U2OS énucléées	157
Figure 68 : Pourcentage de cellules énucléées à morphologie « colibri like »	160
Figure 69 : Immunofluorescence des U2OS énucléées et infectées avec l'adénovirus	161
Figure 70 : Localisation des C-ter de la protéine HBc dans des capsides vides et ARN	163
Figure 71 : Modèle présentant l'assemblage des structures de DynIC et des DynLC en complexe de la dynéine	171
Figure 72 : Transport cytoplasmique des différents type de capsid	173

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Protéines des filaments intermédiaires	25
Tableau 2 : Sous-unités de la dynéine cytoplasmique 1 et 2.....	40
Tableau 3 : Interactions connues entre DynTctex1/3 et des protéines cellulaires (cargo)	45
Tableau 4 : Interactions connues entre DynTctex1/3 et des protéines virales.....	45
Tableau 5 : Interactions connues entre DynLL1/2 et des protéines cellulaires (cargo)	48
Tableau 6 : Interactions connues entre DynLL1/2 et des protéines virales.....	48
Tableau 7 : Produits chimiques et biologiques	84
Tableau 8 : Lignées cellulaires utilisées	85
Tableau 9 : Produits utilisés en culture cellulaire et bactérienne	85
Tableau 10 : Liste des plasmides utilisés dans ce projet.....	86
Tableau 11 : Liste des amorces utilisées lors des séquençages et des mutagenèses dirigés.....	87
Tableau 12 : Anticorps primaires et secondaires.....	88
Tableau 13 : Protocole pour la préparation des gels de séparation et de concentration en fonction du pourcentage d'acrylamide.....	97
Tableau 14 : Quantifications des NPC et des capsides dans les ovocytes injectés avec capsides matures et capsides vides.....	117
Tableau 15 : Dénomination et condition d'induction des protéines recombinantes GST dynéine.....	132
Tableau 16 : Quantifications des NPC et des capsides dans les ovocytes injectés avec des capsides vides avec et sans GST LL1	152

Introduction

PARTIE I : le cytosquelette cellulaire.

Le cytosquelette cellulaire est constitué de réseaux complexes de tubules et de filaments protéiques qui s'étendent dans tout le cytoplasme. Ces structures sont interconnectées et dynamiques. Elles sont en réorganisation constante au cours de la vie des cellules et des différents mécanismes cellulaires (migration, division, apoptose, transport de cargos, morphologie, polarisation...). Tous les composants du cytosquelette sont des structures qui résultent d'un assemblage d'éléments monomériques. Trois structures principales constituent le cytosquelette : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les Mt (Figure 1).

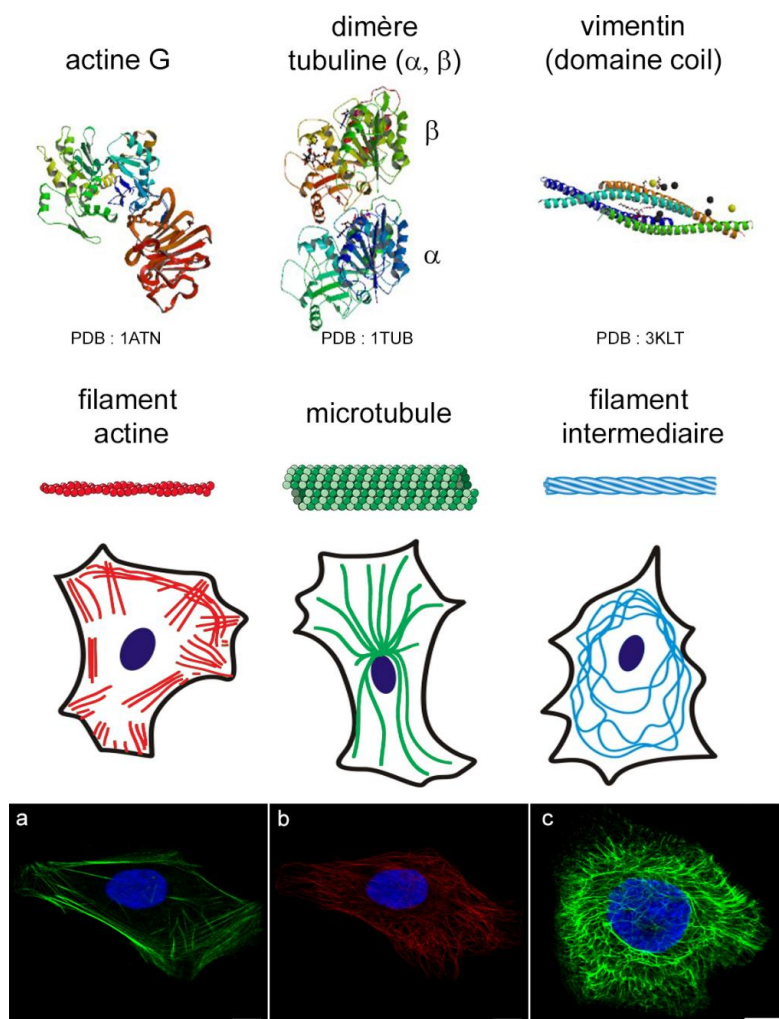


Figure 1 : Cytosquelette cellulaire

De haut en bas : Structure tridimensionnelle de l'actine G, de la tubuline alpha et beta et du domaine fibrillaire de la vimentine (PDB), représentation schématique, et distribution cellulaire des différentes structures. Observation par microscopie en immunofluorescence, les barres représente 10 μm a : U2OS actine phalloïdine 488, b : U2OS Ac anti tubuline c : A431 Ac anti filaments intermédiaires (assemblé à partir de Cell Biology 6th edition (Lodish 2007) et de Theoretical Biomechanics, the human protein atlas)

I : Les filaments d'actine

L'actine est dans la plupart des cellules la protéine la plus abondante (4 mg/ml) (Bray and Thomas 1975). Cette protéine est impliquée dans de nombreuses interactions protéine/protéines.

On dénombre 3 isoformes d'actine: alpha, beta et gamma (α , β , γ). Ces trois isoformes, constituées de 375 a.a. ne diffèrent que de quelques a.a. majoritairement localisés dans la partie N-terminale (N-ter) et leur diamètre est de 5.5 nm

C'est en 1990 qu'a été obtenue la première structure cristallographique d'un complexe actine/DNAseI (Kabsch et al 1990). Depuis beaucoup d'autres complexes actine/protéine (ABPs Actin Binding Proteins) parmi lesquelles la gelsoline, la profiline, la cofiline (Dominguez and Holmes 2011) ont été cristallisées avec l'actine monomérique. *In vivo*, la polymérisation de l'actine implique de nombreuses protéines (le complexe ARP2/3 pour la nucléation, la cofiline à l'extrémité des filaments...) (Condeelis 2001). Cette actine G monomérique (sous forme globulaire) se polymérise en une double hélice. Cette hélice forme un filament flexible appelé actine F (fibrillaire) et mesure 7 nm.

Les filaments d'actine sont non polarisés et conditionnent la forme des cellules et leur locomotion (migration cellulaire, traction sur la matrice extracellulaire, maintien de l'intégrité tissulaire, cytodierèse) (Dominguez and Holmes 2011). Les filaments d'actine, selon leurs fonctions cellulaires, s'organisent en superstructures : certaines sont des filaments d'actine interconnectés, d'autres des faisceaux qui par leur organisation et leur association avec l'actinine et la myosine ont des capacités contractiles ou de polymérisation-dépolymérisation rapide. L'actine en réseau est localisée dans le cytoplasme alors que l'actine en faisceaux est, quant à elle, localisée dans les lamellipodes et le réseau sous-membranaire. L'actine fasciculée forme des faisceaux parallèles appelés fibres de stress (Cramer 1997).

L'actine peut être impliquée dans le transport cytoplasmique. A ce jour, il y a quelques résultats qui suggèrent la polymérisation de l'actine (queue de comète d'actine) pour le transport du baculovirus (van Loo et al 2001; Ohkawa et al 2010; David 2010) et également pour le transport de bactéries intracellulaires : listéria et shigella (Tilney et al 1992).

II : Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont non polarisés, présents dans le cytoplasme des cellules dans des quantités très variables d'un type cellulaire à l'autre. Les filaments intermédiaires sont des polymères protéiques stables de 8 à 10 nm de diamètre. Leur diamètre est compris entre celui des filaments d'actine et celui des Mt. Cinq sous-types de filaments intermédiaires sont connus. Ils diffèrent selon les types de protéines fibrillaires constituant les polymères, l'expression de ces protéines est variable d'un type de cellule à l'autre (voir Tableau 1)

Type de filament intermédiaire	MW en kDa	Distribution
TYPE I		
cytokératine	40-57	épithélium
TYPE II		
cytokératine	53-67	épithélium
TYPE III		
Vimentine	57	mésenchyme
Desmine	53	muscle
protéine fibrillaire gliale	50	cellules gliales et astrocytes
Périphérine	57	neurones centraux et périphériques
TYPE IV		
NF-L	62	neurones matures
NF-M	102	neurones matures
NF-H	110	neurones matures
Internexine	66	système nerveux central
TYPE IV non standard		
Filensine	83	cellule oculaire
Phakinine	45	cellule oculaire
TYPE V		
Lamine A	70	noyau des cellules
Lamine B	67	noyau des cellules
Lamine C	67	noyau des cellules

Tableau 1 : Protéines des filaments intermédiaires

Tableau classant les protéines en fonction du type de filament intermédiaire les type I et II sont dépendante du Ph inférieur ou supérieur à 7. Leur masse moléculaire (MW) en kDa est précisée, ainsi que leur localisation tissulaire/cellulaire

Au cours de leur assemblage, deux dimères superenroulés de ces protéines fibreuses s'associent de manière antiparallèle pour former une sous-unité tétramérique, correspondant à un protofilament de 3 nm de diamètre. Les tétramères s'ajoutent à un filament intermédiaire en cours d'élongation, et 8 protofilaments

forment le filament intermédiaire de 10 nm de diamètre. Les filaments intermédiaires fournissent la force mécanique et la résistance au cisaillement. Ils sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que le maintien de l'intégrité cellulaire et tissulaire de l'épithélium, le soutien de l'enveloppe nucléaire, et la formation des ongles, des cheveux et de la couche cornée de la peau (Eriksson et al 2009).

III : Le réseau de Mt

Les Mt sont présents dans toutes les cellules eucaryotes. Ils peuvent représenter jusqu'à 20% de la quantité des protéines totales des neurones. En effet le réseau de Mt structure les neurones et est le support de transport des informations échangées entre les neurones. Des dimères de tubuline forment les Mt sous forme de polymère cylindrique creux et rigide. Ces structures sont polarisées avec une propriété d'instabilité dynamique qui peut très rapidement entraîner le raccourcissement des Mt. La position des organites possédant une membrane est dépendante du réseau de Mt dirigeant le transport intracellulaire. Le réseau de Mt est l'un des acteurs principaux de la cellule, à l'interface de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

IV : Structure des Mt

Les Mt constituent le cytosquelette biophysiquement le plus rigide des cellules (100 fois plus rigide que l'actine (Gittes et al 1993). Cependant *in vivo* on constate que les Mt peuvent se courber. Cette propriété est importante dans la physiologie des cellules (Bicek et al 2009), au niveau des flagelles (McIntosh and Porter 1967) et des cils (Poole et al 1985; Schwartz et al 1997). Des observations par microscopie ont également montré la flexibilité des Mt *in vitro* (Amos and Amos 1991). Cette rigidité s'explique par leur structure en tube creux dont l'assemblage est décrit dans la figure 2.

IV.1 : Tubuline et polymérisation des Mt

La tubuline est le composant essentiel des Mt. Il existe sept types de tubuline α , β , γ , δ , ϵ , ζ et η . La **tubuline** γ est très conservée chez tous les eucaryotes et joue le rôle d'initiateur de la polymérisation (Inclán and Nogales 2001). La **tubuline** ϵ a été identifiée chez l'homme, les trypanosomes et *chlamydomonas* (Vaughan et al 2000; Inclán and Nogales 2001). Elle semble avoir un rôle dans la duplication du centriole (Chang et al 2003) et la stabilité des corps basaux des cils et flagelles (Ross et al

2013). Les tubulines δ , ζ et η sont moins répandues. La δ **tubuline** joue un rôle dans l'assemblage des Mt mais uniquement chez la paramécie (Garreau de Loubresse et al 2001). La ζ **tubuline** a été identifiée chez des parasites (Vaughan et al 2000) et enfin le gène de la η **tubuline** a été cloné chez la paramécie (Ruiz et al 2000).

Les **tubulines** α et β sont ubiquitaires, très semblables structurellement pour seulement 40% d'homologie de séquences (Burns 1991) avec une masse moléculaire de 55 kDa. Ces protéines ont trois domaines fonctionnels: en N-ter le domaine de liaison au GTP, le domaine central (sur lequel se fixe le placitaxel ou taxol : agent pharmacologique qui stabilise les Mt) et le domaine C-ter qui semble impliqué dans les interactions avec les protéines associées aux Mt MAPs (Nogales et al 1998). Il existe plusieurs isotopes (protéines de la même famille codées par des gènes différents) des tubulines α et β qui influencent la dynamique des Mt *in vitro* (Panda et al 1994).

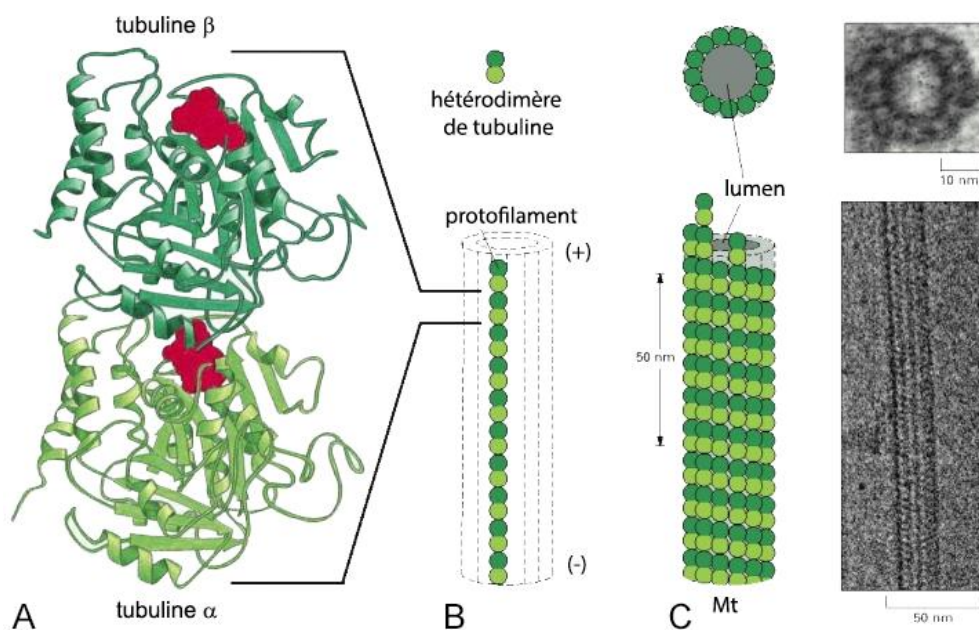


Figure 2 : Constitution et structure d'un Mt

A : hétérodimère de tubuline α et β . B représentation schématique d'un protofilament, C : représentation schématique d'un Mt et segment de Mt. Clichés en microscopie électronique : observation longitudinale d'un Mt et coupe transversale. Adapté de (Löwe et al 2001),

Les unités élémentaires des Mt sont des hétérodimères de tubuline : une sous-unité α associée à une sous-unité β par association dites en tête-queue (Desai and Mitchison 1997) figure 2A. Ces hétérodimères s'associent en protofilament (figure 2B). Ces derniers s'associent latéralement en feuillet qui se referme sur lui-même

pour former la paroi cylindrique du Mt figure 2C (Haga et al 1974; Johnson and Borisy 1977; Chrétien et al 1995).

IV.2: Organisation structurale des Mt

La plupart des Mt sont constitués de 13 protofilaments mais des Mt ont été observés avec un nombre variable de protofilaments (de 8 à 20) *in vitro* (Böhm et al 1984) et *in vivo* (Dallai et al 2006). Récemment une étude structurale de ces différents Mt a permis d'en apprendre davantage sur les interactions entre protofilaments et la déformation latérale de ces Mt (Sui and Downing 2010).

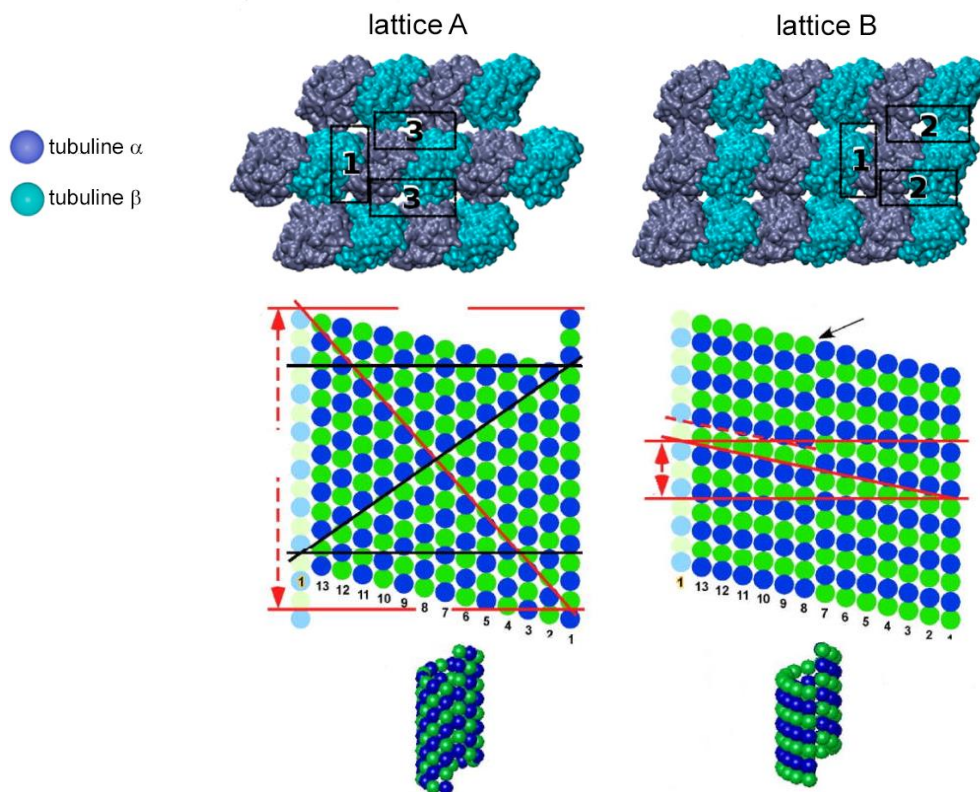


Figure 3 : Organisation des Mt : « lattices » A et B

Panneau haut : représentation structurale des lattices A et B. panel bas : Représentation schématique de l'arrangement des lattices A et B en 2 dimensions. La lattice B comporte une couture pointée par la flèche noire. Tout en bas représentation des lattices A et B en 3 dimensions (conformation Mt) adapté de panneau haut (Ayoub et al 2014) panneau bas (McIntosh et al 2009)

Il y a deux types d'organisation des Mt : en « lattice B » : arrangement structural où les sous-unités les plus proches entre deux protofilaments adjacents sont identiques (α - α et β - β) (Song and Mandelkow 1993) et en « lattice A » : les sous-unités voisines entre deux protofilaments sont différentes (α - β et β - α). La « lattice B » est prépondérante au niveau des Mt flagellaires et des Mt polymérisés *in vitro*. Dans cette configuration (figure 3), une seule paire de protofilaments est en « lattice A » et

correspond à la couture (Kikkawa et al 1994). Récemment, des Mt polymérisés *in vitro* en présence de Mal3 (homologue de EB1 protéine régulatrice de la polymérisation des Mt) ont montré un assemblage sous forme de « lattice A » (des Georges et al 2008). Toutes ces récentes données ont relancées le débat à propos du type de « lattice » retrouvées au niveau des Mt cytoplasmiques.

Les Mt sont polarisés. L'extrémité positive (+) a une croissance rapide et est localisée à la périphérie des cellules. Cette extrémité est composée de tubuline couplée au GTP, on parle alors de « coiffe GTP ». L'extrémité négative (-) a une croissance beaucoup plus lente. *In vivo*, cette extrémité est proche du noyau dans une zone dense en Mt qui est appelé centre organisateur des Mt (MTOC). L'exposition des sous-unités de tubuline est différente en fonction de l'extrémité des Mt: la tubuline β est retrouvée à l'extrémité positive et la tubuline α à l'extrémité négative (Nogales et al 1999).

IV.3 : Dynamiques des Mt

Lors de la division cellulaire, les Mt sont réarrangés. Une structure cellulaire appelée centrosome permet d'organiser la distribution cellulaire des Mt. Il permet la nucléation des Mt. Le centrosome est composé d'une paire de centrioles et du matériel péricentriolaire dans lequel a été identifié la péricentrine et la tubuline γ (Doxsey et al 1994; Mogensen et al 1997; Dictenberg et al 1998). La tubuline γ et d'autres protéines (γ -TuSC, Dgrip) sont accumulées sous forme d'anneau appelé γ -Turc (γ -Tubulin ring complex) au niveau des centrosomes qui sera le site de nucléation à l'extrémité négative des Mt (Zheng et al 1995) figure 4. Ces Mt sont dits centrosomaux. Cependant, *in vivo* il a été mis en évidence des Mt non centrosomaux (Meads and Schroer 1995; Yvon and Wadsworth 1997). On parle alors de nucléation extra-centrosomale qui, dans les faits, correspond véritablement soit à des sites de nucléation extra centrosomaux, soit résulte de cassures de Mt centrosomaux (Job et al 2003)

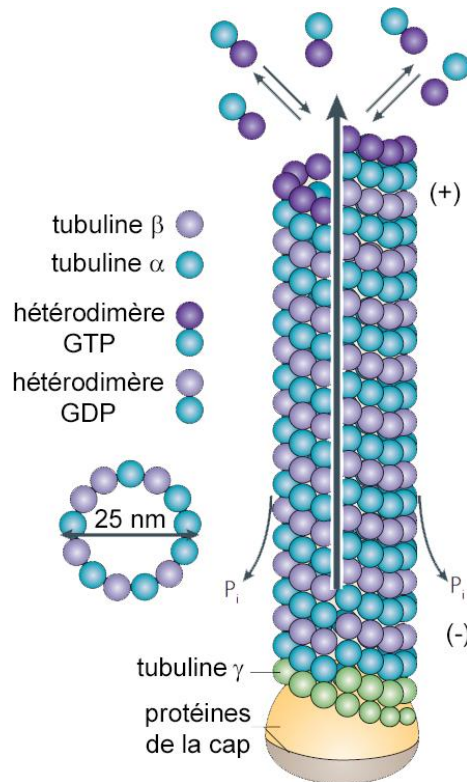


Figure 4 : Nucléation de Mt via la structure γ -Turc

Représentation schématique de la nucléation des Mt. La nucléation s'effectue au niveau de l'anneau de tubuline γ (en vert), les hétérodimères GTP forment des protofilaments qui vont s'associer pour former des Mt. Au cours du temps il y a hydrolyse du GTP, seule l'extrémité positive conserve une coiffe GTP caractéristique de la polymérisation de Mt. Modifié de (Conde and Cáceres 2009)

Les Mt sont des structures très dynamiques en réorganisation constante ; de plus, dans les cellules, il y a constamment un pool de tubuline soluble. Il y a donc des échanges entre la tubuline soluble et les Mt. Deux mécanismes participent à cette dynamique microtubulaire i) l'instabilité dynamique et ii) le « treadmilling » ou « tapis roulant ».

L'instabilité dynamique traduit une alternance de phases de polymérisation et de dépolymérisation, respectivement lentes et rapides, qui sont indépendantes l'une de l'autre et qui peuvent être intra ou inter Mt (Mitchison and Kirschner 1984).

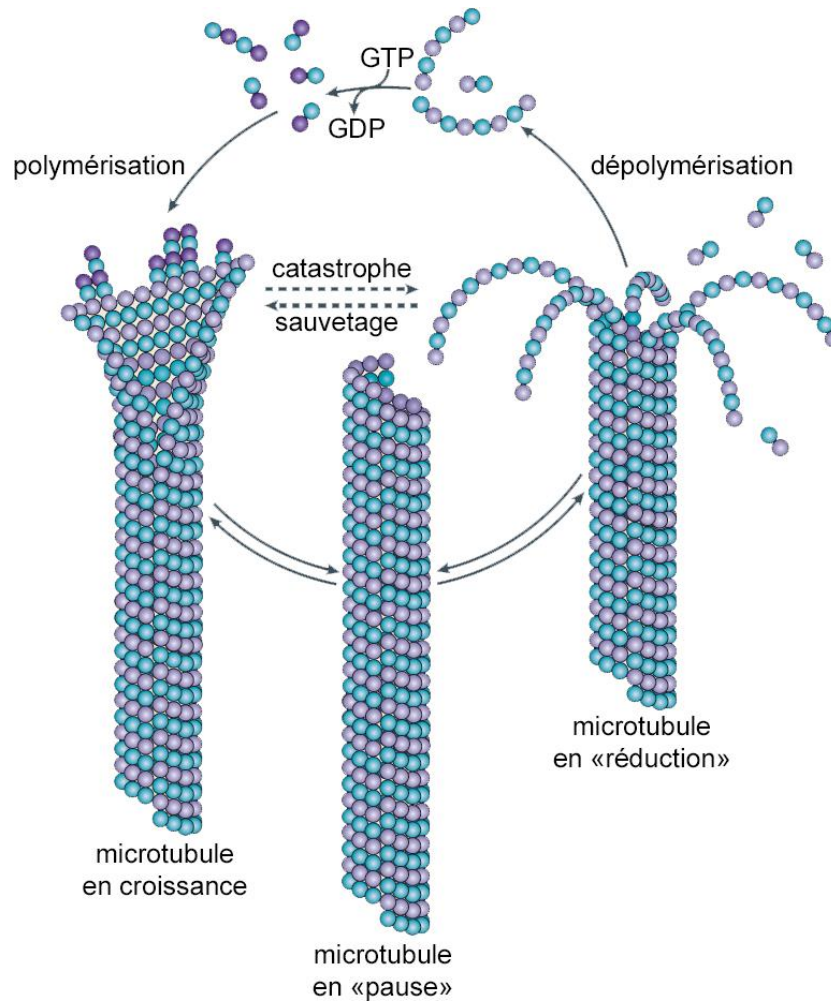


Figure 5 : Instabilité dynamique des Mt

Représentation schématique du mécanisme d'instabilité dynamique. Les Mt alternent plusieurs phases de polymérisation et dépolymérisation. Alternance avec un état stable « en pause »: Mt en pause. D'après (Conde and Cáceres 2009)

Ces phases de polymérisation et dépolymérisation, non concertées, sont entrecoupées d'évènements de catastrophe et de sauvetage. Ce sont respectivement des raccourcissements et des reprises d'élongation (Figure 5) qui ont une incidence sur la vitesse de polymérisation, comme présenté sur la figure 6. Récemment, la mise en évidence de tubuline GTP intra microtubulaire suggère que celles-ci correspondent à des zones de sauvetage où la polymérisation des Mt redémarrerait après un évènement de catastrophe (Dimitrov et al 2008; de Forges et al 2013).

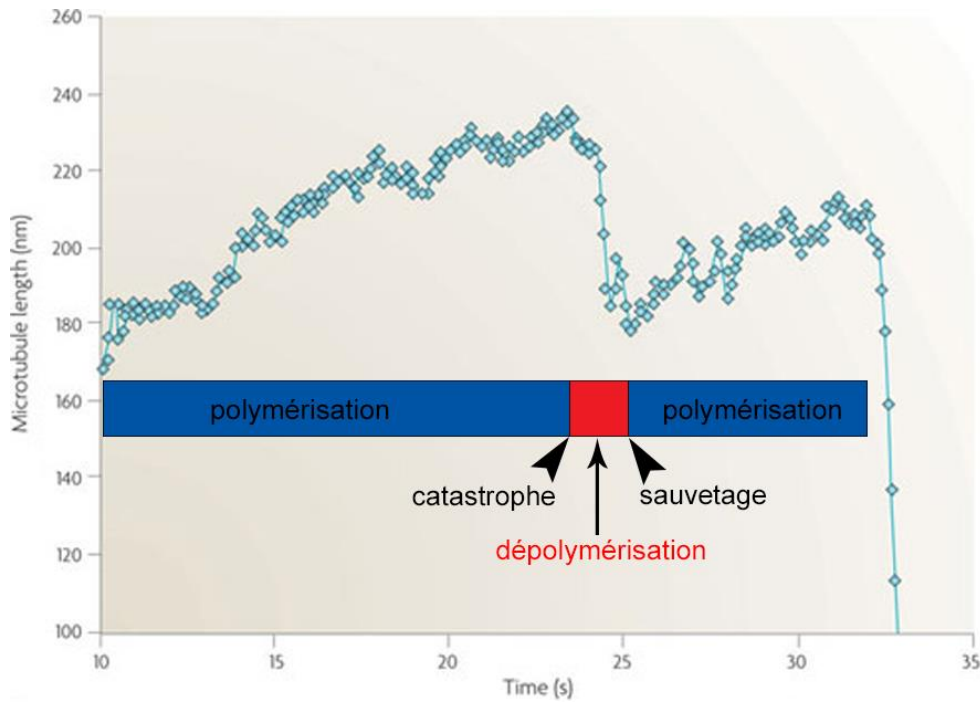


Figure 6 : Vitesse de polymérisation des Mt

Histogramme représentant la taille des Mt (en nm) en fonction du temps (en secondes). Les différentes phases sont présentées sous forme de barre horizontale : en bleu, la polymérisation, en rouge : la dépolymérisation, et catastrophe et sauvetage sont indiqués par les flèches. Modifié d'après (Howard and Hyman 2009)

La dynamique des deux extrémités des Mt n'est pas la même. L'extrémité négative qui est en interaction avec le centrosome est peu dynamique. Ce mécanisme d'instabilité dynamique se manifeste plutôt à l'extrémité positive des Mt (Gelfand and Bershadsky 1991)

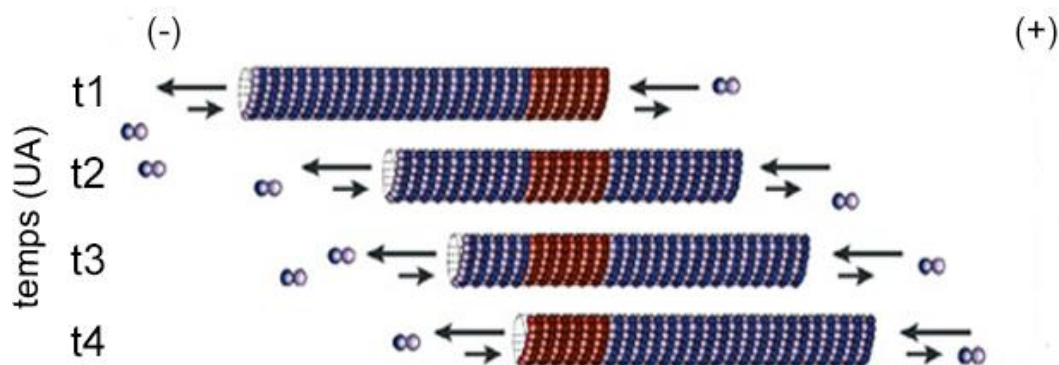


Figure 7 : Le treadmilling (tapis roulant)

Temps en unité arbitraire, (-) extrémité négative, (+) extrémité positive. En rouge est indiquée une portion de Mt constante au cours du temps. Les flèches vers les Mt indiquent la polymérisation, les flèches vers l'extérieur indiquent la dépolymérisation. La longueur des flèches représente le mécanisme majoritaire. Modifié d'après (Jordan and Wilson 2004)

Le treadmilling représenté sur la figure 7 signifie en français « tapis roulant ». À l'état stationnaire, l'extrémité positive qui se termine par la sous-unité β a tendance à

s'allonger par addition de dimères de tubuline, au contraire de l'extrémité négative qui, a tendance à se désassembler. Il y a donc un flux de sous-unités de tubuline dans le Mt. D'abord observée *in vitro* (Margolis 1981; Margolis and Wilson 1981), ce mécanisme a également été observé *in vivo* (Rodionov 1997).

A ces deux mécanismes connus s'ajoute la notion de concentration critique en tubuline qui résulte de la propriété de la tubuline à s'auto-assembler lorsque la concentration dépasse un seuil. La concentration dite critique est plus basse pour l'extrémité positive que pour l'extrémité négative d'un Mt. Pour de la tubuline pure, cette concentration est supérieure à celle nécessaire pour un mélange de tubuline et de MAPs. La vitesse d'assemblage des Mt et leur longueur dépendent de la concentration totale en tubuline.

IV.4 : Les Mt *in vivo*

Dans les cellules, les réseaux microtubulaires existent sous trois grands types de configurations : i) le **réseau interphasique**, ii) le **fuseau mitotique** et iii) **les cils et flagelles**. Dans les cellules en interphase, les Mt rayonnent dans tout le cytoplasme à partir du centrosome. Cependant, certains Mt ne sont pas ancrés au centrosome, notamment dans les neurones. Les Mt axonaux sont effectivement orientés avec l'extrémité négative vers le corps cellulaire, tandis que dans les dendrites, on trouve des Mt dans les deux orientations (Black and Baas 1989).

Les Mt ont une importance capitale lors de la division cellulaire en formant le **fuseau mitotique**. Après la duplication du centrosome et le déplacement autour du noyau lors de la prophase, il y a formation de deux asters de Mt. Ce qui implique d'une part la dépolymérisation des Mt astraux (Mt dont l'origine est situé au niveau du centrosome mais qui ne sont pas impliqués dans la formation du fuseau mitotique par opposition au Mt kinetochoriens et polaires) et d'autre part la polymérisation de Mt asymétriques vers les chromosomes (Zhai et al 1996). Plus tardivement, lors de la mitose en fin de télophase, le bon positionnement des faisceaux de Mt permet le positionnement du plan de clivage faisant intervenir des protéines spécifiques (Straight and Field 2000).

Les Mt, avec d'autres protéines, permettent la formation des structures cellulaires sensibles et de la motilité: **les cils et flagelles**. Ces structures sont très conservées, en effet la structure de ces derniers est retrouvé aussi bien dans le règne animal que

chez les champignons et plus largement chez tous les organismes eucaryotes (Jékely and Arendt 2006; Mitchell 2007). Elles sont caractérisées par un axonème d'environ 250 nm de diamètre. L'axonème a été analysé par microscopie électronique (Sorokin 1968). C'est un assemblage de Mt qui respecte l'architecture suivante : 9 doublets périphériques de Mt formant un anneau et une paire centrale de Mt (9+2). Les doublets périphériques sont constitués d'un tubule A (complet constitué de 13 protofilaments) et d'un tubule B (incomplet constitué de 10 protofilaments) (Warner and Satir 1973). L'architecture de l'axonème est stabilisée par d'autres protéines (nexine, dynéine et protéines rayonnantes)

Etant donné le rôle essentiel des Mt dans la physiologie des cellules, toutes perturbations de ce réseau de Mt et des MAPs ont des conséquences qui seront abordées succinctement dans cette partie du manuscrit en présentant quelques données sur les **pathologies liées directement au réseau de Mt et des protéines associées**. L'expression aberrante de certaines isoformes de tubuline dans des tumeurs entraîne une résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie (Choi et al 2012). Des mutations non-sens et/ou des mutations du site d'épissage de différentes isoformes de la tubuline, ont été associées à des migrations neuronales anormales, un défaut de différenciation de certaines zones du cerveau et la dégénération des neurones moteurs et sensitifs. (Tischfield et al 2011). L'influence dans la schizophrénie des STOPS (Stable Tubule Only Polypeptide) protéine a été montrée avec l'utilisation d'un modèle de souris (Andrieux et al 2004). Des mutations dans la protéine Tau ou alors des anomalies dans ses modifications postraductionnelles sont responsables des tauopathies. On retrouve ces tauopathies dans une vingtaine de maladies mentales dont la maladie d'Alzheimer, Huntington... (Wang et al 2014). Tau pourrait également influencer la stabilité des Mt, ce qui aurait une influence sur les déficits cognitifs (Barten et al 2012). Des analyses de tumeurs pulmonaires suggèrent que MAP2 pourrait être utilisée comme un marqueur biologique de différents types de tumeurs pulmonaires (Liu et al 2001). Les maladies associées aux complexes moteurs ; kinésine et dynéine, sont classées en cinq catégories en fonction des mécanismes affectés : des problèmes de trafic sur de longues distances, dans les fonctions ciliaires et flagellaires, la perte de contrôle de la division cellulaire dans le cas des cancers, les défauts de transport induits par des toxines et

le détournement de leur rôle physiologique par des pathogènes (Mandelkow and Mandelkow 2002).

IV.5 : Fonctions des Mt

Si l'on considère l'ensemble du réseau de Mt, deux types de population de Mt coexistent : des Mt stables et des Mt dynamiques. Ces deux populations microtubulaires expliquent en partie la résistance au froid observée chez certains Mt *in vivo* (Brinkley and Cartwright 1975). La répartition de ces populations de Mt est différente. En effet, les Mt stables sont localisés près du noyau et du centrosome (Schulze and Kirschner 1987) alors que les Mt labiles sont localisés à la périphérie des cellules. La différence de stabilité entre ces deux populations de Mt impliquerait des modifications post-traductionnelles de la tubuline.

Le réseau de Mt n'en reste pas moins très dynamique et à l'interface de plusieurs mécanismes cellulaires : l'architecture des cellules : **la cohésion des organites, l'apoptose, la mitose** et le **trafic intracellulaire**.

Les cellules ont une **architecture** définie, les Mt jouent un rôle dans la polarisation des cellules et dans la distribution des organites. On constate que le réticulum endoplasmique s'étend jusqu'à la périphérie cellulaire et que les mitochondries sont souvent localisées à l'extrémité positive des Mt. La dynamique du réseau mitochondrial implique les Mt. L'appareil de Golgi, les endosomes tardifs et les lysosomes sont quant à eux plutôt localisés à l'extrémité négative. Le rôle de centre organisateur des Mt se situe près du noyau (MTOC), cependant l'appareil de Golgi semble pouvoir aussi avoir ce rôle (Cole and Lippincott-Schwartz 1995; de Forges et al 2012)(de Forges et al 2012).

Les modifications les plus caractéristiques survenant lors de l'entrée des cellules en **apoptose**, sont morphologiques: la perte d'adhérence, le « blebbing » (formation de protusions) et la fragmentation en corps apoptotiques. Les Mt, dans ces mécanismes, auraient deux rôles opposés: d'une part, la séquestration des protéines anti-apoptotiques : Bim (Puthalakath et al 1999), la survivine (Uren et al 2000), et d'autre part un rôle dans le recrutement et la réorganisation des structures cellulaires conduisant à ces changements morphologiques (Mollinedo and Gajate 2003) .

Le **trafic cytoplasmique** est impliqué dans les changements morphologiques lors de la mitose et de l'apoptose, mais aussi dans le métabolisme des cellules. Les Mt

stables et dynamiques sont spécialisés dans différentes étapes de l'endocytose (Granger et al 2014). Le trafic des vésicules entre le Golgi et le réticulum, ainsi que le trafic des mitochondries, impliquent les moteurs moléculaires. (Wanka and Van Zoelen 2003; Brown et al 2014)

IV.6 : Microtubules *in vitro*

Initialement, dans les protocoles établis dans les années 70, les Mt étaient purifiés à partir de cerveaux bovins puis par chromatographie d'affinité (Kirkpatrick et al 1970; Schmitt and Littauer 1974). Depuis lors, de nombreux autres protocoles ont été publiés permettant la purification à partir de tissus et de cellules d'origines variées. Le procédé général consiste en plusieurs étapes alternées de polymérisation et dépolymérisation suivies d'ultracentrifugations. Les Mt ainsi purifiés en laboratoire sont souvent contaminés par des protéines associées aux Mt, les MAPs et ont des qualités d'enrichissement en tubuline variable. Il existe de la tubuline purifiée de source commerciale qui est d'origine porcine, bovine ou de plante et d'une pureté supérieure à 99% d'après les fournisseurs. En utilisant cette tubuline purifiée une polymérisation *in vitro* standardisée et reproductible ne prend que quelques heures. De plus l'ajout à la réaction de polymérisation d'un peu de tubuline couplée à la rhodamine permet de visualiser les Mt par microscopie de fluorescence (Grego et al 2001).

V : Les MAPs :

Les MAPs pour « Mt associated protéins » sont des protéines qui vont réguler le cycle de vie des Mt (Mandelkow 1995). Les MAPs qui vont stabiliser ou déstabiliser les Mt sont des MAPs structurales. Les MAPs motrices, ou moteurs moléculaires, transportent des cargos le long des Mt.

V.1 : Les MAP structurales

Ces protéines, de formes filamenteuses, sont chargées positivement. La majorité de ces protéines modulent directement la dynamique des Mt par stabilisation, ou en polymérisant de concert avec la tubuline. Elles permettent également des interconnexions entre les Mt eux-mêmes, ou avec d'autres structures du cytosquelette (actine et filaments intermédiaires).

Les MAPs stabilisatrices (Mandelkow 1995) possèdent des domaines répétés qui permettent l'association aux dimères de tubuline et permettent un pontage des différentes sous-unités. Parmi les MAPs, **Tau**, **MAP2** ainsi que **MAP1A** et **MAP1B** ont été identifiées au niveau sur cerveau. La protéine **Tau**, dont il existe 6 isoformes, résultant d'un épissage alternatif (Buée et al 2000), possède 3 à 4 domaines de liaison aux Mt. La forme non phosphorylée de la protéine interagit avec la tubuline et favorise la polymérisation et la stabilisation des Mt (Wang et al 2014).

MAP2 stabilise aussi les Mt (Kim et al 1979). Il en existe 4 isoformes (Kalcheva et al 1995). Elle est également considérée comme un marqueur de différenciation neuronal (Megiorni et al 2005). Elle peut permettre l'interconnexion avec les filaments intermédiaires (Leterrier et al 1982). Les **MAP1A** sont moins efficaces que MAP2 pour stabiliser les Mt (Vaillant et al 1998), mais elles augmentent la nucléation et catalysent l'élongation des Mt (Pedrotti and Islam 1994; Fallor et al 2009). Les protéines **STOPs** ou MAP6 stabilisent les Mt neuronaux (Boscht et al 1996), **CLIP-170** est localisée uniquement à l'extrémité positive des Mt (Perez et al 1999) et aurait un rôle de sauvegarde ou de sauvetage en cas de dépolymérisation (Komarova et al 2002)

V.2 : MAP motrice : la complexe de la Kinésine

Les membres de la superfamille des kinésines (KIF : Kinesin Family member) jouent un rôle dans le transport de cargos, la formation du fuseau mitotique, l'alignement des chromosomes, la cytokinèse et la dynamique des Mt (Hirokawa and Takemura 2005; Hirokawa and Noda 2008). Une large famille de gènes code la kinésine, et 45 KIFs ont été identifiés chez les mammifères. Ces protéines ont été classées en 15 classes, de la kinésine 1 à la kinésine 14B (Miki et al 2001; Hirokawa et al 2009; Hirokawa et al 2010). Selon la position des domaines moteurs, les KIFs ont été divisées en trois groupes : les **N-KIFs**, avec un domaine moteur en N-ter qui vont migrer vers l'extrémité positive des Mt. C'est le groupe le plus large (39 membres répartis dans 12 familles). Les **C-KIFs** incluant KIFC1, KIFC2 et KIFC3, avec un moteur en C-terminal, se dirigent vers l'extrémité négative des Mt. Les **M-KIFs** ne se déplacent pas sur les Mt mais les dépolymérisent. Leur domaine « moteur » est localisé au centre de la protéine (Lawrence et al 2004; Hirokawa and Noda 2008; Hirokawa et al 2010).

Les domaines globulaires (moteurs) des KIFs, qui ont de 30 à 60% d'homologie, contiennent le domaine d'interaction avec les Mt et le domaine hydrolysant l'ATP. Les différences entre les KIFs sont localisées dans la partie structurée en une tige puis une queue. Ces structures confèrent des activités spécifiques aux KIFs comme le domaine de liaison aux différents cargos. (Hirokawa and Noda 2008; Hirokawa et al 2010)

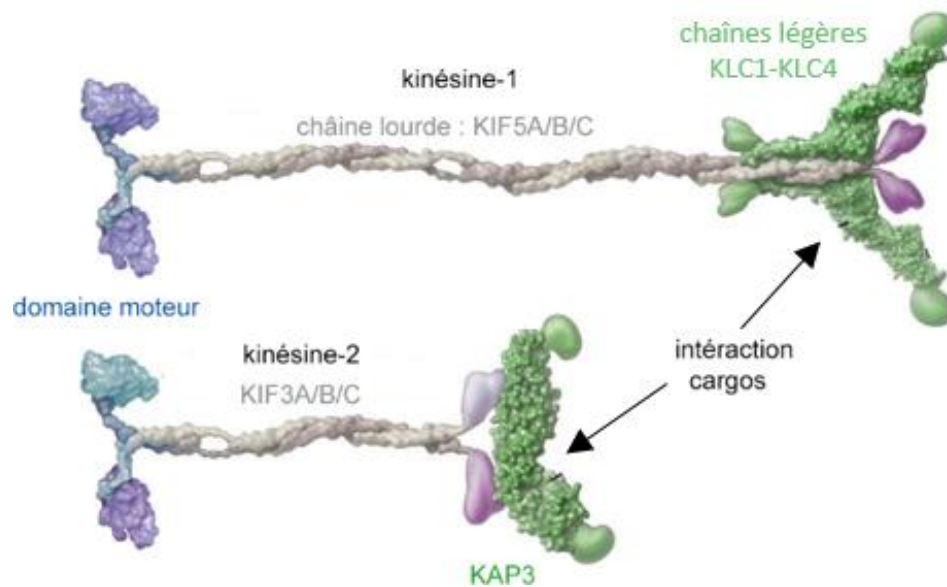


Figure 8 : Structures de la kinésine 1 et de la kinésine 2 :

La kinésine 1 contient deux chaînes lourdes (KIF5A/B/C) avec un domaine moteur (en bleu) et deux chaînes légères (en vert). Les chaînes légères et le domaine C-terminal de la chaîne lourde (en magenta) sont capables d'interagir avec des cargos. La kinésine 2 ne contient que des chaînes lourdes différentes avec un domaine moteur (KIF3A/B/C) et KAP3 (en vert) qui est une protéine associée à la kinésine. Cette protéine peut interagir avec différents cargos. Adapté de (Vale 2003a)

La kinésine 1, ou KIF5, contient 2 chaînes lourdes (110 à 125 kDa) avec un domaine N-ter moteur et la structure queue en C-terminal associée aux chaînes légères (50 à 70 kDa) (Hirokawa and Noda 2008). Le gène codant la chaîne lourde KIF5B a une expression ubiquitaire, alors que KIF5A et KIF5C sont spécifiques des neurones (Kanai et al 2000; Vale 2003a). L'homodimérisation et l'hétérodimérisation impliquent la région médiane de la tige des chaînes lourdes, alors que la partie C-terminale (C-ter) interagit avec les cargos, soit directement soit indirectement par l'intermédiaire des chaînes légères. (Diefenbach et al 1998; Seiler et al 2000). Les chaînes lourdes et les chaînes légères sont capables d'interagir avec des protéines virales (Gindhart 2006) (Figure 8).

La kinésine 2 ou KIF3 est ubiquitaire et permet le transport des organelles. Elle appartient à la classe des N-KIF. Les chaînes lourdes s'assemblent en hétérodimère

(KIF3A avec KIF3B ou KIF3C) (80 à 90 kDa). La formation d'un complexe tetramérique est rendu possible via l'interaction avec KAP3 qui s'associe avec le domaine C-ter des chaînes lourdes (Kondo et al 1994; Yamazaki et al 1995; Yamazaki et al 1996). La kinésine 2 est impliquée dans le transport intraflagellaire (Kim et al 1979) et la polarisation des neurones. KAP3 peut interagir avec une des protéines composant la dynactine (p150^{Glued}). (Deacon et al 2003; Berezuk and Schroer 2007).

Les kinésines 1 et 2 sont également impliquées dans le transport des vésicules endosomales et lysosomales (Brown et al 2005) et le transport des vésicules dites COPI du Golgi vers le réticulum (Stauber et al 2006).

V.3 : MAP motrice : le complexe de la Dynéine

La dynéine oriente le transport vers l'extrémité négative des Mt (vers le noyau). On distingue de multiples dynéines: la dynéine axonémale (bras de dynéine interne et externe présent dans les cils et les flagelles) et deux dynéines cytoplasmiques. Seule les dynéines cytoplasmiques seront présentées dans la suite de ce manuscrit.

V.3.1 : Différentes isoformes de dynéine cytoplasmique

Les dynéines cytoplasmiques sont codées par plusieurs gènes (Tableau 2). La dynéine cytoplasmique 1 permet le transport de cargos cellulaires, comme les organites, les complexes ARN et les chromosomes, de la périphérie cellulaire vers le MTOC : (Vale 2003b; Schroer 2004; Lopez de Heredia et al 2004; Vallee et al 2009). La dynéine joue un rôle critique dans de nombreuses fonctions cellulaires eucaryotes : la maintenance de l'appareil de Golgi, la migration nucléaire, le transport axonal, et le positionnement des organites. Quelques virus comme le HSV1, le HIV, les parvovirus ou encore l'adénovirus utilisent la dynéine cytoplasmique 1 pour être transportés vers le MTOC (Sodeik et al 1997; Suomalainen et al 1999; Leopold et al 2000; Seisenberger et al 2001; Döhner et al 2002; McDonald et al 2002; Suikkanen et al 2003; Scherer and Vallee 2011; Merino-Gracia et al 2011). La variabilité des sous-unités de la dynéine et donc de l'assemblage des différentes formes de dynéine est augmentée par le mécanisme d'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles (Susalka and Pfister; Tai et al 2001; King et al 2002; Pfister et al 2006). Des données biochimiques indiquent que l'interaction entre la dynéine et un cargo est le plus souvent spécifique d'un type de sous-unités (Kardon and Vale

2009). Cette hétérogénéité permet aux dynéines d'interagir avec différents cargos (Kardon and Vale 2009; Dodding and Way 2011). Palmer et al ont montré que des ARNi contre les différentes sous-unités de la dynéine : DynLIC avaient des effets différents au niveau cellulaire : l'inhibition de DynLIC1 bloque le transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum alors que l'inhibition de DynLIC2 perturbe le recyclage des endosomes et la cytokinèse (Palmer et al 2009).

Sous unité dynéine	Nom du gène (pfister 2005)	masse moléculaire kDa	nom des protéines dans le manuscrit
Dynéine cytoplasmique 1			
chaînes lourdes HC	DYNC1H1	>530	-
chaînes légères intermédiaires LIC	DYNC1LI1 et DYNC1LI2	53-59	-
chaînes intermédiaires IC	DYNC1I1 et DYNC1I2	74	DynIC
chaînes légères LC	DYNLT1 et DYNLT3	12	DynTctex 1/3
	DYNRB1 et DYNRB2	7	DynRb1/2
	DYNLL1 et DYNLL2	8	DynLc8 / DynLL 1/2
Dynéine cytoplasmique 2			
chaînes lourdes HC	DYNC2H1	492	-
chaînes légères intermédiaire LIC	DYNC2LI1	330	-

Tableau 2 : Sous-unités de la dynéine cytoplasmique 1 et 2

13 sous-unités ont été identifiées et caractérisées chez l'homme. (à partir de (Susalka and Pfister; Pazour et al 1999; Pfister et al 2005; Pfister et al 2006)

La dynéine cytoplasmique 2 est le plus souvent retrouvée au niveau des cils et flagelles. Elle est constituée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères intermédiaires (Perrone et al 2003; Pfister et al 2006). Ce complexe assure le transport rétrograde intraflagellaire le long de l'axonème. Il participe à la structuration et au maintien des cils et flagelles. L'utilisation d'un modèle tel que *Chlamydomonas* a révélé que d'autres sous-unités appartenaient à ce complexe. Récemment, les protéines FAP133 et FAP163 ont été identifiés comme orthologues de la chaîne intermédiaire (Patel-King et al 2013). Les orthologues humains de ces deux protéines WDR34 et WDR60 interagissent avec la dynéine cytoplasmique 2 au niveau des cils et pourraient donc être de nouvelles sous-unités appartenant à ce complexe (Patel-King et al 2013; Asante et al 2014).

Dans la suite de ce manuscrit, je ne présenterai en détails que la dynéine cytoplasmique 1.

V.3.3.: Structure et composition

La dynéine cytosolique est un complexe protéique de coefficient de sédimentation 20S et de masse moléculaire 1.5 MDa. Ce complexe est composé de deux chaînes lourdes, deux chaînes intermédiaires, quatre chaînes légères intermédiaires et trois paires de chaînes légères de trois familles différentes (Vale 2003a; Pfister et al 2005; Kardon and Vale 2009)

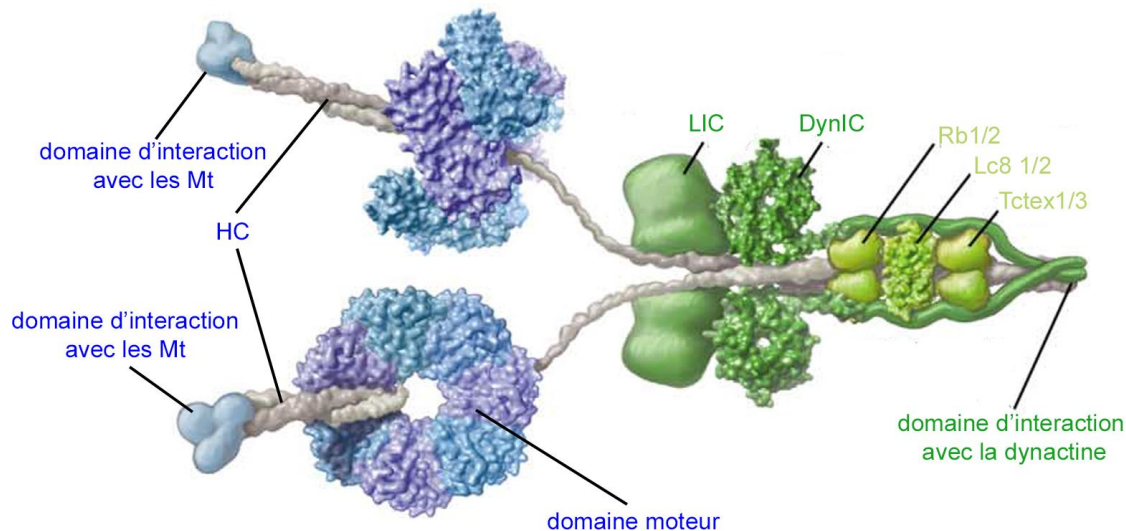


Figure 9 : Structure du complexe de la dynéine cytoplasmique 1

Deux chaînes lourdes HC (en gris) possédant chacune un domaine d'interaction avec les Mt et un domaine moteur dans la partie N-ter. La partie C-ter permet l'interaction avec les chaînes légères intermédiaires LIC et les chaînes intermédiaires IC (en vert). 6 chaînes légères de 3 familles différentes (Roadblock : RB, Lc8 et Tctex) interagissent avec la IC. Adapté de (Vale 2003a)

Le domaine moteur est localisé dans la partie C-ter **des chaînes** lourdes (HC). Ces domaines, responsables de la conversion de l'énergie (ATP) en énergie mécanique à l'origine du mouvement, sont organisés en anneaux heptamériques avec 6 domaines AAA ATPase (ATPases Associated with various cellular Activities). Le domaine d'interaction avec les Mt est localisé entre les AAA domaines 4 et 5. Il forme une extension de 15 nm à partir de l'anneau. Les parties N-ter des HC permettent la dimérisation de deux HC et contiennent les domaines d'interaction avec les LIC et IC.

Dans le complexe de la dynéine, on trouve exclusivement des homodimères de **chaînes légères intermédiaires (LIC1 et LIC2)**. Ces protéines sont associées aux HC (Tynan et al 2000a; Pfister et al 2006). Les LIC ont des fonctions régulatrices du complexe de la dynéine et peuvent également interagir avec des cargos. Lors de la mitose, les deux LIC ont des localisations cellulaires différentes, LIC1 sur le fuseau mitotique, et LIC 2 au pôle des fuseaux (Horgan et al 2011). Les deux LIC peuvent

être phosphorylées, et par exemple chez les xénopes, la phosphorylation régule l'interaction de la dynéine avec les organites (Dillman and Pfister 1994; Niclas et al 1996). LIC1 peut aussi interagir avec la péricentrine (Purohit et al 1999; Tynan et al 2000b).

La **chaîne intermédiaire DynIC** joue un rôle crucial dans l'assemblage et la maintenance du complexe de la dynéine (Pfister et al 2006; Myers et al 2007; Towns et al 2009; Kardon and Vale 2009). L'inhibition des deux chaînes intermédiaires déstabilise le complexe entier de la dynéine confirmant la fonction chaperonne de DynIC dans le complexe de la dynéine (Levy and Holzbaur 2008; Palmer et al 2009). La DynIC est codée par deux gènes: IC1 et IC2 ; les protéines exprimées ont une identité de 69%. La partie C-ter, comportant des domaines WD formant des structures β propeller (Figure 10) qui permettraient l'interaction avec les DynHC, est très conservée (Pfister et al 2006; Myers et al 2007). Les WD domaines sont des motifs structuraux d'environ 40 a.a souvent terminés par un tryptophane W et un acide aspartique D. Les trois familles de **chaînes légères** de la dynéine (DynLC) forment des homodimères. Ces protéines interagissent avec la DynIC dans la partie N-ter *via* des domaines différents (Tynan et al 2000a; Susalka et al 2002; Oiwa and Sakakibara 2005; Myers et al 2007). La DynIC contient également d'autres domaines d'interaction dans la partie N-ter : des domaines d'interaction avec des protéines régulatrices et des cargos, mais également avec le complexe adaptateur de la dynactine via la protéine P150^{Glued} (King et al 2003; Pfister et al 2006; Myers et al 2007; Kardon and Vale 2009). Les chaînes légères, les interactions avec la chaîne intermédiaire et la dynactine seront présentées plus en détail dans des parties suivantes.

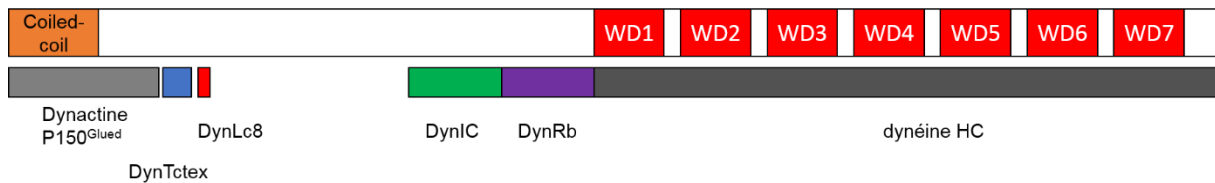


Figure 10 : Domaines caractérisés de la DynIC

Les chaînes légères LC (en bleu DynTctex, en rouge DynLc8 et en violet DynRb) interagissent dans la partie N-ter de la protéine via des domaines différents. Le domaine coiled coil (en orange) en N-ter est responsable de l'interaction avec la dynactine (P150 Glued) (en gris). Dans la partie C-ter sont spécifiés les 7 domaines WD requis pour l'interaction avec la chaîne lourde en gris foncé. figure basée sur (Mok et al 2001; Susalka et al 2002; Nyarko and Barbar 2011)

Les cargos peuvent interagir avec le complexe dynéine-dynactine directement ou indirectement via des protéines adaptatrices. L'immunophiline (protéine à activité chaperonne) interagit avec la P50 de la dynactine. La protéine p53 (facteur de transcription) forme un hétérocomplexe avec HSP90 et l'immunophiline ce qui lui permet un attachement indirect au complexe de la dynéine (Galigniana et al 2004). Quelques données montrent que les importines α et β sont transportées dans les axones (Hanz et al 2003). Les auteurs proposent que les importines α et β sont de potentiels adaptateurs entre la dynéine et les cargos (Hanz and Fainzilber 2006).

V.3.4 : Les chaînes légères

Un complexe de dynéine contient 3 dimères de différentes LCs. Chaque dimère provient de 3 familles différentes : DynTctex, DynLc8 et DynRb. Il existe 2 gènes (Tableau 2) par famille qui sont très conservés. Les DynLC des familles DynTctex et DynLc8 sont présents seulement sous forme d'homodimère alors que DynRb1 et DynRb2 s'associent en homodimères ou hétérodimères (Nikulina et al 2004; Pfister et al 2005; Pfister et al 2006; Kardon and Vale 2009). DynTctex1 et DynTctex3 peuvent former des hétérodimères *in vitro* (Lo et al 2007), mais ces derniers n'ont jamais été observés jusqu'à présent *in vivo*.

Au niveau structural, les protéines des familles DynTctex et DynLc8 adoptent une structure dimérique avec des caractéristiques géométriques identiques pour interagir avec leurs ligands respectifs. Le dimère de DynRB diffère structurellement de DynTctex et DynLc8 (Figure 11B).

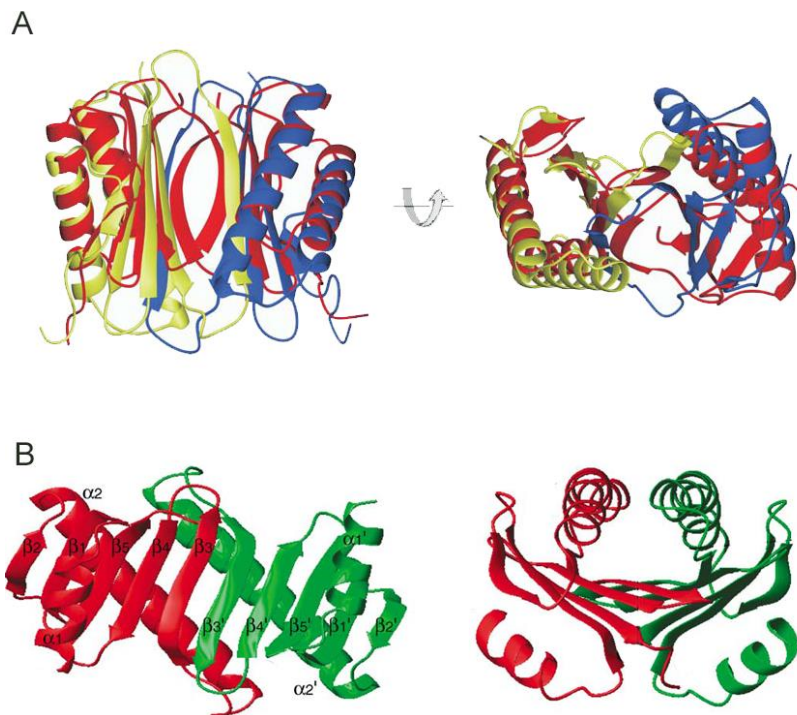


Figure 11 : Structures des DynLC : DynTctex1 et DynLL1 / DynRb

A : comparaison structurale de DynTctex1 dimère en jaune-bleu (chlamydomonas) et DynLL1 dimère en rouge (rat). Les deux protéines n'ont pas d'homologie de séquences mais leurs structures sont très similaires. La taille du dimère de DynTctex1 est plus large que celle du dimère de DynLL1. Chaque monomère contient 2 hélices α et un feuillet β . La dimérisation se fait grâce à l'interaction de 4 brins β avec 1 brin β de l'autre monomère. B : structure de DynRb (souris). Chaque monomère (en rouge et vert) contient 2 hélices α et un feuillet β antiparallèle constitué de 5 brins β . La dimérisation se fait via l'interaction d'une hélice α avec le brin $\beta 3$ et $\beta 4$ de l'autre monomère. Figure assemblée à partir de (Wu et al 2005; Song et al 2005)

De nombreuses protéines cellulaires et virales interagissent avec DynTctex (tableau 3 et tableau 4) et DynLc8 (tableau 5 et tableau 6). Toutes ces protéines interagissent respectivement avec le même domaine d'interaction sur le dimère (motif protéique). Cependant une fraction significative de ces protéines et plus particulièrement DynLc8 n'est pas associée à la dynéine dans les cellules, constituant un pool de protéines libres, le plus souvent dimériques. Ces dimères libres seraient impliqués dans des fonctions dynéine indépendantes : médiateur de dimérisation, permettre l'import de protéine dans le noyau (Tai et al 1998; Lightcap et al 2009; Gallego et al 2013).

Les protéines **DynTctex1** et **DynTctex3** sont codées par deux gènes différents et présentent 55% d'identité. Elles interagissent avec le même domaine de la DynLC. Cependant les protéines cellulaires avec lesquelles elles interagissent sont impliquées dans différents mécanismes. Le tableau 3 recense la liste de ces protéines participant à différents mécanismes aussi variés que le relargage de

neurotransmetteur (DOC2A/B), la transition épithélio-mésenchymateuse (BMP2), l'adhésion cellulaire (TROAP), la réparation de l'ADN (RAD21) la constitution de canaux ioniques (VDAC), la constitution de membranes (CD155) etc... DynTctex1 et DYnTctex3 interagissent également avec quelques protéines virales listées dans le tableau 4.

nom des protéines	organisme	DynTctex1/3	Référence :
DOC2A/B	homme	DynTctex1	(Nagano et al 1998)
BMP2	homme	DynTctex1	(Machado et al 2003)
HsPB9	homme	DynTctex1	(de Wit et al 2004)
PVR (CD155)	homme	DynTctex1/3	(Mueller et al 2002)
RAD21	homme	DynTctex1	(Panigrahi et al 2012)
Supervillin	homme	DynTctex1	(Takizawa et al 2006)
TROAP	homme	DynTctex1	(Nadano et al 2002)
VDAC	homme	DynTctex1/3	(Schwarzer et al 2002)
SATB1	homme	DynTctex3	(Sachdev et al 2007)
Gβγ	homme	DynTctex1	(Chuang et al 2005)
CD5	homme	DynTctex3	(Bauch et al 1998)
tescalcin	homme	DynTctex3	(Rual et al 2005)

Tableau 3 : Interactions connues entre DynTctex1/3 et des protéines cellulaires (cargo)

Protéines cellulaires interagissant avec la DynTctex (compilation d'études réalisées par : double hybride, immunoprécipitation, interactome) La séquence consensus pour l'interaction avec DynTctex est : (R/K)(R/K)XX(R/K)

virus	famille	protéine(s) virale	protéine(s) de la dynéine	références
Herpes simplex	<i>Alphaherpesviridae</i>	UL34 UL9 UL35	DynTctex1/3	(Ye et al 2000) (Martínez-Moreno et al 2003)* (Douglas et al 2004)
Adenovirus	<i>Adenoviridae</i>	E3	RRAG-DynTctex1**	(Lukashok et al 2000)
Mason-Pfizer	<i>Retroviridae</i>	protéine matrice	DynTctex1	(Vlach et al 2008)
Papilloma virus	<i>papillomaviridae</i>	L2* E4*	DynTctex1/3	(Schneider et al 2011) (Florin et al 2006) (Martínez-Moreno et al 2003)

Tableau 4 : Interactions connues entre DynTctex1/3 et des protéines virales

Protéines virales interagissant avec la/les DynTctex (expériences : double hybride, interaction *in vitro* immunoprécipitation cotransfection, (*): pepscan (**): interaction indirecte via le complexe RRAG. La séquence consensus pour l'interaction avec DynTctex n'est pas connue. (compilation adaptée de (Merino-Gracia et al 2011))

Les **DynLL 1** et **DynLL 2** sont des LC. Les deux gènes orthologues sont très conservés. Les protéines ne diffèrent que de 6 a.a. Les séquences protéiques chez l'Homme sont identiques à celles retrouvées chez la souris, le rat, le cochon et la

vache (Pfister et al 2006). Ces deux protéines peuvent interagir via la DynIC du complexe de la dynéine mais également avec la myosine 5a (autre moteur....) et également avec beaucoup d'autres protéines cellulaires. Rapali *et al.* ont publiés une étude en 2011 présentant les protéines cellulaires et virales interagissant avec DynLL1 et/ou DynLL2. Les protéines cellulaires sont listées dans le tableau 5. Ces protéines sont impliquées dans différents mécanismes cellulaires comme la mitose (NEK9, EML3...), l'apoptose (BimEL, Bmf...), la régulation de la transcription (BS69, NRS1...), des mécanismes synaptiques (PSD) (nNOS...), le transport nucléaire (Nup159, Pak1, METT-10...) et le transport cytoplasmique (DIC, Swallow, NudE, myosine 5a...). Parmi les protéines virales qui interagissent avec DynLL 1 et/ou DynLL 2 listées dans le tableau 6, il y a deux types de protéines virales : des protéines impliquées dans l'architecture du virus, dites protéines structurales, et des protéines non structurales. Les protéines structurales, en préservant la particule virale, peuvent transporter le matériel génétique jusqu'au noyau (effet de protection du génome). C'est le cas de la p54 du ASFV (African Swine Fever Virus) et de l'intégrase du VIH qui ne structure pas les virus mais qui est présente au sein de complexe de préintégration (PIC) et participe au transport du génome... Les protéines non structurales ont un rôle lors du cycle de réplication du virus comme par exemple pour la protéine UL9 chez le HSV, la phosphoprotéine P des rhabdovirus, la protéine 35 (VP35) du virus Ebola...

Protéine	Organisme	Protéine(s) de la dynéine	Motif	Référence
AIBC1	homme / rat	DynLL1	KRMLDAQVQTD	(Lo et al 2001)(Ewing et al 2007)(Nomura et al 2000)
ATMIN	homme	DynLL1	LESLDIETQTD	(Rapali et al 2011a)
Bassoon	rat	DynLL1/2	PTTANYGSQTE	(Fejtova et al 2009)
BimEL	homme	DynLL1	PMSCDKSTQTP	(Puthalakath et al 1999)(Lo et al 2001)(Lajoix et al 2004)
Bmf	homme	DynLL2	TSQEDKATQTL	(Rodriguez-Crespo et al 2001) (Radnai et al 2010)
BS69	homme	DynLL1	PRMLHRSTQTT	(Lo et al 2001)
DIC	Drosophile	DynLL1 (homologue)	TLVYTKQTQTT	(Hall et al 2009)(Nyarko et al 2004)
DIC1	souris	DynLL1	VVSYSKETQTP	(Lo et al 2001) (Lajoix et al 2004)
DIC2	rat	DynLL1	IVTYTKETQTP	(Varma et al 2010)
DNMT3A	homme	DynLL1	LVLKDLGIQVD	(Rodriguez-Crespo et al 2001) (Navarro-Lérida et al 2004)
Egalitarian	drosophile	DynLL1 (homologue)	VKLVDAESQTL	(Navarro-Lérida et al 2004)
EML3	homme	DynLL1/2	PSLBSRGTQTE	(Rapali et al 2011b)
Gephyrin	rat	DynLL1/2	KQTEDKGVQCE	(Rodriguez-Crespo et al 2001) (García-Mayoral et al 2010)
GKAP	homme / rat	DynLL2	NRCLSIGIQVD	(Rodriguez-Crespo et al 2001)(Lo et al 2001)
Grin1A	homme	DynLL1	TEVETREIGVG	(García-Mayoral et al 2010)
Hsc73	rat	DynLL1	TTIPTKQTQTF	(Navarro-Lérida et al 2004)
KID-1	rat	DynLL1	SHRTTHSTQTD	(Rodriguez-Crespo et al 2001)(Navarro-Lérida et al 2004)
MAP4	homme	DynLL1	SRSGSKSTQTV	(Rodriguez-Crespo et al 2001)
Mark3	rat	DynLL1	VVAYPKRSQTS	(Navarro-Lérida et al 2004)
METT-10	<i>C.elegans</i>	DynLL1 (homologue)	LNAWDNASQAY	(Dorsett and Schedl 2009)
Myosin Va	homme	DynLL2	QPKDDKNTMTD	(Hódi et al 2006)(Ruzsics et al 2006)(Radnai et al 2010)
NEK9	homme	DynLL1	VGMHSHKGTQTA	(Rapali et al 2011b)(Hutchins et al 2010)(Regué et al 2011)
Nnos	homme	DynLL1	AEMKDTGIQVD	(Rodriguez-Crespo et al 2001) (Radnai et al 2010)(Fan 1998)
NRF1	homme	DynLL1	MEEHGVQTTE	(Lajoix et al 2004) (Herzig et al 2000)
NUP159	levure	DynLL1 (homologue)	SASADFDVQTS	(Stelzer et al 2007)
P53bp1	homme	DynLL1	PSQNNIGIQTM	(Lo et al 2005) (Hutchins et al 2010)
PAK1	homme	DynLL1/2	TPTRDVATSPI	(Lightcap et al 2008) (Radnai et al 2010)(Vadlamudi et al 2005)

RACK1	homme	DynLL1	LGVCKYTVQDE	(Zhang et al 2008)
RASGRP3	homme	DynLL1	RATTSQATQTE	(Okamura et al 2006)
Spice1	souris	DynLL1	QDVLRRTVQTR	(Navarro-Lérida et al 2004)
Swallow	drosophile	DynLL1 (homologue)	SATSALATQTD	(Rodriguez-Crespo et al 2001)(Hall et al 2008)
Syntaphilin	rat	DynLL1	SCMQERAIQTD	(Chen et al 2009)
TRPS1	homme	DynLL1	TEKVDRSTQDE	(Hutchins et al 2010)(Kaiser 2003)
UNC-83	Caenorhabditis elegans	DynLL1 (homologue)	DSISDRHIQTM	(Fridolfsson et al 2010)

Tableau 5 : Interactions connues entre DynLL1/2 et des protéines cellulaires (cargos)

Protéines cellulaires interagissant avec la/les DynLL1 et/ou DynLL2. Toutes les interactions ont été démontrées expérimentalement via différentes expériences : double hybride, interaction *in vitro* immunoprécipitation et cotransfection. Le motif requis pour l'interaction est indiqué dans le tableau. Ces séquences ont permis d'obtenir deux séquences consensus. Tableau adapté de (Merino-Gracia et al 2011)

virus	famille	protéine(s) virale	protéine(s) de la dynéine	motif	référence
Adenovirus	<i>adenoviridae</i>	Adenain*	DynLL1	CITLVKSTQTV	(Martínez-Moreno et al 2003)
ASF virus	<i>Asfarviridae</i>	p54	DynLL1	VTTQNTASQTM	(García-Mayoral et al 2010)(Alonso et al 2001)
Papilloma virus	<i>papillomaviridae</i>	E4*	DynLL1	DHHQDKQTQTP	(Martínez-Moreno et al 2003)
Virus Rabies	<i>Rhabdoviridae</i>	protéine P	DynLL1	RSSEDKSTQTT	(Rodriguez-Crespo et al 2001)(Raux et al 2000)
Virus Mokola	<i>Rhabdoviridae</i>	protéine P	DynLL1	KSTEDKSTQTP	(Rodriguez-Crespo et al 2001)(Jacob et al 2000)
Ebolavirus	<i>Filoviridae</i>	VP35	DynLL1	PKTRNSQTQTD	(Kubota et al 2009)
HIV	<i>Retroviridae</i>	intégrase	DynLL1	-	(Desfarges et al 2009)
HHV-7	<i>Betaherpesvirinae</i>	U19*	DynLL1	TILVSRYSYQTG	(Martínez-Moreno et al 2003)
HHV-1	<i>Betaherpesvirinae</i>	U19*	DynLL1	GVQMAKSTQTF	(Martínez-Moreno et al 2003)

Tableau 6 : Interactions connues entre DynLL1/2 et des protéines virales

Protéines virales qui interagissent avec la/les DynLL1 et/ou DynLL2. Toutes ces interactions ont été démontrées expérimentalement en double hybride, par interaction *in vitro*, immunoprécipitation, cotransfection, (*): pepscan. Tableau adapté de (Merino-Gracia et al 2011)

En analysant les domaines protéiques impliqués dans ces interactions protéine/Dynlc8, il a été identifié deux motifs protéiques très conservés de liaison au dimère : KXTQTX et XG(I/V)QVD (Rapali et al 2011b). Dans ces deux motifs, la glutamine (Q) a une position centrale car elle interagit avec la seconde hélice alpha de DynLc8 alors que le reste du peptide est au fond du sillon. Cependant, certaines protéines ne possèdent pas cette glutamine ce qui laisse envisager l'existence d'autres types d'interaction dans le sillon ou indépendante du sillon.

Les chaînes **DynRb1** et **DynRb2** sont les dernières chaînes légères à avoir été identifiées dans le complexe de la dynéine. Elles auraient des fonctions régulatrices (Nikulina et al 2004). Le niveau d'expression de ces deux protéines est très variable en fonction des tissus. DynRB1 est exprimée dans tous les tissus, alors que DynRB2 n'a pas été identifiée dans le cerveau (Wilson et al 2001; Jiang et al 2001; Nikulina et al 2004). En dehors de l'interaction avec la DynlC, seulement deux protéines cellulaires interagissant avec DynRb ont été identifiées à ce jour : Rab6 qui régule le transport vésiculaire, et le TGF β impliqué dans la prolifération cellulaire.

V.3.4 : Interactions DynlC.DynLC.cargos

Pour le dimère de DynLc8, les domaines d'interaction entre la DynlC et le cargo sont partagés. Des études structurales et thermodynamiques ont montré que les dimères ont plus d'affinité pour des ligands dimériques plutôt que monomériques (Alber et al 2007; Hall et al 2009; Varma et al 2010). Cette contrainte implique le déplacement d'une interaction avec une des DynlC pour interagir avec un des cargos. Cet échange de partenaire n'est pas favorable d'un point de vue thermodynamique (Lightcap et al 2008).

Pour les dimères de DynTctex la situation est différente : les domaines d'interactions avec les cargos sont souvent différents des domaines d'interaction avec la DynlC comme représenté sur la figure 12. Dans cette configuration, l'interaction simultanée des deux partenaires semble possible (Wu et al 2005; Williams et al 2005). Cependant, cette région est peu exposée lorsque DynTctex est dans le complexe de la dynéine (Alber et al 2007).

Les DynRb, comme dit plus haut, auraient un rôle de régulation (Nikulina et al 2004).

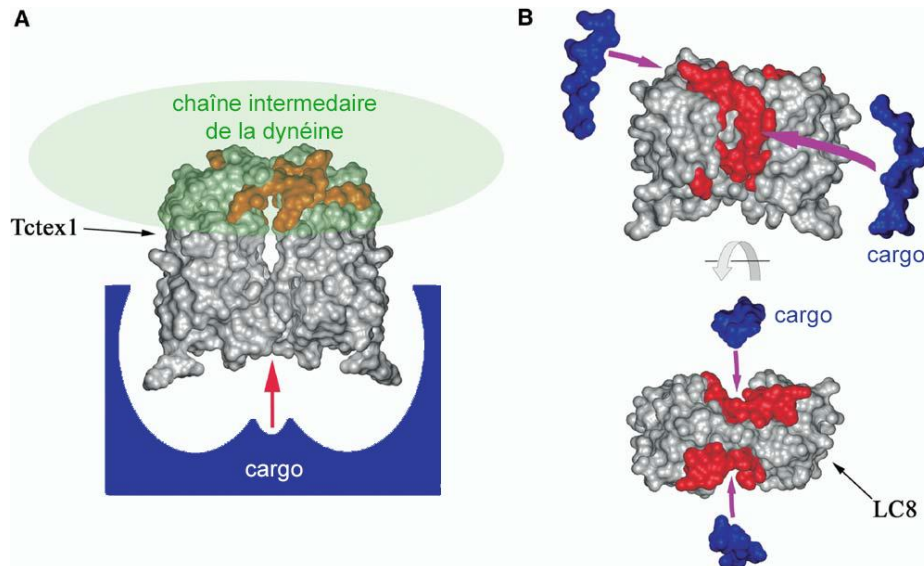


Figure 12 : Interaction cargo DynLc8 et DynTctex

A représentation de l'homodimère de DynTctex avec la localisation de l'interaction avec le cargo en bleu et la DynIC en vert. B : représentation de la structure 3D du dimère de DynLc8. En rouge est identifié le sillon formé par la dimérisation. En bleu le motif consensus présent sur les cargos et la DynIC qui s'insère dans ce sillon (Wu et al 2005).

Chaque homodimère de LC est intégré au complexe de la dynéine *via* une interaction avec la DynIC. Pour les DynTctex et DynLc8, les modalités d'interaction sont similaires: en dimérisant, ces LC forment un sillon qui accueille la DynIC comme montré sur la figure 12. L'interaction entre DynIC et DynTctex se fait *via* le motif **LGMAKITQVDF** localisé dans la partie N-ter de la DynIC. Contigu à ce premier motif il y a le domaine d'interaction avec DynLc8 : **KETQTP**. Les DynRb, quant à elles, interagissent dans la partie C-ter, juste en amont des 7 domaines WD (Figure 10). La dynamique d'association de toutes ces chaînes entre elles n'est pas connue, et deux modèles sont proposés :

- Dimérisation de la DynIC dépendante de l'association aux homodimères de DynTctex et DynLc8 (Alber et al 2007), et ensuite interaction de DynRb: ce modèle correspond au demi-cercle supérieur sur la figure 13
- Dimérisation de la DynIC dépendante de l'association au dimère de DynRb (Nyarko and Barbar 2011), puis interaction avec les homodimères de DynTctex et DynLc8 : ce modèle correspond au demi-cercle inférieur de la figure 13

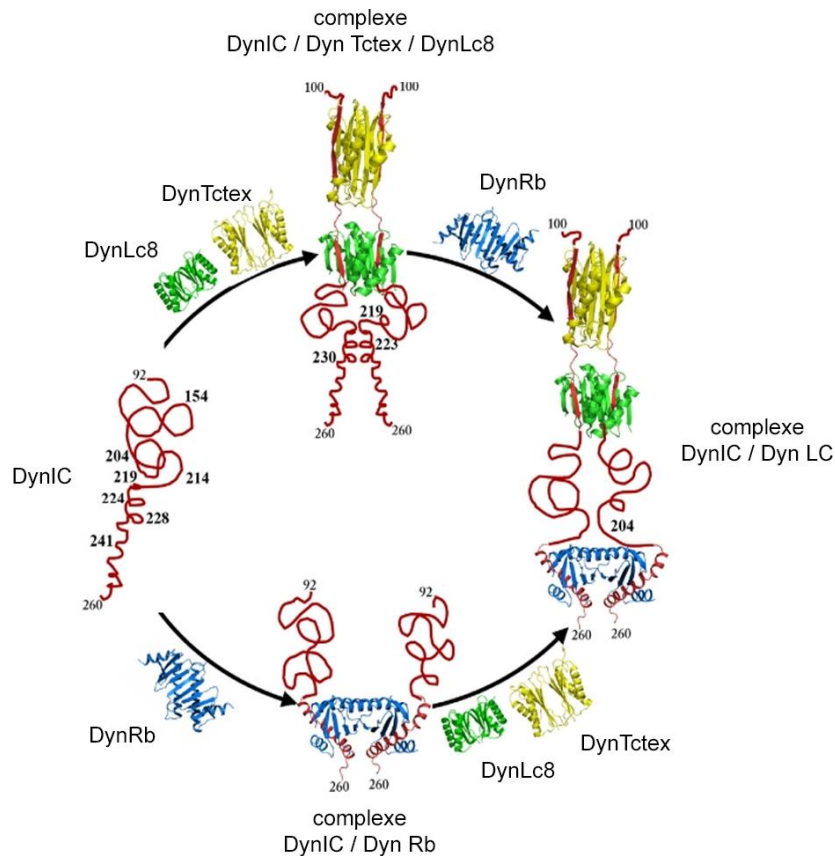


Figure 13 : Interaction entre DynIC et les DynLC (DynTctex DynLc8 et DynRb)

Les deux modèles d'association des DynIC et DynLC. en haut, modèle dépendant de DynTctex et DynLc8 et en bas, modèle dépendant de DynRb : DynIC en rouge, DynRb en bleu, DynLc8 en vert et DynTctex en jaune. Adapté de (Nyarko and Barbar 2011)

Au vu des connaissances actuelles sur les trois familles de DynLC dans le complexe de la dynéine, ces protéines seraient plutôt des protéines régulatrices, ou des protéines chaperonnes. Les DynLc8 agirait comme des « velcro moléculaires ». Elles auraient donc une action indirecte sur les cargos transportés par la dynéine. Cependant on ne peut pas exclure un rôle de ces chaînes légères dans le transport cytoplasmique en utilisant d'autres types d'interactions.

V.3.4 : La dynactine : le complexe adaptateur

Ce complexe protéique est un cofacteur de la dynéine et catalyse le transport de la dynéine le long des Mt. Cet adaptateur permet de transporter des organites mais également le transport de cargos dans les neurones. C'est un gros complexe de 1,2 MDa qui ne possède pas d'activité motrice propre. Il est composé de 11 sous-unités différentes dont certaines sont présentes en plusieurs copies (Figure 14). Deux sous structures composent ce complexe : une structure filamenteuse de 40 nm de

longueur et un bras flexible de 25 à 50 nm. (Karki and Holzbaaur 1999; King and Schroer 2000; Deacon et al 2003; Schroer 2004)

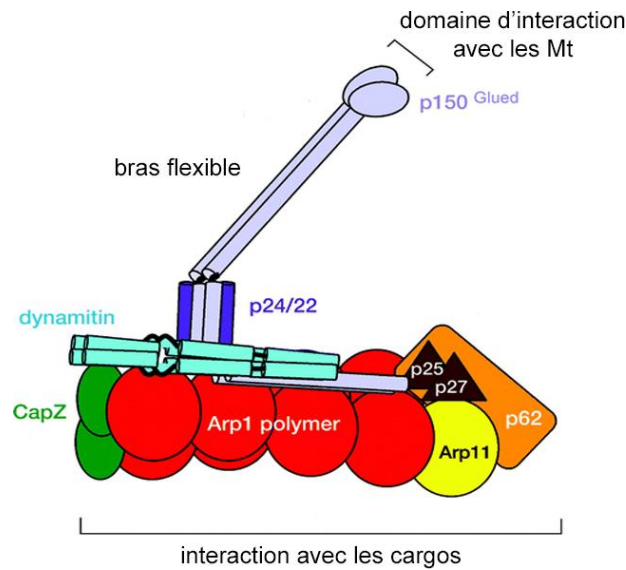


Figure 14 : Structure du complexe de la dynactine

La dynactine est composée de deux structures principales : la première, pour l'interaction avec les cargos, est un filament composé d'un polymère de Arp1 avec une capZ d'un côté et une cap Arp11 p62 de l'autre. La seconde structure est un bras flexible qui interagit avec les Mt et/ou la dynéine. Adapté de (Schroer 2004)

VI : Import nucléaire (introduction)

L'import nucléaire est le mécanisme permettant à des molécules et des protéines d'être transportées dans le noyau. Ce transport nécessite le passage de la barrière de l'enveloppe nucléaire. Pour ce faire, des structures appelées complexes du pore nucléaire, ou NPC, sont présentes sur toute la surface de l'enveloppe nucléaire.

Le NPC est une structure de 60 à 125 MDa, enchâssée dans l'enveloppe nucléaire, constituée d'une trentaine de protéines différentes formant un pore que l'on peut subdiviser en trois parties : un domaine cytosolique, un domaine central au niveau de l'enveloppe nucléaire et un domaine en panier de basket du côté nucléaire. De structure octogonale et plus récemment des NPCs avec une symétrie nonagonale et décagonale (Löschberger et al 2014). Les NPC mesurent 120 nm de large pour 200 nm de long (Figure 15). Les protéines constituant les NPC sont appelées les nucléoporines, elles sont présentes en plusieurs copies (de 8 à 56) et permettent la structuration du NPC (Keminer et al 1999; Cronshaw et al 2002; D'Angelo and Hetzer 2008).

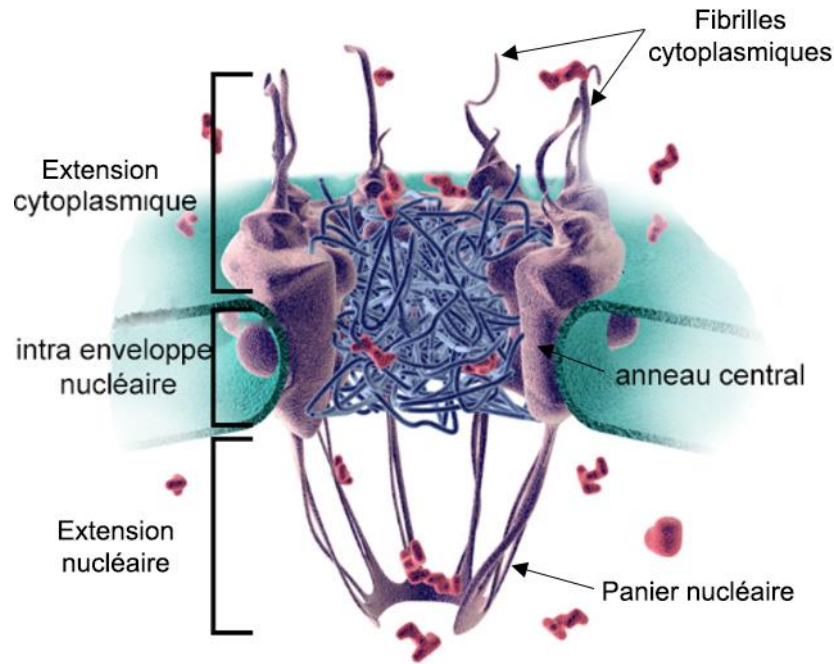


Figure 15 : Structure du NPC

Représentation 3D de la structure du NPC, la membrane nucléaire (en vert) dans laquelle est inséré le NPC. Les trois domaines : extension cytoplasmique comprenant les fibrilles cytoplasmiques, la partie centrale intra enveloppe nucléaire contenant l'anneau central et l'extension nucléaire avec le panier nucléaire. Adapté de (Patel et al 2007)

Le NPC est impliqué dans différents mécanismes cellulaires : organisation de la chromatine, l'apoptose (Ferrando-May et al 2001; Hetzer et al 2005). La fonction majeure reste cependant d'assurer les échanges entre le cytoplasme et le noyau, donc les mécanismes d'import nucléaire.

On distingue le transport passif de petites molécules (inférieur à 10 nm) qui diffusent à travers le NPC, et le transport actif qui dépend de la charge et de la forme des molécules transportées. Ce dernier nécessite de l'énergie et permet le passage de macromolécules *via* la participation de récepteurs qui vont d'une part reconnaître les signaux de localisation nucléaire et d'autre part interagir avec les protéines du NPC. Le signal de localisation nucléaire classique est appelé NLS « Nuclear Localization Signal ». Le premier NLS a été identifié sur une protéine du SV40 (virus) (Kalderon et al 1984). Cette séquence protéique est riche en a.a. basiques (lysine et arginine). Depuis d'autres séquences NLS ont été identifiées (monopartites ou bipartites). Il n'y a pas de séquence consensus de NLS, c'est donc la définition fonctionnelle qui définit une NLS. Il existe également d'autres signaux d'import nucléaire : les séquences BIB (β like Import receptor Binding) (Mühlhäusser et al 2001), le signal M9 (Siomi and Dreyfuss 1995), le domaine KNS (Michael et al 1997).

Parmi les protéines qui permettent le transport nucléaire, on distingue les importines (ou karyophérines) et les transportines. Ces deux familles de protéines transportent les cargos à travers le NPC en interagissant avec les Nups (Chook and Blobel 2001).

PARTIE II : le virus de l'hépatite B

I : Historique

Le virus de l'hépatite B (VHB) humaine a été découvert en 1963 par le Dr Baruch Blumberg. C'est en utilisant des sérums de patients hémophiles multitransfusés (contenant donc beaucoup d'anticorps contre les protéines du sang des donneurs) qu'a été identifié un antigène particulier, l'antigène Australia, qui fût plus tardivement reconnu comme associé à l'hépatite B (Blumberg et al 1967). En effet l'antigène Australia correspond à une protéine de l'enveloppe du virus, l'antigène HBs. En 1976 le Dr. Blumberg obtint le prix Nobel de médecine pour cette découverte, associée à la conception de la première génération de vaccin. Les premières observations microscopiques du virus ainsi que le séquençage du génome ont été faits dans les années 70 (Dane et al 1970; Galibert et al 1979).

II : Taxonomie, prévalence, transmission et évolution de la maladie

Il existe six hépatites humaines de A à G (Kidd-Ljunggren et al 2002; Kramvis et al 2005) Elles sont toutes dues à des virus à ARN, excepté le virus de l'hépatite B qui est à ADN mais qui passe par une étape ARN au cours de son cycle de réplication. Le VHB infecte principalement les cellules hépatiques. Il appartient à une famille de virus nommé les *hepadnaviridae*. Avec les *caulimoviridae* (virus de plantes) ils appartiennent au groupe des pararetrovirus. Parmi les *hepadnaviridae*, les virus ont été classés en deux familles les orthohepadnavirus (virus humain, rongeurs, singes) et les avihepadnavirus (virus d'oiseaux) Le VHB possède huit génotypes, de A à H, les différences de séquences nucléiques entre les génotypes sont de 5% minimum et n'excèdent pas 8%. Ces génotypes diffèrent par leurs distributions géographiques, leurs pathogénicités, les risques de chronicité ainsi que les capacités d'induction de cancers (Dehesa-Violante and Nuñez-Nateras 2007).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'hépatite B est responsable de 600000 décès par an malgré l'existence d'un vaccin efficace. Le VHB a infecté 2 milliards de personnes et plus de 240 millions de personnes vivent avec une infection chronique. C'est l'un des principaux agents infectieux responsables de cancer dans le monde (avec les papillomavirus et le virus de l'hépatite C). Le VHB est la première cause de cancer du foie. Les deux continents les plus affectés sont l'Afrique et l'Asie.

La prévalence du virus est variable, les régions de faible prévalence étant l'Amérique du nord et l'Europe de l'ouest. Il y a des zones géographiques avec une prévalence « modérée » en Europe de l'est, en Russie, au Japon, en Amérique du sud et en Australie. La Chine, l'Asie du sud-est et l'Afrique sub-saharienne sont des zones à haute prévalence (Figure 16).



Figure 16 : Prévalence de l'Ag HBs dans le monde en 2005

Carte représentant la prévalence de l'Ag HBs. Du vert clair au vert foncé : prévalence faible, modérée et élevée (Ott et al 2012).

Les personnes infectées chroniquement sont le réservoir naturel du virus. Chez ces patients, les nouveaux virus sont retrouvés majoritairement dans le sang, mais également (en plus faible quantité) dans le lait maternel, la salive, le sperme et l'urine (Davison et al 1987). Le virus est à titre de comparaison 100 fois plus infectieux que le VIH. La contamination se fait par voie sexuelle, sanguine et de la mère à l'enfant lors de l'accouchement (Shepard et al 2006). Le développement d'une chronicité qui est diagnostiquée par la présence d'Ag pendant plus de six mois, est fonction de l'âge de l'infection : plus l'infection survient jeune, plus le risque de chronicité est élevé (Figure 17).

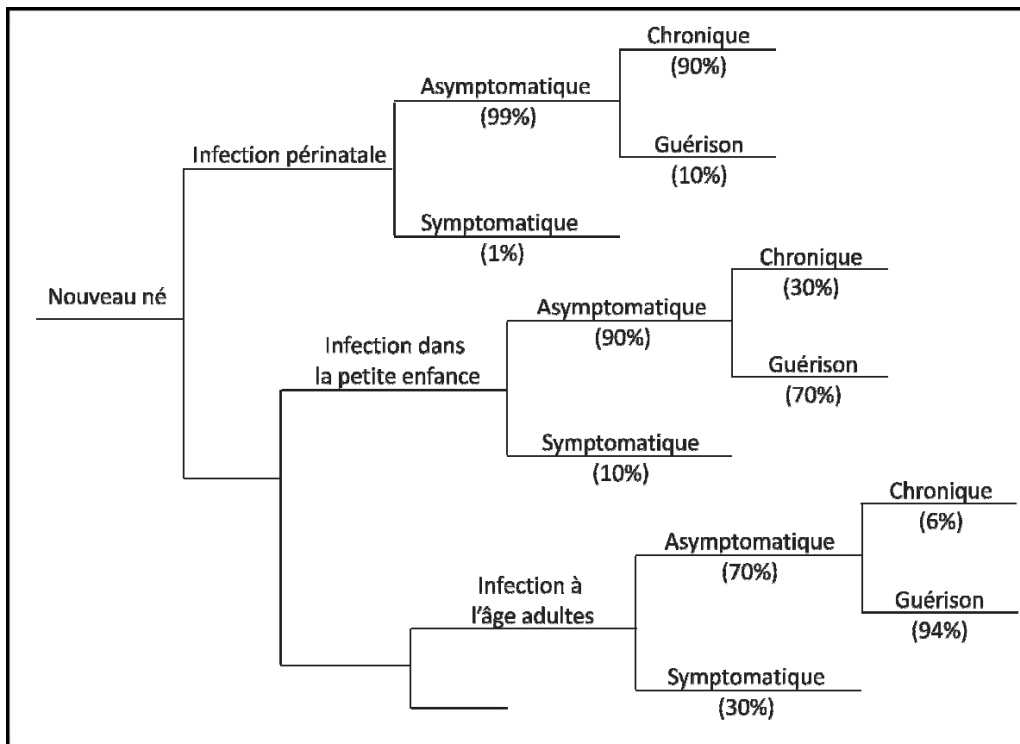


Figure 17 : Développement chronique de l'infection en fonction de l'âge d'infection
Adapté de (Goldstein et al 2005)

L'hépatite B peut évoluer de différentes manières selon la réaction immunitaire des patients contre le VHB : La première phase de la maladie est une hépatite aiguë (dans certains cas fulminante). Dans 60% des cas, l'infection est asymptomatique alors que 40% présentent des signes cliniques d'une hépatite (ictère, trouble digestif). La maladie dure quelques semaines et dans 90% des cas les personnes infectées développent une immunité efficace qui permet la guérison. Dans le cas contraire, c'est une hépatite chronique, souvent asymptomatique (Chu and Liaw 1997), qui s'installe car le virus n'est pas totalement éliminé (équilibre entre réaction immunitaire et réplication virale dû à la présence de l'ADNccc qui persiste dans les hépatocytes infectés). Dans 30% des cas d'hépatite chronique, il existe une inflammation chronique du foie entraînant une fibrose hépatique. Cette pathologie peut aboutir à une cirrhose, et finalement à un cancer du foie (carcinome hépatocellulaire HCC). Certains patients présentent un HCC sans cirrhose.

III : Vaccin et traitement

Le tout premier vaccin a été mis au point en 1976 et était composé d'antigènes de surface HBs (cf chapitre concerné) purifiés à partir de sérum de patients infectés (Maupas et al 1976). La dernière génération de vaccin est commercialisée depuis

1982. Ils sont produits par génie génétique. Ces vaccins sont constitués de protéines de surface recombinantes produites chez la levure (*ENGERIX.®.-B* : GSK) ou en utilisant des cellules CHO (*RECOMBIVAX HB®* : Merck) La prévention contre l'infection repose sur la sensibilisation des personnes vivant dans les zones géographiques à forte prévalence, associée à ces vaccins qui ont une efficacité de 90 à 95%. La réponse au vaccin est mesurée en dosant le taux d'anticorps neutralisants anti HBs.

La plupart du temps les patients guérissent spontanément de l'infection. Les traitements sont majoritairement utilisés pour lutter contre l'infection chronique. Ils ont pour but de réduire la charge virale et de réduire les risques d'hépatocarcinome (HCC). Il existe deux grandes familles de molécules thérapeutiques : les immunorégulateurs, pour stimuler la réponse immunitaire, et les drogues antivirales pour bloquer la réplication du virus (Marcellin et al 2005).

L'immunorégulateur : l'interféron α (IFN- α) associé à un polyéthylène glycol, Peg-IFN- α , a une durée de vie plus longue que IFN- α et a permis de réduire les doses d'IFN- α administrées. Cette cytokine permet de bloquer la synthèse protéique virale, d'activer les cellules immunitaires (Lymphocytes T et Natural Killer) et d'augmenter la présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMHI). Ce traitement est efficace dans seulement 20% des cas et présente de nombreux effets secondaires : symptômes grippaux, fatigue, anomalie hématologique...

Les analogues nucléosidiques (Lamivudine, Entécavir, Telbivudine) et deux analogues nucléotidiques (Adéfovir et Tenofovir) ont amélioré le traitement de l'hépatite B. Il y a cependant une persistance de l'ADN viral dans les cellules (ADNccc). Sur de longues durées ces traitements entraînent des mutations chez le VHB qui permettent la résistance aux médicaments (Zoulim 2011).

D'autres approches sont à l'étude : des vaccins à ADN codant les protéines de surface (Lebray et al 2003). et les PNAs (Peptide Nucleic Acids) qui en s'hybridant sur les acides nucléiques viraux inhibent la transcription ou la traduction par encombrement stérique (Chen et al 2007). Avec l'identification récente du NTCP comme protéine impliquée dans l'entrée du virus, des molécules inhibant l'entrée des virus sont à l'étude (Myrcludex B) (Yan et al 2012; Lempp and Urban 2014).

IV : Biologie moléculaire du virus de l'hépatite B

IV.1 : Structure des virions

La majorité des virions sont infectieux ce qui fait du VHB un virus très efficace. Le virion mature a un diamètre de 42 nm. Les virions matures sont constitués d'une enveloppe dans laquelle s'insère trois glycoprotéines qui sont les protéines de surface : SHBs (small), MHBs (médium) et LHBs (large). A l'intérieur de cette enveloppe, il y a la nucléocapside composée de 240 copies de la protéine HBc capsides de symétrie T4). Il existe également des capsides constituées de 180 copies de la protéine HBc (capside de symétrie T3). La capside contient le génome du virus qui est une molécule d'ADN relâchée partiellement double brin (ADNrc). La polymérase virale est covalamment attachée à l'extrémité 5' de l'ADN. Dans la capside on trouve également une protéine kinase cellulaire : la PKC et des protéines chaperonnes HSP70 et HSP90 (Hu et al 1997; Wittkop et al 2010). Les cellules infectées relarguent en plus des virions, de nombreuses vésicules lipidiques possédant les protéines d'enveloppe virale, appelées particules pseudo-virales, et se présentant sous formes filamenteuses et sphériques en excès de 1000 à 10000 fois par rapport aux virions (Figure 18). Ces particules sont retrouvées en grandes quantités dans le sérum de patients. Elles agiraient comme un leurre sur le système immunitaire (Patient et al 2009).

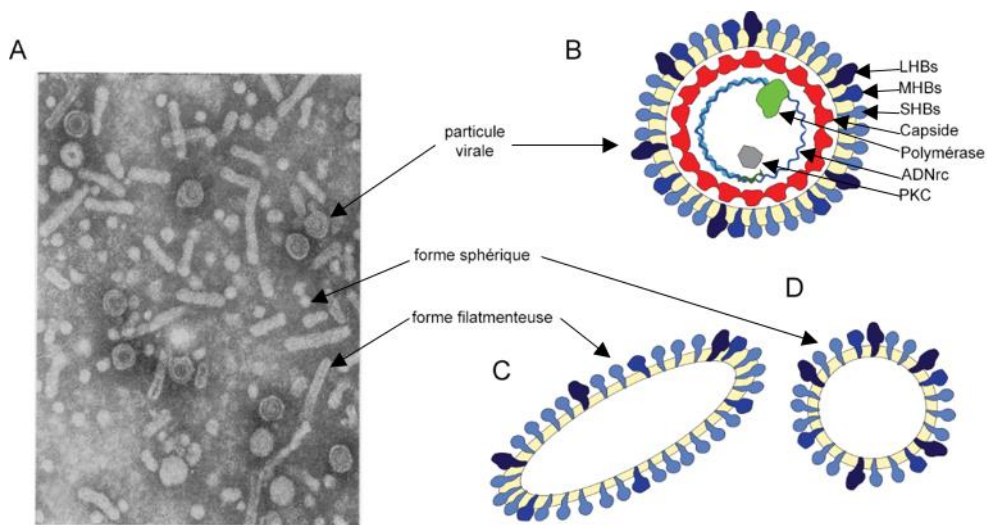


Figure 18 : Particule de Dane, forme filamenteuse et sphérique

A : microscopie électronique de VHB contenu dans le sérum de patient infecté d'après (Stannard et al 1973) B : schéma de la particule de Dane. A l'intérieur de la capside (en rouge) est représenté l'ADNrc avec la polymérase (en vert) et la PKC (en gris). L'enveloppe est constituée de protéines de surface LHBs (bleu clair) de protéines MHBs (bleu) et de protéines LHBs (en bleu foncé). C : schémas des formes filamenteuses. D : schémas des sphères.

IV.2 : Génome viral

Le génome à ADN partiellement double brin du VHB est extrêmement compact avec environ 3200 nucléotides (Figure 19). Il est composé d'un brin négatif contenant une redondance de 7 à 10 nucléotides sur laquelle se fixe covalamment la polymérase virale. Le brin positif est plus court, de taille variable (entre 1100 et 2600 nucléotides). Le brin positif contient une coiffe ARN en 5'. Le génome a une forte capacité codante, le brin négatif possède quatre cadres de lecture (ORF) qui se chevauchent et des éléments de régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles.

L'ORF P couvre 80% du génome et code pour la polymérase virale (Figure 19 en vert).

L'ORF S chevauche l'ORF P et code pour les 3 protéines de surface HBs. Il est composé de 3 régions distinctes que l'on nomme préS1, préS2 et S. Un codon d'initiation est placé au début de préS1 pour l'expression de la protéine LHBs. Un second codon d'initiation est placé au début de préS2 pour l'expression de la protéine MHBs. Le troisième codon d'initiation est placé au début de S et permet l'expression de la protéine SHBs (Figure 19 en rouge).

L'ORF C qui chevauche l'extrémité 5' de l'ORF P. Le premier codon d'initiation permet l'expression de la protéine préHBc qui après maturation donnera l'antigène HBe. Le second codon d'initiation en phase permet l'expression de la protéine HBc, sous-unité constitutive de la capside (Figure 19 en noir).

L'ORF X chevauche l'extrémité 3' de l'ORF P et code pour la protéine HBx (Figure 19 en cyan).

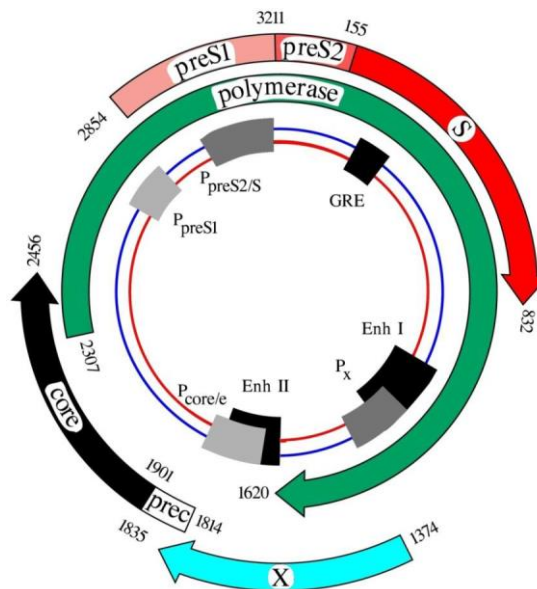


Figure 19 : Organisation des cadres de lecture du génome de VHB

Le génome est représenté au centre par des cercles rouges et bleus montrant les deux brins d'ADN les éléments de régulation transcriptionnelle : les promoteurs (PpreS1, PpreS2/S, Px et PHBc/e), enhancers (Enh I et Enh II) et Glucocorticoïde Responsive Element (GRE). Les positions nucléotidiques des débuts et fins de cadre de lecture ont pour origine le site de restriction EcoRI (dans le domaine préS2). Les protéines de surface HBs avec les domaines préS1, préS2 et S sont représentées en rouge et rose, la polymérase est représentée en vert, la protéine HBx est représentée en bleu et HBc et préHBc sont représentées en noir (d'après Kann M., Hepatitis B Virus, chapitre 2, edited by C.L. Lai and S. Locarnini, second edition, ISBN 978-1-901769-14-2, 2008).

Les éléments de régulation transcriptionnelle sont contrôlés par des facteurs cellulaires et viraux.

Enhancer I (Enh I) stimule la transcription de tous les ARN viraux. Mais également de gène codant pour des facteurs cellulaires tels que NF-kb, NF-1 et AP-1, et d'autre facteurs qui sont hépato-spécifiques : C/EBP, HNF-3 et 4 (Kosovsky et al 1996).

Enhancer II (Enh II) est régulé par des facteurs hépatiques : C/EBP et HNF-4 (Kramvis and Kew 1999).

GRE est stimulé par les glucocorticoïdes et augmente l'activité de Enh I (Tur-Kaspa et al 1988).

NRE inhibe la transcription de l'ARNm HBe *via* différents facteurs: NRE binding protein, MBPI, RFXI (Buckwold et al 1997).

L'élément CCAT régule négativement la transcription du promoteur préS1 mais active la transcription de l'ARNm des protéines MHBs et SHBs (Bock et al 1999).

Les promoteurs contrôlent la transcription des différents gènes : Px, PHBc/e, PpréS1, PpréS2/S (Cattaneo et al 1984).

Il existe des systèmes de régulation au niveau de l'ARN :

Le signal de polyadénylation : tous les ARNm se terminent en 3' par une queue polyA. Le « post transcriptional element » qui prévient l'épissage des ARNm viraux (Donello et al 1996). Le signal ε de l'ARNpg est le site d'attache de la polymérase sur l'ARN et va également servir à l'initiation de la réplication du brin négatif. La présence de ce signal ε en 5' de l'ARNpg sert de signal d'encapsidation (Knaus and Nassal 1993).

IV.3 : Protéines structurales

IV.3.1 : Protéines de l'enveloppe

Les 3 protéines de surface : **SHBs** ; **MHBs** et **LHBs** sont également appelées protéines de l'enveloppe. Elles sont codées par l'ORF S composé des régions préS1, préS2 et S. Il contient 3 codons d'initiation en phase. Les protéines traduites ont toutes le même domaine C-terminal de 226 a.a. mais différent par leur région N-ter. La protéine MHBs possède 55 a.a. de plus que SHBs en N-ter (domaine préS2) et la protéine LHBs possède 119 a.a. de plus que MHBs en N-ter. Ces trois protéines sont adressées au réticulum endoplasmique (RE) où elles s'insèrent dans la membrane. Une fois dans le RE que certains a.a. de ces protéines seront glycosylées. Il y a des N-glycosylation sur les asparagines et des O-glycosylation sur les résidus sérines et thréonines.

La protéine **SHBs** est la plus abondante, représentant environ 85% des protéines de surface de l'enveloppe. C'est une protéine contenant quatre domaines transmembranaires (TM1 à TM4) et une boucle antigénique (BAG) également appelé (MHR Major hydrophilic loop) entre le TM2 et le TM3. Cette boucle sera exposée à la surface des particules virales (Maupas et al 1976). SHBs a deux formes : une protéine non glycosylée (P24) et une protéine glycosylée sur l'a.a. 146 (GP27)

(Peterson 1981). La forme glycosylée représente environ 40% des protéines de surface sur la particule virale (Glebe and Urban 2007) (Figure 20A).

La protéine **MHBs** est composée de 281 a.a. Cette protéine est moins abondante dans les particules virales. Elle a la même topologie que SHBs : quatre domaines TM et une boucle antigénique à la surface des particules virales. Le domaine préS2 rajouté sera également exposé à la surface des particules virales. Cette protéine peut être monoglycosylée sur l'a.a. 4 de préS2 (protéine GP33) ou diglycosylés sur l'a .a. 146 de S et sur l'a.a. 4 de préS2 (protéine GP36). La glycosylation semble nécessaire pour la maturation des protéines M (Figure 20B).

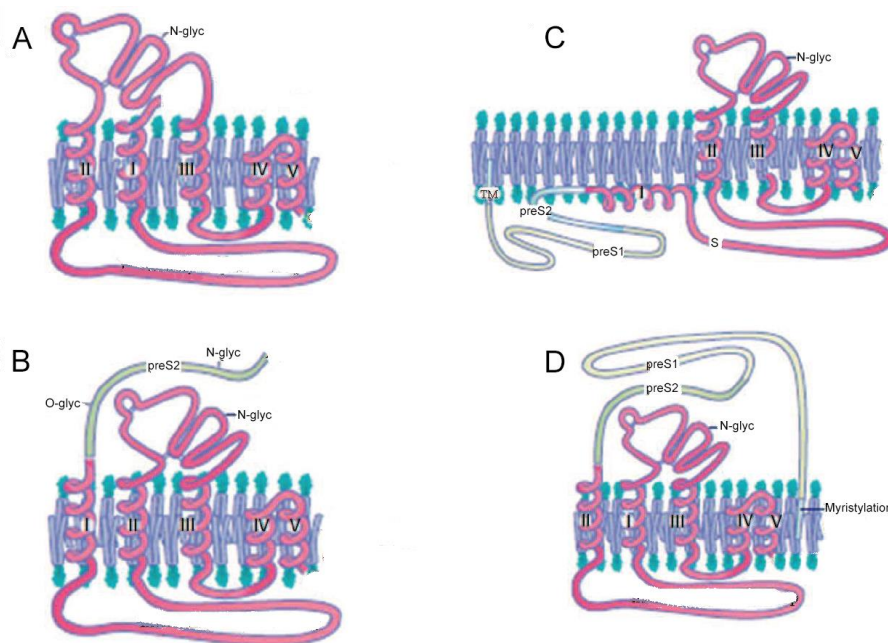


Figure 20 : Modèles topologiques des trois protéines de surface.

A : SHBs, B ; MHBs, C et D : LHBs (d'après Kann M., Hepatitis B Virus, chapitre 2, edited by C.L. Lai and S. Locarnini, second edition, ISBN 978-1-901769-14-2, 2008)

La protéine **LHBs** est composée de 389 à 400 a.a. selon les génotypes. Elle diffère de MHBs par l'ajout en N-ter de préS1. L'extrémité N-ter est ancrée dans la bicouche lipidique par la myristylation de l'a.a. en position 2 de préS1. Cette protéine possède deux topologies pour les domaine préS1 et préS2 de la LHBs : il peut être orienté vers l'intérieur de la particule et interagir avec la capsid *via* le domaine matrice (a.a. 92 à 113) (Prange and Streeck 1995; Seitz et al 2007), ou alors il peut être orienté vers l'extérieur, à la surface des particules virales, et permettre l'interaction, *via* le domaine s'étendant de l'a.a. 2 à 47, avec un récepteur (NTCP) présent à la surface des hépatocytes (Yan et al 2012). L'analyse de virions purifiés à partir de sérum de

patient en microscopie électronique a permis d'identifier deux morphotypes : « compact morphology » et « gapped morphology ». Ces types de virions résultent de différences structurales retrouvées au niveau de PreS1 qui est soit localisé à l'intérieur de la particule ou exposé à la surface (Seitz et al 2007).

Plus tardivement dans le cycle de réplication viral, les protéines de surface auraient une fonction lors du bourgeonnement des nouveaux virus et des pseudo particules (Bruss 2004).

IV.3.2: Protéine HBc et capsides

La protéine HBc

Egalement appelé P21, cette protéine est codée par l'ORF C. Elle est traduite de l'ARNpg. C'est une protéine de 21.5 kDa qui selon les génotypes est composée de 183 à 185 a.a. Elle est très conservée d'un génotype à l'autre. La localisation subcellulaire de HBc est variable, elle est détectée dans le cytoplasme mais également dans le noyau (Li et al 2010).

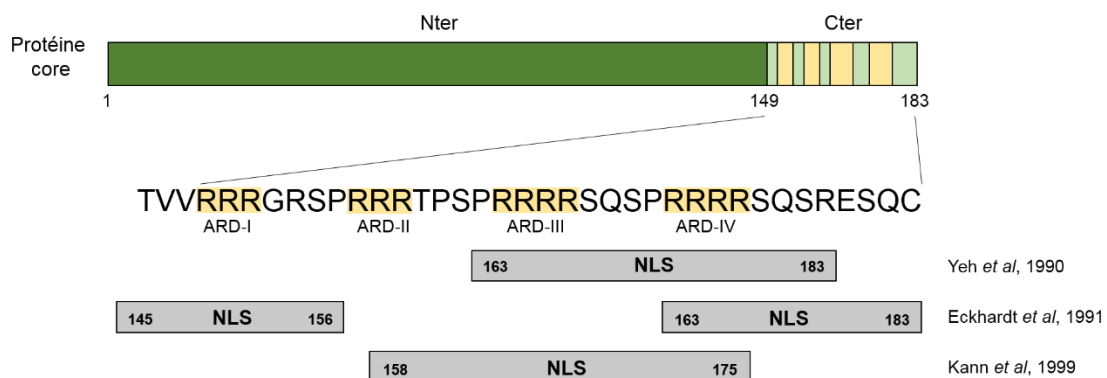


Figure 21 : Protéine HBc du VHB

Représentation schématique de la protéine HBc HBV : ARD : Arginin Rich Domain, NLS : Nuclear Localization Signal. Adapté de (Li et al 2010).

Comme on peut le voir sur la figure 21, la protéine est composée de deux domaines. Le domaine N-ter s'étend des résidus 1 à 149 (151 en fonction du génotype). Les 149 premiers a.a. sont suffisants pour permettre l'homodimérisation. Le domaine C-ter est constitué des 34 derniers a.a. Ce domaine comprend quatre domaines riches en arginine : domaine ARD (Arginin Rich Domain) et également un signal de localisation nucléaire (NLS) (Kann et al 1999). Structuralement, le domaine C-ter est flexible, il est à l'intérieur de la capside en présence d'ARNpg, mais lorsque les

capsides contiennent un génome mature (ADNrc) la partie C-terminal incluant le NLS devient exposée à l'extérieur de la capside.

La capside

Le domaine N-ter de la protéine HBc est également appelé domaine d'assemblage. En effet, ce domaine à lui seul permet la formation de capsides. Cette protéine est hélicoïdale (Crowther et al 1994; Wingfield et al 1995; Bottcher et al 1997).

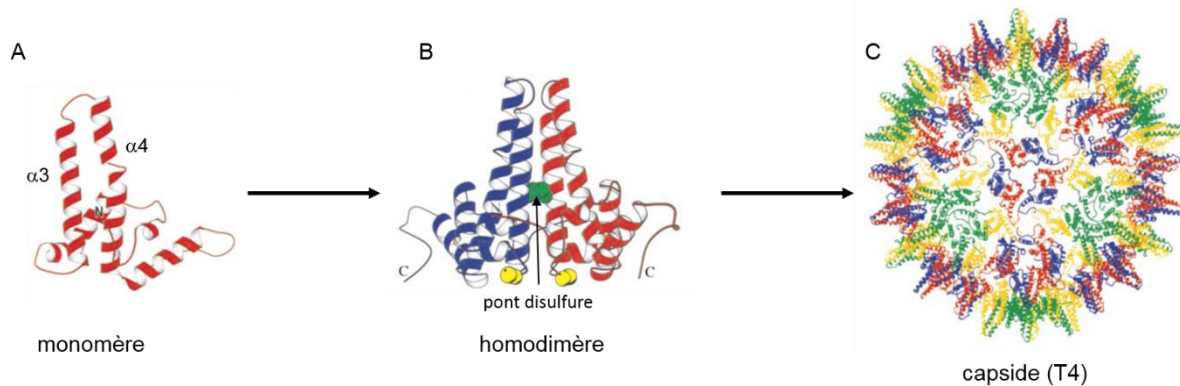


Figure 22 : Structures cristallographiques du monomère de HBc, du dimère et de la capside

A représentation des cinq hélices alpha du monomère de HBc. Sont identifiés sur la figure les hélices alpha 3 et 4. B dimère de monomère de HBc (bleu et rouge) les hélices alpha 3 et 4 forment la pointe immunogénique. En vert sont identifiées les cystéines 61 impliquées dans la formation d'un pont disulfure interchaîne, en jaune sont identifiées les cystéines 48. C : capside entière de symétrie T4 où les monomères sont de couleur bleue, rouge, verte et jaune. Adapté de (Wynne et al 1999).

Les cinq hélices alpha s'organisent en structure antiparallèle et forment une pointe entre les hélices trois et quatre. Ces deux hélices constituant une surface très hydrophobe, elles favorisent leur dimérisation en formant des groupes de quatre hélices (Figure 22). Des ponts disulfures inter-chaîne ont été identifiés. Un *via* la cystéine 61 qui se forme à l'interface du dimère (Zhou and Standring 1992). Ce pont disulfure joue un rôle majeur dans la stabilité des capsides (Selzer et al 2014). Un autre pont disulfure impliquant la cystéine 183 a été identifié après expression de HBc dans des cellules eucaryotes (formation de pont disulfure entre les deux cystéines 183 d'un dimère de HBc) et dans des bactéries (formation de pont disulfure entre les cystéines 183 de différents dimères de HBc) (Seifer and Standring 1994). Trois dimères s'associent pour former des hexamères de HBc qui s'assemblent pour former la capside. La capside dont la taille a été déterminée en cryomicroscopie électronique mesure 36 nm et a une structure icosahédrique. Deux structures différentes ont été observées en microscopie électronique et en cryomicroscopie

provenant de capsides assemblées *in vivo* et *in vitro* (Cohen and Richmond 1982; Crowther et al 1994; Conway et al 1997):

- La forme minoritaire : forme T3 est composée de 180 monomères de HBc pour un diamètre de 32 nm
- La forme majoritaire : forme T4, qui représente 80 à 90% des capsides, est composée de 240 monomères de HBc pour un diamètre de 36 nm

Ces structures ont à leur surface des pores de 1,3 nm permettant la diffusion de petites molécules comme les nucléotides.

La capside dans le cycle de réplication du virus

La capside *via* les résidus 76 et 82 de HBc interagit avec le domaine preS1 de la protéine de surface L du VHB (Bruss 1997). Dans les étapes précoces de l'infection, la capside permet le transport du génome jusqu'au noyau des cellules hépatiques (Rabe et al 2006). Le génome est ainsi protégé des réponses cellulaires (TLR : Toll Like Receptor). La séquence NLS présente dans le domaine C-ter de HBc permet le transport des capsides jusqu'au panier nucléaire du NPC.

Plus tardivement dans le cycle de réplication du virus, ce domaine C-ter est important pour la maturation du génome qui va passer de la forme ARNpg à ADNrc (voir X.8 : retrotranscription de l'ARNpg). Ce mécanisme se déroule exclusivement dans la capside.

Plusieurs sérines peuvent potentiellement être phosphorylées. Le laboratoire a montré l'implication la Protéine Kinase C (PKC) dans la phosphorylation de HBc (Wittkop et al 2010). D'autres protéines kinases phosphorylent la protéine HBc : SRPK 1 et 2 (Serine/Arginine protein specific kinase 1 et 2) (Daub et al 2002), cdc2/cdk2 (cyclin dependant protein kinase) (Yeh et al 1993; Ludgate et al 2012) et une sérine kinase de 46 kDa (Kau and Ting 1998). De récents travaux montrent que l'état de phosphorylation de HBc est dépendant des protéines qui interagissent avec HBc (Ludgate et al 2011). Le rôle des phosphorylations est important dans plusieurs étapes du cycle de réplication du virus :

- L'import nucléaire (Kann et al 2007).
- L'encapsidation de l'ARNpg *via* la sérine 164 (Le Pogam et al 2005).

- La réplication du génome (Gazina et al 2000; Basagoudanavar et al 2007). La phosphorylation de la sérine 172 est requise pour la synthèse du brin positif de l'ADNrc (Lan et al 1999).

Cependant l'état de phosphorylation des capsides *in vivo* est très mal connu. Au regard des protéines kinases hypothétiquement impliquées, la compréhension des mécanismes cellulaires et viraux dépendant de ces phosphorylations est compliquée.

Les capsides recombinantes

La protéine HBc a été exprimée dans les cellules de différents organismes, bactéries (Burrell et al 1979; Stahl et al 1982), levures (Rolland et al 2001), cellules d'insecte (Seifer et al 1998), cellules de mammifères et des ovocyte de *Xenopus laevis* (Seifer et al 1993) (travaux non publiés de nos collaborateurs P Pumpens, Riga) et à chaque fois l'expression hétérologue de la protéine HBc a conduit, de par ses propriétés d'assemblage, à la production de capsides dans ces cellules. Systématiquement, lors de leur assemblage, de l'ARN messager cellulaire se retrouve encapsidé « au hasard ». Des capsides peuvent également s'assembler *in vitro* (Ceres and Zlotnick 2002) cependant l'ARN accélère l'assemblage (Rabe et al 2009). Les capsides surexprimées chez la levure sont phosphorylées par une kinase endogène (Freivalds et al 2011) et acétylées (Watelet et al 2002). Des capsides ont également été produites et purifiées à partir de cellules d'insecte. Les capsides produites à partir d'*E.coli* et de *P.pastoris* sont purifiées par centrifugation sur gradient de saccharose suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille. Des observations en microscopie électronique à partir des capsides recombinantes ont permis d'observer des capsides T3 et T4 (Crowther et al 1994). Cependant il semblerait que la vitesse d'assemblage influence les proportions des deux symétries. Des acides nucléiques (ARNm) sont encapsidés dans les deux types de capside. Ces capsides recombinantes ont permis des études structurales en cryoelectromicroscopie (CryoEM) et par cristallographie aux rayons X (Bottcher et al 1997; Conway et al 1997; Yu et al 2013). Des méthodes d'encapsulation de composés ont également été étudiées : une méthode d'encapsulation de la GFP a été mise au point (Lee and Tan 2008). Ces capsides recombinantes sont également utilisées pour la mise en place de tests diagnostiques pour la détection d'anticorps anti HBc dans les sérums de patients. (Li et al 2007)

IV.4 : Protéines non structurales

IV.4.1 : Polymérase virale

La polymérase (P) est codée par l'ORF P traduite à partir de l'ARNpg. Elle est composée de 832 à 845 a.a. selon le génotype, pour une masse moléculaire de 90 kDa. Cette protéine est composée de quatre domaines identifiés et distincts (Figure 23). De l'extrémité N-ter vers la C-ter, on trouve successivement le domaine TP « Terminal Protein », le domaine Spacer, le domaine RT « Reverse Transcriptase » et finalement le domaine RNaseH.



Figure 23 : La polymérase virale et ses différents domaines

Les différents domaines de la polymérase sont bornés par la position des a.a. en chiffre, le domaine catalytique ou domaine YMDD est spécifié. La barre horizontale noire représente 100 a.a.

Le **domaine TP** de l'a.a. 1 à 178, est essentiel pour la réplication. Deux régions du domaine TP sont importantes pour le priming : la région C-ter essentielle pour la liaison à l'ARN, et la tyrosine 63 (Wang and Seeger 1992) qui initie la synthèse d'ADN. Une autre étude suggère l'existence d'un autre résidu essentiel, l'arginine en position 105 qui serait primordiale pour l'encapsidation (Shin et al 2011).

Le **domaine Spacer** s'étend entre les a.a. 179 et 236 et assure à la protéine une grande flexibilité, très importante pour la réplication. En effet le domaine TP est fixé au brin négatif du génome viral au niveau de la structure ϵ pendant que les domaines RT et RNaseH sont quant à eux fixés à la boucle apicale de la structure ϵ pour effectuer l'activité catalytique. La partie C-ter de ce domaine est indispensable pour la liaison à l'ARNpg (Radziwill et al 1990).

Le **domaine RT** de l'a.a. 337 à 680, est le domaine de transcriptase inverse et ADN polymérase de la protéine. Il contient un domaine YMDD, site catalytique de l'enzyme. Ce site est très conservé chez tous les hépadnavirus. Ce domaine permet la synthèse du brin d'ADN négatif à partir de l'ARNpg

Le **domaine RNaseH**, situé en C-terminal de l'a.a. 680 à 832, permet de dégrader l'ARN viral au fur et à mesure de la rétrotranscription.

La polymérase s'accumule dans le cytoplasme (Cao and Tavis 2004) et une interaction entre la polymérase et la protéine HBc a été montrée dans des cellules d'insecte et dans les cellules HuH7 en utilisant différents vecteurs. Cependant ces deux protéines ne coprécipitent pas et un autre facteur semble nécessaire. Les résultats présentés dans la publication en annexe indiquent que la localisation de HBc et des capsides dans les cellules est dépendante de deux partenaires : d'une part, la polymérase, ce qui confirme les colocalisations observées d'autre part la structure ϵ de l'ARNpg (Deroubaix *et al* 2014).

IV.4.2 : Protéine HbX

La protéine X est la plus petite protéine du VHB : 154 a.a. pour 17.5 kDa. Cette protéine est conservée chez les orthohépadnavirus et absente chez les Avihepadnavirus. HBx est peu exprimée lors des hépatites aiguës et chroniques, mais influence la réponse immunitaire (Hwang et al 2002; Malmassari et al 2005). Deux modifications post-traductionnelles sont connues : la phosphorylation (Schek et al 1991) et l'acétylation, lorsque HBx est exprimée dans des cellules d'insecte (Urban et al 1999). Elle semble nécessaire pour l'initiation et le maintien de la réplication dans les cellules différenciées (Lucifora et al 2011), elle active la transcription de gènes cellulaires en interagissant avec des facteurs de transcription (Keasler et al 2007; Kim et al 2007). Lorsque HBx est faiblement exprimée (très similaire *in vivo*) la protéine est localisée dans le noyau (Chang et al 2001).

IV.4.3: Protéine préHBc et antigène HBe

HBe est une protéine sécrétée par les cellules infectées. Elle dérive d'un précurseur, la protéine préHBc (P25) qui est une protéine de 25 kDa. Bien que les protéines préHBc et HBc soient issues de l'ORF C, la protéine HBc est traduite à partir de l'ARNpg alors que préHBc est codée par l'ARN préC. Il y a 29 a.a. supplémentaires en N-ter pour préHBc. Dans ces 29 a.a. il y a un signal permettant l'adressage aux voies de sécrétion le long desquelles la protéine va être maturée. Le signal d'adressage va être clivé pour obtenir la protéine P22 de 93 a.a (Standring et al 1988) Les acides aminés surnuméraires (par rapport à HBc) empêchent la formation de capsides. La protéine P22 étant engagée dans la voie de sécrétion sera clivée en C-ter (riche en arginine) dans l'appareil de Golgi et/ou les vésicules de sécrétion par

la furine. Il existe deux sites de clivage : après l'a.a. 167 produisant la protéine P20 et après l'a.a.154 produisant l'Ag HBe qui est sécrété. (Messageot et al 2003)

Cette protéine de 17 kDa est surtout exprimée au début de l'infection. La protéine n'est pas indispensable au cycle viral car même si elle est impliquée dans l'établissement de la persistance, elle ne semble pas avoir de rôle dans son maintien. Le dosage de cette protéine est cliniquement utilisé comme marqueur de l'évolution de l'infection (corrélation entre quantité HBe et la charge virale). Lors de l'infection après une phase d'immunotolérance peut survenir une phase d'immunoclearance avec une réaction lymphocytaire cytolytique qui fait augmenter le taux des transaminases et diminuer la réplication virale. Cela se traduit aussi par une diminution de la charge virale et une sécrétion de l'Ag HBe, au cours du temps des Ac anti HBe apparaissent : c'est la séroconversion HBe. C'est est un mécanisme encore mal connus (Lai and Yuen 2007).

V: Cycle de réplication du VHB

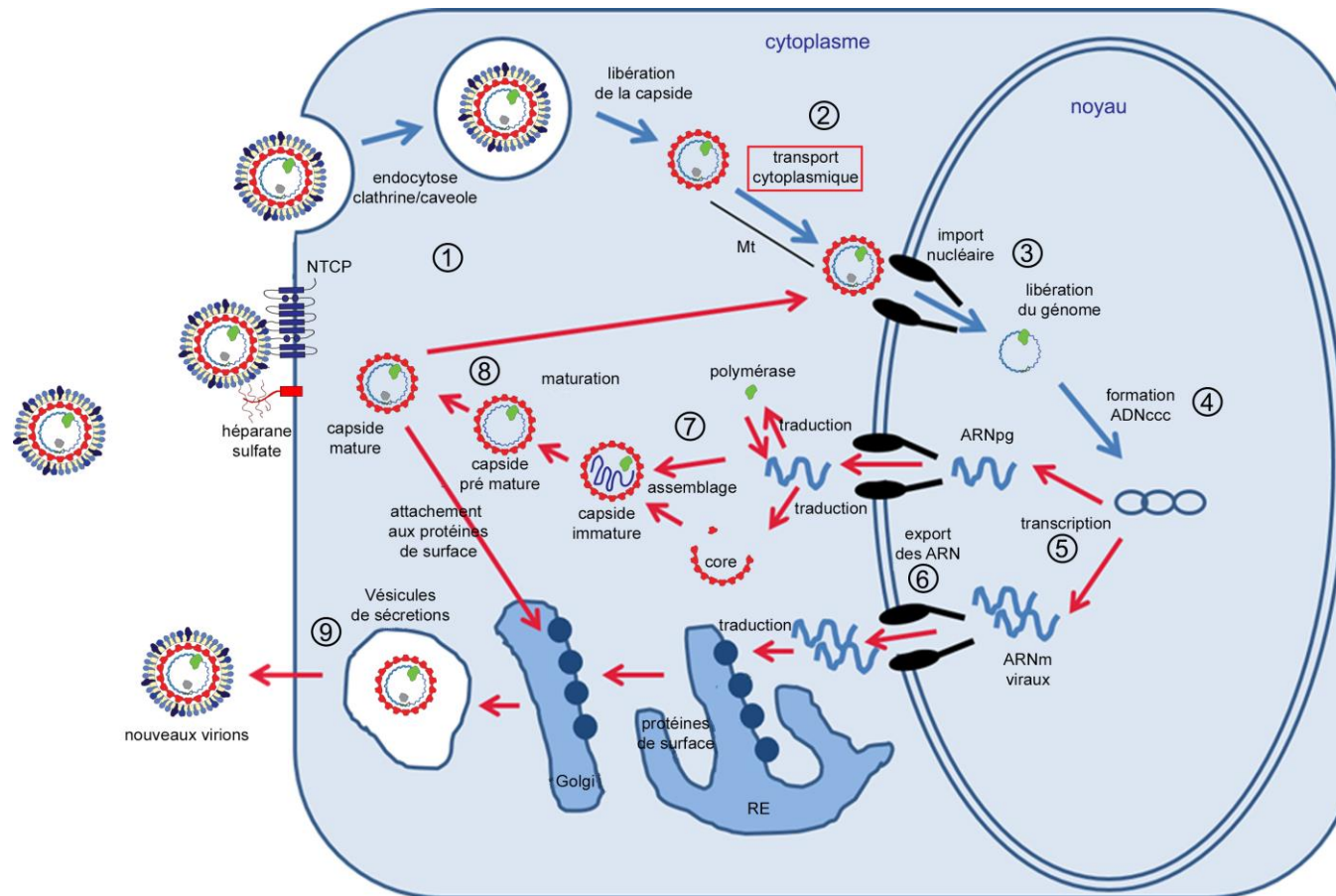


Figure 24 : Cycle viral du VHB

Schéma résumant le cycle viral dans un hépatocyte infecté par le VHB. 1) Après fixation aux héparanes sulfates présent sur les glycosaminoglycanes et au récepteur NTCP à la membrane plasmique basolatérale, le virus est endocyté puis libère la capside dans le cytoplasme. 2) Celle-ci migre jusqu'au NPC en utilisant le réseau de Mt. 3) Dans le NPC la capside se désassemble et le génome est libéré dans le noyau. 4) La polymérase virale convertit l'ADNrc en ADNccc. 5) L'ADNccc est transcrit en ARNm et en ARNpg. 6) Ces ARN sont exportés vers le cytoplasme. 7) La polymérase neosynthétisée s'associe avec l'ARNpg et avec Hbc pour former des capsides immatures. 8) La rétrotranscription de l'ARNpg permet la formation de capsides matures qui vont soit être redirigées vers le noyau pour augmenter le pool d'ADNccc, soit enveloppées au niveau des corps multivesiculaires. 9) Les particules assemblées sont dirigées vers la membrane cytoplasmique *via* l'appareil sécrétoire pour être libérées dans le milieu extracellulaire.

V.1 : Entrée du virus

Le VHB a une spécificité d'hôte restreinte, il n'infecte que l'Homme et le singe. Cependant il y a des équivalents au VHB dans les autres espèces : DHBV (canard), WHBV (marmotte) très différent du VHB et appartenant aux *orthohepadnaviridae*. On le retrouve principalement dans les hépatocytes (Mason et al 1993) mais également dans les lymphocytes (Laure et al 1985), les cellules pancréatiques (Yoshimura et al 1981)... Cependant le VHB ne peut se répliquer que dans des cellules hépatiques (Gripon et al 1988). L'entrée du virus dans les cellules se fait en trois étapes : i) l'attachement aux cellules hépatiques, ii) l'endocytose (clathrine et/ou cavéole dépendante (Cooper and Shaul 2006; Macovei et al 2010)) ou fusion, iii) la libération de la capsid dans le cytoplasme.

L'attachement des virus aux hépatocytes nécessite des interactions entre le virus et les cellules. Cet attachement est localisé à la membrane basolatérale des hépatocytes. Les modèles cellulaires d'infection par le VHB étaient très compliqués à mettre en place. Ces modèles utilisaient des lignées primaires d'hépatocytes (PHH : Primary Human Hepatocyte et PTH Primary Tupaia Hepatocyte). Ces cellules primaires, de qualité variable perdent leur permissivité à l'infection par le VHB cinq jours après la mise en culture. A partir des années 2000, un modèle basé sur une lignée de cellules d'origine hépatique: les HepaRG a été mis en place. Les conditions d'infection de ces cellules après différenciation ont été mise au point (Gripon et al 2002). Cependant, l'efficacité de l'infection demeurait très basse, voisine de 10%. Ces modèles infectieux ont permis d'obtenir quelques données : l'attachement des virus aux cellules se fait par l'intermédiaire du domaine préS1 de la protéine LHBs exposée à la surface des virus (Glebe and Urban 2007). Ce domaine interagit avec les cellules *via* les a.a. 3 à 77 (Le Seyec et al 1998). La myristylation de l'a.a. 2 (glycine) est nécessaire (Gripon et al 1995). Le rôle des glycosaminoglycanes a été mis en évidence. En effet, LHBs interagit avec les heparanes sulfates présents sur les glycosaminoglycanes. Cette interaction est réversible et ne permet pas à elle seule l'entrée des virus dans les cellules (Sureau and Salisse 2013). Quelques récepteurs candidats ont été proposés en utilisant ces modèles : l'annexine V, l'apolipoprotéine H, la fibronectine, la carboxypeptidase D... (Neurath and Strick 1994; Budkowska et al 1995; Glebe and Urban 2007). Toutes ces protéines semblent pouvoir interagir avec préS1 mais n'ont pas permis de mettre en place un système

infectieux. Depuis 2012, et l'identification du transporteur de taurocholate SLCA10A1 (NTCP) comme étant un récepteur d'entrée du virus dans les cellules hépatiques, a permis de faire des progrès significatifs (Yan et al 2012). Depuis deux ans de nombreux laboratoires ont travaillé de pair sur la mise en place d'un système infectieux beaucoup plus facile à utiliser (Watashi et al 2014) (Données non publiées : International HBV meeting 2013 et 2014). Nous ne disposons pas encore de ce système dans notre laboratoire, mais nous essayons actuellement de le mettre en place.

Les étapes d'endocytose ou de fusion ne sont pas connues. Depuis peu, l'endocytose est l'hypothèse la plus probable. Des résultats obtenus sur des PHH suggèrent une endocytose clathrine-dépendante (Cooper and Shaul 2006) alors que l'utilisation de cellules HepaRG différenciées oriente plutôt vers une endocytose cavéole-dépendante (Macovei et al 2010). Après endocytose, le virion fusionnerait avec la membrane endosomale pour libérer la capsidite dans le cytoplasme. Pour la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane endosomale l'acidification ne semble pas nécessaire.

V.2 : Migration de la capsidite via le réseau de Mt

Après le relargage des capsidites dans le cytoplasme, elles doivent être transportées jusqu'au noyau pour y délivrer le génome viral. L'unique travail sur cette étape a été réalisé jusqu'à présent par notre équipe. Des colocalisations de capsidites avec des Mt ont été observées chez des cellules HepG2.2.15 fixées. En utilisant la lipofection de capsidites matures qui permet une infection productive, le génome libéré du virus peut être détecté par Fish (hybridation *in situ* en fluorescence) en condition native dans le noyau dès 15 min. Le transport est donc rapide ce qui suggère un mécanisme actif. En utilisant du nocodazole, agent qui dépolymérise les Mt, le génome n'est alors plus transporté jusque dans le noyau (Rabe et al 2006).

Lorsque les capsidites arrivent à la périphérie nucléaire, le mécanisme de détachement des Mt après le transport est complètement inconnu et demeure très énigmatique, non seulement pour les virus en général, mais également pour les cargos cellulaires qui doivent atteindre le noyau en utilisant les Mt. C'est une étape qui doit être rapide. Pour les virus et cargos cellulaire, cette étape n'est pas synchrone, aussi il s'avère ardu de travailler sur ce mécanisme. Des mutants

« naturels » de virus bloqués à cette étape pourraient être de bons outils, mais difficiles à obtenir car défectifs et donc inconnus. Quelques pistes de travail peuvent tout de même être envisagées comme les mécanismes permettant le détachement des Mt du MTOC (McBeath and Fujiwara 1990), les mécanismes de détachement des cargos à la membrane cytoplasmique (à l'extrémité positive des Mt) (Mimori-Kiyosue et al 2000), la dissociation des MAPs et surtout du complexe de la dynéine (Redwine et al 2012; Cleary et al 2014).

V.3 : Import nucléaire et libération du génome

L'import de la capsid du VHB est possible grâce aux protéines HBc. En effet chacune des protéines HBc contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) dans leur partie C-ter (Kann et al 1995). Ce motif NLS devient exposé pendant la maturation du génome et va être reconnu par l'importine α (Rabe et al 2003). L'importine α est une protéine adaptatrice qui va elle-même être reconnue par l'importine β qui est une protéine d'import nucléaire (Rabe et al 2003) (Figure 25A). Le complexe capsid/importines va alors pouvoir traverser le NPC pour arriver jusqu'au panier nucléaire (Figure 25B). C'est dans cette structure du NPC que se localise la Nup153. Nous avons montré que la Nup153 stoppe la capsid dans le panier en interagissant avec le complexe capsid/importines (Schmitz et al 2010) (Figure 25C). Le mécanisme de libération du génome n'est pas encore connu précisément et est en cours d'étude au laboratoire (Figure 25 D, E et F).

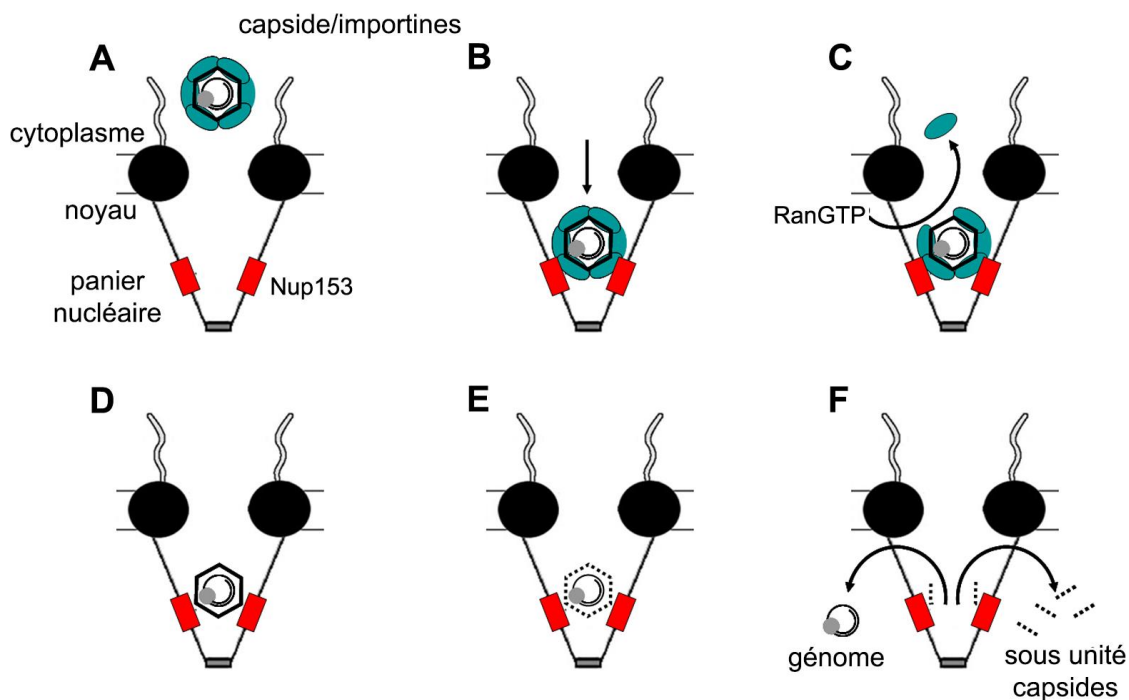


Figure 25 : Import nucléaire des capsides du VHB

A. formation du complexe capside/importines. **B.** transport du complexe capside/importines jusqu'au panier nucléaire. **C.** interaction de RanGTP avec les importines entraînant la dissociation du complexe capside/importine. **D.** Après la dissociation des importines, la capside interagit directement avec la Nup153. **E.** les capsides se désassemblent **F.** le génome viral est libéré dans le noyau, les sous-unités de capsides vont également dans le noyau. Nup153 en rouge, importines α et β en vert la capside est représentée par l'hexagone contenant le génome (cercle noir) et la polymérase (en gris). (Schmitz et al 2010)

V.4 : Réparation et conversion du génome viral

Le génome est libéré sous forme circulaire relâchée, partiellement double brin. Seul le brin négatif est complet. L'ADN est converti en ADN circulaire covalamment clos (ADNccc) qui sera utilisé comme matrice pour la transcription des ARN. Cette conversion nécessite plusieurs étapes pas encore bien définies tant dans leur ordre respectif que par les enzymes impliquées. Plusieurs étapes doivent cependant être nécessaires (Figure 26). La polymérase est éliminée en 5' du brin négatif (Königer et al 2014). TDP2 (tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2) cliverait la liaison entre la tyrosine et la polymérase (A), ensuite il y a le clivage de la redondance (B) puis la suppression de la coiffe ARN en 5' du brin positif (C). La finalisation de la synthèse du brin positif (D) et la ligation des extrémités 5' et 3' des deux brins (E). Puis finalement l'enroulement en minichromosome (F) grâce aux histones acétylées (Lucifora et al 2008).

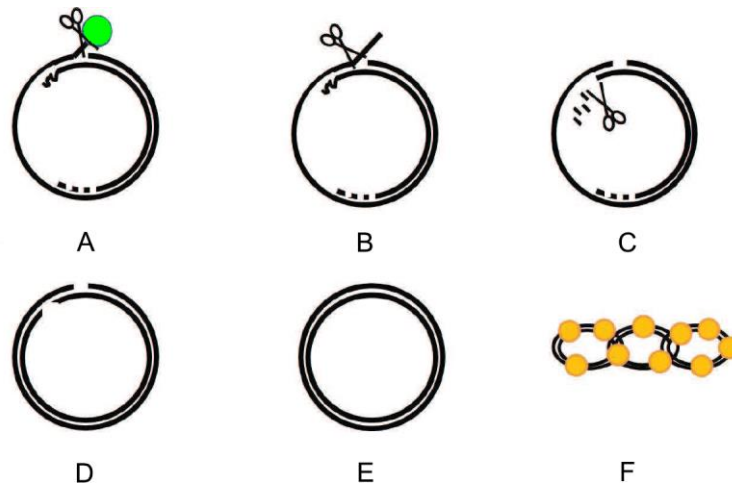


Figure 26 : Réparation du génome viral

Les étapes des différents mécanismes de A à F sont énumérées dans le texte. Le génome est représenté par les cercles en noir, la polymérase en vert. Les histones en jaune

La transcription des ARN viraux s'effectue dans le noyau. Le brin négatif est utilisé comme brin matrice pour la synthèse des transcrits viraux. Cette transcription est réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire (Rall et al 1983). Ces transcrits sont classés en deux familles : les ARN de taille génomique et les ARN subgénomiques. Tous les ARN possèdent un signal de polyadénylation en 3' et sont coiffés en 5'. Chaque ARN possède son propre site d'initiation, comme décrit dans l'organisation du génome. L'ARN pré-génomique (pg) et l'ARN pré-C ont une taille supérieure à la taille du génome (environ 3.5 Kb). Les ARN subgénomiques sont de tailles différentes : un ARN de 0,8 kb permet la synthèse d'HBx, les ARN de 2,1 kb et 2,4 kb permettent la synthèse des protéines de surface SHBs, MHBs et LHBs.

V.6 : Transport des ARN viraux dans le cytoplasme

Le mécanisme d'export des ARN du VHB est encore inconnu. La majorité des ARN viraux ne subissent pas (peu) d'épissage. Les séquences PRE (Post-transcriptional Regulatory Element) sont impliquées dans l'export des ARN viraux (Huang and Yen 1995). On localise cette séquence sur tous les ARN viraux à environ 750 nt de l'extrémité 3'. Elle chevauche la séquence régulatrice Enh1. Le PRE possède une structure secondaire constituée de deux tiges boucles (Schwalbe et al 2008) ce qui facilite l'export nucléaire en recrutant la protéine Crm1, qui associée à Ran GTP permet l'export des ARN dans le cytoplasme (Smith et al 1998). Des protéines cellulaires pourraient cependant jouer un rôle de modulateur de l'expression en interagissant avec la structure PRE : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

(GAPDH) (Donello et al 1996) et la Polypyrimidine Tract Binding (PTB)(Niepmann et al 1997; Roy et al 2013).

V.7 : Formation de la capsid et encapsidation de l'ARNpg

L'assemblage des capsides est la première étape de la morphogénèse. Cette étape est dépendante de la quantité de protéine HBc dans le cytoplasme. La formation de capsides est étroitement associée à l'encapsidation de l'ARNpg qui est amorcée par la polymérase virale sur le signal d'encapsidation ϵ présent sur l'ARNpg (Knaus and Nassal 1993; Kramvis and Kew 1998). La séquence ϵ est une structure constituée de 65 nt organisés en une structure en épingle à cheveux composée d'une boucle apicale et de deux tiges séparées par une boucle interne asymétrique. Des mutations sur la structure ϵ affectent soit l'encapsidation soit la synthèse d'ADN (Fallows and Goff 1995). Des études de spectrométrie de masse ont montré que le repliement de la boucle apicale était essentielle pour la reconnaissance par la polymérase (Flodell et al 2002). Des protéines HBc vont ensuite être recrutées afin de former la capsid. La protéine HSP90, partenaire potentiel de HBc, pourrait faciliter ce recrutement (Shim et al 2011).

V.8 : Rétro-transcription de l'ARNpg

L'ARNpg sert de matrice pour la production du brin long d'ADN négatif. Ce mécanisme est effectué par la polymérase virale qui va transcrire l'ARNpg en ADNrc (Beck and Nassal 2007).

V.8.1 : Initiation et synthèse du brin long d'ADN négatif

La structure ϵ permet l'initiation de la réplication. La polymérase utilise la séquence 5'-UUCA-3' dans la boucle asymétrique interne de la structure ϵ comme matrice pour la synthèse de l'amorce. Cette étape d'initiation est étroitement lié à l'encapsidation de l'ARNpg et est donc potentiellement aidé par les protéines chaperonnes. L'initiation se localise au niveau du groupement hydroxyle de la tyrosine 63 situé dans le domaine TP de la polymérase et forme un liaison covalente avec la guanine de l'amorce (Beck and Nassal 2007). Ce complexe polymerase/amorce est situé en 5' de l'ARNpg ce qui va rapidement stopper la synthèse (Figure 27A). La redondance des extrémités de l'ARNpg va permettre de continuer la synthèse après un saut intramoléculaire du complexe polymérase/amorce à l'extrémité 3' (Figure 27B).

Simultanément l'ARNpg qui sert de matrice est dégradé par la RNaseH (Figure 27C). On obtient un intermédiaire de synthèse sous forme simple brin (ADNss) (Figure 27D).

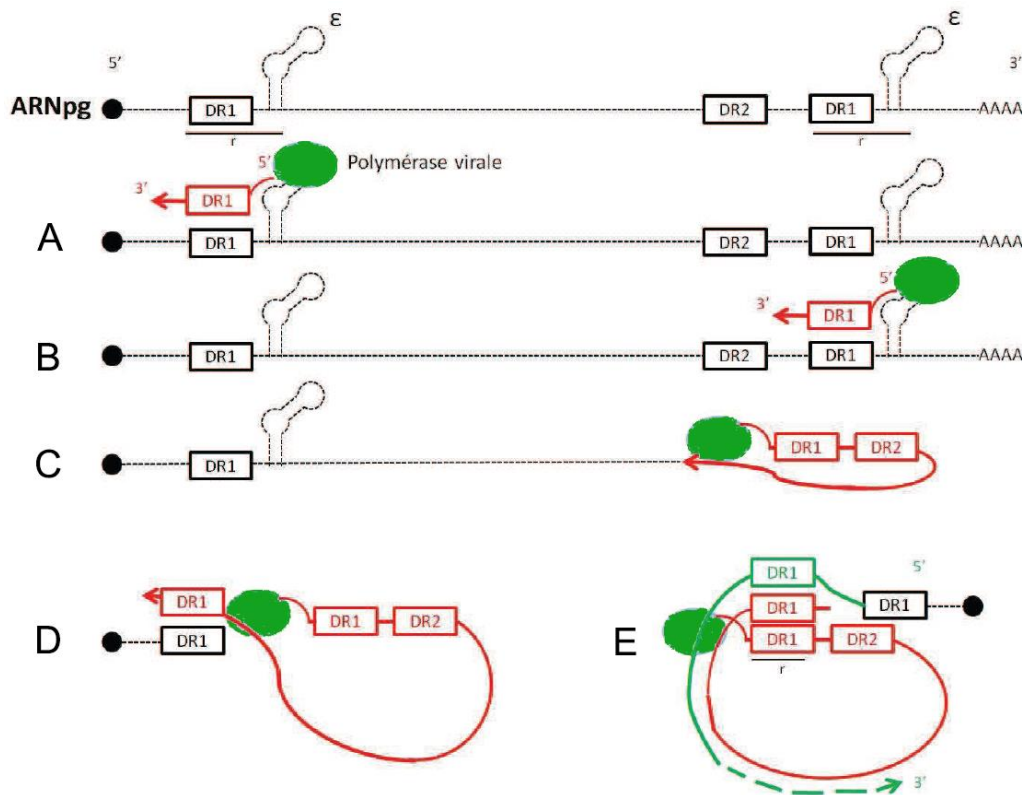


Figure 27 : Réplication du génome de VHB

L'ARNpg et les structures ε sont en pointillé la coiffe est représentée par le cercle noir, la polymérase en vert. A) initiation de la transcription inverse sur le signal ε en 5' de l'ARNpg, synthèse du brin négatif (en rouge) B) translocation de l'amorce et de la polymérase en 3' de l'ARNpg. C) élévation du brin négatif et dégradation de l'ARNpg par la RNaseH. D) terminaison de la synthèse du brin négatif. E) translocation de l'amorce ARN en 5' du brin négatif, initiation de la synthèse du brin positif (en vert) puis élévation du brin (non achevé) (inspiré de de Beck, 2007).

V.8.2 : Synthèse du brin positif

A la fin de la synthèse du brin d'ADN négatif, il reste un fragment de l'ARNpg qui va rester hybridé à l'extrémité 3' du brin négatif. Ce fragment va servir d'amorce pour la synthèse du brin positif. Pour cela, l'amorce est transloquée au niveau de la région DR2 situé à l'extrémité 5' du brin négatif. La polymérase va alors allonger l'amorce en utilisant le brin négatif comme matrice et permette la synthèse du brin court d'ADN positif (Lee et al 2004) (Figure 27E). Lorsque la polymérase arrive à la fin de l'extrémité 5' du brin négatif, il y a un saut intramoléculaire du brin positif neosynthétisé sur l'extrémité 3' du brin négatif. C'est la séquence redondante présente aux deux extrémités du brin négatif qui permet ce mécanisme. Ce saut

permet la circularisation du génome dans les capsides. La polymérase poursuit partiellement la synthèse du brin positif (Beck and Nassal 2007). Le brin d'ADN positif est également appelé brin court car la polymérisation s'arrête au environ de 2400 nt. L'arrêt de la synthèse du brin positif peut s'expliquer par un manque de desoxyribo nucléotides triphosphate (dNTPs) qui ne peuvent plus diffuser à l'intérieur des capsides lorsque celle-ci est enveloppée. De récentes données structurales obtenues sur des capsides immatures suggèrent également un encombrement stérique (Wang et al 2012)(Wu et al, résultats non publiés HBV meeting 2013)

V.9 : Enveloppement des capsides et bourgeonnement des particules virales

L'enveloppement des capsides dépend des protéines de surface SHBs et LHBs. En effet, la délétion de l'une de ces protéines inhibe la formation de virion (Bruss and Ganem 1991). Au niveau subcellulaire, l'enveloppement des capsides a lieu entre le RE et le Golgi (Huovila et al 1992). Des images obtenues en microscopie électronique ont permis d'identifier une accumulation de capsides dans cette région. (Liou et al 2008). La capside interagit avec la LHBs. La SHBs majoritaire dans les enveloppes des virus, permet la multimérisation des protéines de surface (HBs) et donc l'accumulation de protéines de surface sur une surface membranaire du MVB réduite. Ces multimérisations sont dues à des résidus cystéine qui forment des ponts disulfures (Mangold and Streeck 1993)

Une fois les virus enveloppés, ils sont sécrétés. Cette sécrétion se fait par bourgeonnement. L'interaction de Hbc/LHBs avec la γ 2-adaptin adresse les virus vers les corps multi-vésiculaires endosomaux (MVB pour Multi-Vesicular Body) (Watanabe et al 2007). Ces vésicules sont adressées vers différents compartiments : les lysosomes, la voie de dégradation ou encore vers le milieu extracellulaire. C'est le complexe ESCRT III qui permet le bourgeonnement (Lambert et al 2007). Récemment d'autres résultats ont été obtenus en inhibant les complexes ESCRT I et II. Seul le complexe ESCRT II semble nécessaire à la production de nouveaux virions (Stieler and Prange 2014). Les pseudos particules (sphères et filaments) retrouvées dans le sérum des patients infectés sembleraient se former dans un autre compartiment, le ERGIC (ER-Golgi Intermédiation Compartiment) et dériveraient de particules filamenteuses observées en microscopie électronique (Patient et al 2007).

La surexpression de protéines de surface bloque l'entrée des virus dans les cellules.
En conséquence les cellules deviennent réfractaires à une seconde infection.

Objectif de l'étude

L'objectif de ma thèse est d'étudier le(s) mécanisme(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans le transport rétrograde des capsides du VHB depuis l'étape de libération des capsides dans le compartiment cytoplasmique jusqu'à la translocation dans les NPCs. Si les capsides semblent transportées par les Mt jusqu'à la périphérie nucléaire (Rabe et al 2006), aucune donnée n'existe sur la mécanistique du transport cytoplasmique du VHB. De façon générale, les études qui se sont intéressées au transport rétrograde des virus ont montré l'existence d'interactions entre protéines cellulaires et protéines virales. Les études in cellulo se sont focalisées sur du « tracking » de particules et de la microscopie en temps réel.

Pour passer au travers des NPC, les capsides, mais aussi les cargos cellulaires, doivent être relarguées du réseau de Mt à la fin du parcours du transport rétrograde. Ce mécanisme de détachement des Mt près du noyau n'est absolument pas connu.

J'ai donc voulu déterminer si l'interaction des capsides du VHB avec les Mt était directe ou indirecte et caractériser plus en détails cette interaction. Au vu de la rapidité du relargage du génome viral dans le noyau, qui peut être observé dès 15 min (Rabe et al 2006), les hypothèses de travail favorisaient un transport assuré par des protéines associées aux Mt (MAPs). Parmi ces dernières, le complexe moteur de la dynéine, déjà impliqué dans de nombreuses interactions avec des protéines virales (Döhner et al 2005; Merino-Gracia et al 2011), apparaissait être un bon candidat.

Pendant ma thèse, une seule autre étude publiée a fait état de l'implication des Mt, basé sur l'observation de colocalisations entre capsides du VHB marquées et Mt (Sun et al 2013). Cependant l'implication des Mt dans d'autres étapes du cycle de réplication du VHB est suggérée par l'observation que la protéine HBx active le transport associé aux Mt (Kim et al 2007b) et que les Mt participent au processus d'encapsidation (Iwamoto et al HBV meeting 2014).

J'ai voulu étudier aussi le ou les mécanismes de dissociations des Mt. L'approche utilisé par Bailey montrant une accumulation de particules adénovirales au MTOC m'a semblé intéressante (Bailey et al 2003). J'ai voulu mettre en place ce système au

laboratoire pour étudier l'impact du noyau sur la dissociation des capsides du VHB des Mt.

Matériels et méthodes

Matériels :

I : Produits chimiques et matériels

Produits chimiques et biologiques		
Nom	Fournisseur	Référence
40% acrylamide/bisacrylamide	Biorad	161-0148
Agarose	Ozyme (Lonza)	219400680
Albumine bovine	Sigma	A7906
Ammonium per sulfate APS	Normapyr	21333,23
Ampicilline	Sigma	A59518
Bleu de bromophenol (Tp charge ADN)	Biorad	161-0404
Bromure d'éthidium	Sigma	E1510
Collagenasee	Sigma	C5138
DAPI	Sigma	D8417
Digitonine	Calbiochem	300410
DTT	MP biomedical	856126
Dynabeads M280 sheep anti rabbit IgG	Life technologie	T4816-250EA
ECL	Millipore	P90720
Enzymes de restriction	Promega	-
Facteur Xa	Qiagen	33223
General tubulin buffer	Tebu Bio (cytoskeleton)	BST01-001
Glutathion réduit	Fisher scientific	10204873
GTP	Calbiochem	371701
Inhibiteur de Protéases	Roche	11843580001
IPTG	MP biomedical	2102101
Isopropanol	MP biomedical	219400680
Lysat de réticulocytes de lapin (RRL)	Promega	L4151
LysoTracker®	Fisher Scientific	L-7528
Lysozyme	MP biomedical	100834
Microtubule cushion buffer	Tebu Bio (cytoskeleton)	BST05-001
Milieu de montage	DAKO	S3023
MitoTracker®	Invitrogen	M7514
Paraformaldéhyde 16 % EM grade	Delta Microscopie	15710
Protein ladder	Thermoscientific	26616
Saponine	Sigma	47036
SDS	Euromedex	EU0660
SuperSignal West Femto	Fisher scientific	11859290
SuperSignal West Pico	Fisher scientific	6420Y
TEMED tétraméthyléthylènediamine	Sigma	T9281
Tricaine methane sulfonate	Sigma	E10521
Triton X-100	Euromedex	85111
Tubuline	Tebu Bio (cytoskeleton)	TL238-C
Tubuline couplée à la rhodamine	Tebu Bio (cytoskeleton)	TL590M-B
Tween-20	Sigma	P7949

Tableau 7 : Produits chimiques et biologiques

II : Culture cellulaire et bactérienne

Nom	Espèce	Origine tissulaire	numéro ATCC
HuH7	<i>homo sapiens</i>	hépatique (carcinome)	-
HeLa	<i>homo sapiens</i>	utérine (cancer)	CCL-2
HepG2	<i>homo sapiens</i>	hépatique (carcinome)	HB-8065
HepG2.2.15	<i>homo sapiens</i>	dérivé des HepG2	-
U2OS	<i>homo sapiens</i>	osseuse (ostéosarcome)	HTB-96

Tableau 8 : Lignées cellulaires utilisées

Produits pour culture cellulaire		
Nom	Fournisseur	Référence
Collagène	BD bioscience	354236
Pénicilline/Streptomycine	Gibco	15140122
Poly L-lysine	Sigma	P4832-50mL
Trypsine/EDTA	Gibco	253 00 054
DMEM	Gibco	31966
Milieu CO2 indépendant	Gibco	18045
Sérum de veau fœtal	PanBiotech	P30-3302
PBS 10X	Gibco	11 524 526
Produits pour culture de bactéries		
Nom	Fournisseur	Référence
Ampicilline	Sigma	A59518
LB Broth	Euromedex	0102-1
LB Agar	Euromedex	EU0031

Tableau 9 : Produits utilisés en culture cellulaire et bactérienne

IV : Plasmides

	Protéine de fusion	Plasmides	Taille de l'insert	MW théorique en kDa
Dyn Tctex	GST Tctex1	pGEX-5X-1	339 nt	12
	GST Tctex3		348 nt	12
Dyn Lc8	GST LL1	pGEX-5X-1	260 nt	8
	GST LL2	pGEX-4T-1	267 nt	8
Dyn Lc7/Rb	GST Rb1	pGEX-4T-1	288 nt	7
	GST Rb2		288 nt	7
DynIC	GST DynIC	pGEX-5X-1	1935 nt	73
	GST DynIC 295		885 nt	33
Dyn LL1*	GST LL1 C2S	pGEX-5X-1 insertion EcoR1-Xho1	260 nt	8
	GST LL1 E16D		260 nt	8
	GST LL1 S21A		260 nt	8
	GST LL1 E23D		260 nt	8
	GST LL1 L29M		260 nt	8
	GST LL1 H41Y		260 nt	8
	GST LL1 S88A		260 nt	8
	GST LL1 S88E		260 nt	8

Tableau 10 : Liste des plasmides utilisés dans ce projet

V : Amorces pour séquençage et mutagenèse

nom	séquences	cible	mutation
pGEXfor	Séquence MWG	pGEX	-
pGEXrev	Séquence MWG	pGEX	-
GST_sens	GCGTTCCCAAATTAGTT	GST	-
mutagenèse LL1			
LL1mutC2S_S	CGAATTCATGTCCGACCGAAAGG	C2	TGC>TCC
LL1mutC2S_AS	CCTTTCGGTCGGACATGAATTTCG		
LL1mutE16D_S	ATGTCGGAAGACATGCAACAGGA	E16	GAG>GAC
LL1mutE16D_AS	TCCTGTTGCATGTCTTCCGACAT		
LL1mutS21A_S	TGCAACAGGACGCGGTGGAGTGC	S21	TCG>GCG
LL1mutS21A_AS	GCACTCCACCGCGTCCTGTTGCA		
LL1mutE23D_S	GACTCGGTGGACTGCGCTACTCA	E23	GAG>GAC
LL1mutE23D_AS	TGAGTAGCGCAGTCCACCGAGTC		
LL1mutL29M_S	CTACTCAGGCGATGGAGAAATAC	L29	CTG>ATG
LL1mutL29M_AS	GTATTTCTCCATCGCCTGAGTAG		
LL1mutH41Y_S	ACATTGCGGCTTATATCAAGAAG	H41	CAT>TAT
LL1mutH41Y_AS	CTTCTTGATATAAGCCGCAATGT		
LL1mutS88R_S	TCTTCTGTTCAAACGTGGTTAACTCGAG	S88	TCT>CGT
LL1mutS88R_AS	CTCGAGTTAACCACGTTTGAACAGAAGA		

Tableau 11 : Liste des amorces utilisées lors des séquençages et des mutagenèses dirigés

VI : Anticorps

Nom	Cible	Type	Source	Vendeur	référence	Dilution WB	Diluion IF
Anticorps primaires							
anti glutathion S transférase (Anti GST)	GST	monoclonal	souris	BD bioscience	554805	1/1000	-
anti kariophérine alpha	importine alpha	monclonal	souris	BD bioscience	610985	-	1/500
anti HBc Ag	capsides du VHB	polyclonal	lapin	DAKO	BO586	1/3000	1/1000
Fab 3105	capsides du VHB	monoclonal	souris	institute of immunology Co.LTD	2AHC21	1/500	1/250
anti tubuline	tubuline alpha	monocolnal	souris	Millipore	T6199	1/500	1/500
anti DynIC	chaîne intermediaire de la dynéine	monoclonal	souris	Millipore	mab1618	1/500	1/500
anti DynLL1/2	chaîne légère dynéine LL1/LL2	polyclonal	lapin	Santa Cruz	sc-13969	1/1000	1/500
anti DynLL1	chaîne légère dynéine LL1	monoclonal	lapin	Abcam	ab51603	1/1000	1/500
anti péricentrine	péricentrine	monoclonal	souris	Abcam	ab28144	1/500	1/300
anti péricentrine	pérricentrine	monoclonal	lapin	Abcam	ab4448	1/500	1/500
Anticorps secondaires							
Alexa fluor 488 donkey anti rabbit IgG	IgG de lapin	-	Ane	Invitrogene	A21206	-	1/1000
Alexa fluor 488 donkey anti mouse IgG	IgG de souris	-	Ane	Invitrogene	A21202	-	1/1000
Alexa fluor 594 donkey anti rabbit IgG	IgG de lapin	-	Ane	Invitrogene	A21207	-	1/1000
Alexa fluor 594 donkey anti mouse IgG	IgG de souris	-	Ane	Invitrogene	A21203	-	1/1000
Alexa fluor 647 donkey anti rabbit IgG	IgG de lapin	-	Ane	Invitrogene	A31573	-	1/1000
Alexa fluor 647 donkey anti mouse IgG	IgG de souris	-	Ane	Invitrogene	A31573	-	1/1000
peroxydase conjugated anti mouse	IgG de souris	-	Ane	Jackson ImmunoResearch	715035151	1/10000	-
peroxydase conjugated anti rabbit	IgG de lapin	-	Ane	Jackson ImmunoResearch	71560356152	1/10000	-

Tableau 12 : Anticorps primaires et secondaires

VII : Appareils et Kits

Appareils :

Microscope à épifluorescence axiplan (Zeiss)
Microscope à épifluorescence DMI 6000 (Leica)
Microscope confocal SP5 (Leica)
Microscope électronique à transmission (FEI Tecnai G2 Spirit)
Système de microinjection (Eppendorff FemtoJet)
Tailleur de résine (Leica EM TRIM)
Microtome (Leica ultracut)
Microscope électronique à transmission H7650 (Hitachi)
Agitateur (Jouan)
Centrifugeuse de paillasse (Heraus pico 17)
Centrifugeuse RC5B (Sorvall)
Centrifugeuse J230 centrifuge (Beckman)
Ultracentrifugeuse L-100XP (Beckman)
Ultracentrifugeuse P3 (Beckman)
Ultracentrifugeuse de paillasse (Beckman)
Rotor TLA100
Rotor SW55Ti
Rotor SW33Ti
Rotor SLC4000
Rotor GSA Sorvall
Sonicateur (microson ultrasonic cell disruptor XL 5misonix)
Bloc thermique (Stuart)
Système pour électrophorèse (Biorad)
Chemidoc (biorad)
Gel doc (biorad)
Générateur (Fisher Scientific)
Cuve agarose (Biorad)
Lecteur de plaque (Perkin Elmer)
pH mètre (Hanna instrument)
Nanodrop 100 (Thermo scientific)
Système de transfert liquide (Invitrogen)
Système de transfert liquide multiple (Biorad)
Système de transfert sous vide (Vacuum blotter Appligen)
Développeuse Curix 60 (Agfa)
Portoirs magnétiques (magrack)
Boîte de microinjection (microdish grid 500) (Ibidi)
Aiguille de microinjection Femtotips (Ependorf)
Tube polycarbonate 230µl TLA100(Beckman Coulter 343775)
Tubes ultracentrifugation SW28ti 38.5 ml ultra clear 342204
Tubes ultracentrifugation SW55ti 5ml ultra clear 242196
Spectrophotomètre Genesys20 (Thermo scientific)

Kits :

Wizard plus SV miniprep DNA purification (Promega)
Midipre endo towine free (Promega)

Qiafilter plasmid midikit (Qiagen)
GeneJet gel extraction kit (Qiagen)
Xa removal Resin (Qiagen)

VIII : Tampons :

Tampon de lyse :

Tris 50 mM
EDTA 2 mM
NaCl 50 mM
Lysozyme 10 µg/ml
Triton X100 0,5%
PMSF 1mM ; pH8.

Tampon de lavage :

Tris 50 mM
EDTA 2 mM
NaCl 50 mM
PMSF 1 mM ; pH8.

Tampon d'élution :

Tris 50 mM
Glutathion 10 mM ; pH8.

Solution de dialyse :

Tris HCL 50 mM
NaCl 50 mM
Glycérol 2%
DTT 2 mM
Saccharose 250 mM
pH 7.5

PBS 10X :

NaCl 1,36 M
KCl 26,8 mM
Na₂HPO₄ 101 mM
KH₂PO₄ 17,6 mM
pH 7,4.

Tampon de transport :

HEPES 20 mM
Acétate de magnésium 2 mM
Acétate de potassium 110 mM
Acétate de sodium 5 mM
EGTA 1 mM
pH 7,3.

TBS 10X :

NaCl 1,36 M;
KCl 26,8 mM
Tris 250mM
pH 7,4.

TGS 10X :

Tris 0,25 M
Glycine 1,92 M
SDS 1%
pH 8,3.

Tampon de concentration 2X :

SDS 0,2%
Tris 0,25 M
pH 6,8.

Tampon de séparation 2X :

SDS 0,2%
Tris 0,75 M
pH 8,8.

Solution de coloration Coomassie :

Coomassie Brilliant Blue R250 0,25%
Ethanol 45%
Acide acétique glacial 10%

Solution de décoloration :

Ethanol 20%
Acide acétique 5%

TAE 50X :

Tris 2 M
Acide acétique 57%
EDTA 0.5 M pH8

TGS 10X :

Tris 0.5 M
Glycérol 1.92 M
1% SDS

Bleu de charge ADN:

Saccharose 50%
Bleu de bromophénol 0.25%
TAE 6X

TNE NP40 Saccharose :

Tris 10 mM
NaCl 100 mM
EDTA 1 mM
Saccharose 25%
NP40 0.75%

Solution de transfert liquide 10X:

Tris 0.25M
Glycine 1.9M
Pour préparer 1X dilution au 1/10
méthanol 15%

SSC 10X :

Chlorure de sodium 1.5 M
Citrate de sodium 150 mM

TBS-T blocage.

TBS 1X
Lait 5%
Tween 20 0.1%

TBS-T lavage :

TBS 1X
Tween 20 0.1%

Collagène :

collagène (Becton Dickinson) dilué à
50 µg/ml dans de l'eau stérile acidifiée
par de l'acide acétique 0.02M

PFA 4% :

dilution de paraformaldéhyde à 16%
dans du PBS 1X

Solution de perméabilisation IF :

PBS 1X
Triton X100 0.2%

Solution de blocage IF :

PBS1X
SVF 10%
saponine 0.1%

Solution de clivage factor Xa

Tris HCl 500 mM
NaCl 0.1 M
CaCl₂ 50 mM

MBS :

NaCl 88 mM
KCl 1mM
MgSO₄ 0.82 mM
Ca(NO₃)₂ 0.33 mM
CaCl₂ 0.41 mM
HEPES 10 mM
pH 7,5

MBS sans Ca :

NaCl 88 mM
KCl 1 mM
MgSO₄ 0.82 mM
HEPES 10 mM
pH 7,5

LSB :

KCl 1mM
MgCl₂ 0.5 mM
HEPES 10 mM
pH 7,5

TBS-T :

TBS1X
Tween 20 0.1%

TBS-T blocage :

TBS1X
Tween 20 0.1%
lait 5%

Méthodes :II : Partie Biologie moléculaire :I.1 : Transformation des bactéries

Après décongélation sur la glace d'une aliquote de 100 µl de bactéries compétentes, on ajoute en mélangeant doucement 1 µl de vecteur plasmidique (0.5 µg/µl). Le mélange est ensuite incubé sur la glace pendant 30 min. Un choc thermique à 42°C est effectué pendant 45 secondes, suivi d'un refroidissement rapide dans la glace pendant 2 minutes. 1 ml de LB est rajouté au mélange qui est alors incubé pendant 1 heure à 37 °C sous agitation. Le métabolisme de la bactérie se réactive et la

croissance bactérienne est initiée. Les bactéries sont ensuite étalées sur gélose LB contenant l'antibiotique choisi pour la sélection des bactéries transformées. Les boîtes de gélose sont incubées à 37 °C dans une étuve toute la nuit. Les colonies isolées obtenues correspondent à des clones bactériens contenant le plasmide d'intérêt. Ce protocole de transformation a été utilisé avec toutes les souches bactériennes utilisées dans ce projet (Dh5 α , BL21(DE3), origami et rosetta-gami). Après amplification 500 μ l de la culture liquide sont mélangés à 500 μ l de glycérol et conservé à -80°C.

I.2 : Amplification et purification des plasmides

Pour obtenir des préparations de plasmides, les plasmides ont été amplifiés dans des bactéries de souche DH5 α . Cette souche bactérienne favorise l'amplification des plasmides via des modifications génétiques permettant la réduction de l'activité endonucléase, de recombinaison et de la méthylation de l'ADN. Après transformation des bactéries avec le plasmide d'intérêt, les bactéries sont mises en culture sur gélose LB contenant l'antibiotique permettant la sélection (24 h). Une des colonies obtenues est transférée dans du LB liquide contenant de l'Ampicilline pendant 1 nuit à 37 °C sous agitation. Lors de la croissance des bactéries il y aura amplification du plasmide. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation. Pour purifier les plasmides, j'ai utilisé différents kits de purification. Selon les plasmides et la quantité d'ADN désirée, le volume de la culture bactérienne et les kits utilisés diffèrent.

I.3 : Digestion enzymatique des plasmides

Les plasmides purifiés à partir de 10 ml de culture selon le protocole du fournisseur ont été digérés par EcoR1 et Xho1. Cette double digestion permet de contrôler la taille des inserts et du vecteur pGEX vides. Brièvement 0,5 μ l EcoR1 (12 U/ μ l) et 0,5 μ l Xho1 (10 U/ μ l) auxquels sont ajoutés 2 μ l de tampon D (Promega), 0.2 μ l de BSA (10 mg/ml) sont mélangés avec 1 μ g de plasmide dans 20 μ l total. Après une incubation de 3 heures à 37 °C, les échantillons ont été préparés en mélangeant 10 μ l de la digestion avec 2 μ l de Xylène Cyanol (0.25%). Ils ont été chargés sur gel d'agarose 1%, puis analysés par coloration au bromure d'éthidium.

I.4 : Mutagénèse

Toutes les mutagénèses ont été réalisées avec comme matrice 150 à 200 ng de plasmide pGEX LL1. Les amorces sont utilisées à une concentration finale de 2 nM

(tableau 11). L'enzyme utilisée est la Pfu 2.5 U Turbo (Agilent). Le volume réactionnel final est de 50 µl. Le cycle de PCR utilisé est le suivant : 95 °C 2 min; 95°C 30 sec, 45 à 55°C selon les mutations 30 sec, (18 cycles) ; 68 °C 12 min.

Après la PCR, les échantillons sont traités avec 10 U de l'enzyme de restriction DpnI (Promega) pendant 2 heures à 37 °C (ajout de 5 U d'enzyme 30 min avant la fin de la réaction) afin de digérer le plasmide matriciel initial. Théoriquement, après transformation, les clones obtenus ne devraient contenir que les plasmides comportant la mutation, amplifiés pendant la PCR. Pour cette transformation, on utilise 10 µl du mélange PCR réactionnel, en suivant le protocole décrit précédemment. La sélection des clones est effectuée sur milieu LB contenant de l'ampicilline 100 µg/ml. Les mutants sont identifiés par séquençage des plasmides préparés avec le kit « miniprep » Promega. L'amorce GST-sens s'hybride dans le gène GST (tableau 11). Après sélection, un clone est amplifié en DH5α et des « midiprep endotoxin-free » réalisées avec un kit Promega. Le bilan des mutagenèses est spécifié dans la figure 28.

```

1/1          31/11          61/21
|           |           |
|   S       |           |   D       |   A       |   D       |   M
|   TCC     |           |   GAC     |   GCG     |   GAC     |   ATG
ATG TGC GAC CGA AAG GCC GTG ATC AAA AAT GCG GAC ATG TCG GAA GAG ATG CAA CAG GAC TCG GTG GAG TGC GCT ACT CAG GCG CTG GAG
M   C   D   R   K   A   V   I   K   N   A   D   M   S   E   E   M   Q   Q   D   S   V   E   C   A   T   Q   A   L   E

91/31          121/41          151/51
|           |           | |
|           |   Y       |           |
|           |   TAT     |           |
AAA TAC AAC ATA GAG AAG GAC ATT GCG GCT CAT ATC AAG AAG GAA TTT GAC AAG AAG TAC AAT CCC ACC TGG CAT TGC ATC GTG GGG AGG
K   Y   N   I   E   K   D   I   A   A   H   I   K   K   E   F   D   K   K   Y   N   P   T   W   H   C   I   V   G   R

181/61          211/71          241/81
|           |           |           |
|   AAC TTC GGT AGT TAT GTG ACA CAT GAA ACC AAA CAC TTC ATC TAC TTC TAC CTG GGC CAA GTG GCC ATT CTT CTG TTC AAA TCT GGT TAA
N   F   G   S   Y   V   T   H   E   T   K   H   F   I   Y   F   Y   L   G   Q   V   A   I   L   L   F   K   S   G   *

```

Figure 28 : Mutagenèse dirigée de Dyn LL1

Séquence nucléotidique de la séquence codant la protéine LL1. En rouge sont spécifiés les nucléotides ciblés lors des mutagenèses dirigées ainsi que les a.a. qui seront in fine présents à ces positions. La numérotation des nucléotides et des a.a. est également précisée.

I.4 : Séquençage

Les séquençages ont été effectués soit par prestation de MWG soit par la plateforme de séquençage présente au sein de l'université de Bordeaux. Lors du séquençage MWG, les échantillons de plasmide à séquencer sont envoyés et séquencés à partir des amorces spécifiques du plasmide pGEX proposées par MWG. Le séquençage via la plateforme de l'université a été utilisé pour les plasmides obtenus par mutagenèse dirigée. Pour ces séquençages, on réalise la PCR utilisant le kit « Big Dye Terminator Cycle Sequencing v1 » (Invitrogen). Les échantillons sont analysés

sur un séquenceur haut débit ABI Prism 3130XL. L'analyse des résultats obtenus est réalisée à l'aide du logiciel BioEdit et/ou Serial cloner.

I.5 : Gel d'agarose

Cette technique est utilisée pour séparer les fragments d'ADN ou d'ARN en fonction de leur taille. Ces gels sont réalisés avec de l'agarose dissous dans du tampon TAE. Le pourcentage d'agarose dans le gel est choisi en fonction de la taille de la molécule que l'on souhaite observer (0.8 à 2.5%). La solution chauffée est coulée dans les moules prévus pour faire des gels d'agarose. Après refroidissement et prise en masse du gel, les échantillons mélangés au tampon de charge non dénaturant (xylène cyanol ou bleu de bromophénol contenant du glycérol) sont déposés dans les puits. Les molécules d'ADN, chargées négativement migrent vers la borne positive. La migration est effectuée à 100 volts et arrêtée en fonction de la migration du colorant (xylène cyanol migration à 4000 pb, bleu de bromophénol migration entre 300 et 400 pb). La révélation se fait grâce au bromure d'éthidium qui est un intercalant de l'ADN. Le gel est incubé pendant 5 à 20 minutes dans un bain de bromure d'éthidium (4 µg/ml). Le système d'acquisition Gel Doc (Biorad) *via* une caméra CCD et une lampe UV, va permettre de prendre une photo du gel.

II : Partie Biochimie :

II.1 : Induction et surexpression des protéines

Des stocks glycérolés de bactéries BL21(DE3) transformées avec les différents plasmides codant pour toutes les chaînes de la dynéine sont conservés à -80°C. On réalise des précultures en ajoutant en fin de journée 100 µl du stock glycérolé à 100 ml de LB contenant de l'ampicilline, et en laissant la culture toute la nuit à 37°C sous agitation. Le jour suivant, une fraction de la préculture (volume nécessaire pour obtenir une DO de 0.05 à 0.1 et ainsi remettre les bactéries en phase de croissance) est diluée dans 500 ml de LB contenant de l'ampicilline. Cette culture est incubée à 37 °C sous agitation, et sa Densité Optique (DO) à 600 nm est régulièrement suivie jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,6. Lorsque cette absorbance est atteinte, l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG. Plusieurs paramètres d'induction ont été testés, d'après les travaux de (Douglas et al 2004) : la concentration d'IPTG : 0.5 mM et 0.1 mM, le temps d'induction : 3 heures à 37°C, toute la nuit (ON) à 29°C et 68 heures à 16°C.

II.2 : Purification des protéines

A la fin de l'induction, les bactéries sont centrifugées pendant 5 min à 5000 g. Les culots de 500 ml sont conservés à -20 °C si la purification n'est pas faite immédiatement. Après décongélation lente sur la glace, les bactéries sont resuspendues dans 10 ml de tampon de lyse puis incubées pendant 30 minutes sur la glace. Le lysat résultant est traité par ultrasons 5 fois pendant 10 secondes (sonicateur réglé à une puissance de 7) afin de fragmenter l'ADN et ainsi réduire la viscosité. Toutes ces étapes sont effectuées sur la glace afin de réduire l'action des protéases bactériennes. Le lysat est centrifugé 30 minutes à 30000 g à 4°C pour séparer la fraction soluble (surnageant) de la fraction insoluble (culot). Toutes les purifications ont été effectuées à partir des fractions solubles. Le surnageant est récupéré puis incubé de 45 minutes à température ambiante avec 3 ml de billes glutathion Sepharose 4B (fournisseur), préalablement équilibrées dans du tampon de lyse. Pendant l'incubation, la GST va se fixer sur les billes. Après centrifugation 5 min à 1000 g, le surnageant est éliminé puis les billes sont lavées 5 fois avec du tampon de lavage. Finalement, les billes sont resuspendues 30 minutes dans du tampon d'élution. Le glutathion réduit contenu dans ce tampon permet de déplacer les protéines contenant le tag GST des billes. Cette étape d'élution est répétée 3 fois pour récupérer un maximum de protéines. Des échantillons de chaque étape du protocole de purification sont analysés par SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie. Les éluats contenant la protéine d'intérêt purifiée sont regroupés puis dialysés contre la solution de dialyse toute la nuit à 4°C sous agitation.

II.3 : Dosage protéique

Deux types de dosages protéiques ont été utilisés, soit un dosage colorimétrique par la méthode de Bradford, soit un dosage avec le Nanodrop, basé sur le spectre UV-visible obtenu sur 1 à 2 µl de la solution protéique à tester.

II.3.1 : Par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectroscopique utilisée pour mesurer la concentration des protéines en solution. Le changement colorimétrique observé est dû à la réaction du pigment (Coomassie brilliant blue G-250) qui change de structure en interagissant avec l'Arginine et, dans une moindre mesure, avec

l'Histidine, la Lysine et les a.a. aromatiques (Tyrosine, Tryptophane, Phénylalanine) de la protéine.

Une gamme étalon est établie avec des concentrations croissantes de protéines (BSA). L'absorbance des solutions est mesurée à 595 nm. Sur la base de la gamme étalon, on détermine alors la concentration de la protéine à doser.

II.3.2 : Au NanoDrop

Pour réaliser ce dosage, il faut que la protéine soit pure et connaître son coefficient d'extinction molaire (ϵ) à 280 nm. Ce coefficient est calculé à partir de la séquence protéique en utilisant le logiciel ProtParam (ExPASy). Sur le système NanoDrop après avoir rentré les informations requises, le dosage s'effectue avec 2 μ l de la solution contenant des protéines purifiées, le blanc étant réalisé avec la solution de dialyse ou avec de l'eau.

II.4: Électrophorèse et transfert

II.1.2: Gel d'agarose en condition native (NAGE)

Les capsides du VHB sont analysées sur des gels d'agarose pour vérifier leur intégrité ainsi que pour quantifier les capsides matures après purification ou sédimentation. Les capsides, chargées négativement migrent vers la borne positive après avoir été déposées dans un gel d'agarose avec du tampon de charge non dénaturant. On peut observer, après révélation au bromure d'éthidium la migration d'ADN ou d'ARN (en fonction de la préparation) contenu dans les capsides. Elles migrent à peu près à la même position qu'un fragment d'ADN double brin linéaire de 3500 pb, dans un gel d'agarose 1% en TAE.

Nous utilisons par ailleurs la capacité qu'ont les capsides à migrer dans un gel d'agarose pour réaliser des WB. En effet, les capsides après migration dans un gel d'agarose peuvent être transférées sur une membrane (voir chapitre correspondant)

II.1.3 Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS PAGE)

SDS PAGE ou Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis. Ces gels sont utilisés pour séparer des protéines selon leurs poids moléculaires grâce à un courant électrique. Toutes les protéines étant chargées négativement, leur séparation se produira uniquement en fonction de leur taille et selon le pourcentage d'acrylamide utilisé dans le gel.

Deux plaques de verre de 10 cm X 8 cm espacées par 1.5 mm sont assemblées sur un support. Le gel est coulé entre les plaques et comporte un gel de séparation et un gel de concentration. Le gel de séparation dont le pourcentage d'acrylamide est variable de 8 à 15% est coulé en premier. Après polymérisation, le gel de concentration à 4% d'acrylamide est coulé par-dessus (Tableau 13)

	Gel de séparation				Gel de concentration
	8%	11%	12%	15%	4%
ddH ₂ O	2,4 ml	1,8 ml	1,6 ml	1,2 ml	2 ml
40% acrylamide/bisacrylamide	1,6 ml	2,2 ml	2,4 ml	2,8 ml	0,5 ml
Tampon de séparation ou concentration 2X	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	2,5 ml
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

Tableau 13 : Protocole pour la préparation des gels de séparation et de concentration en fonction du pourcentage d'acrylamide

L'APS et le TEMED sont ajoutés au dernier moment car ils catalysent la polymérisation de l'acrylamide. Après avoir coulé le gel de séparation, on ajoute de l'isopropanol pour aplanir la surface du gel qui sera à l'interface du gel de concentration. Lorsque le gel de séparation est polymérisé, l'isopropanol est éliminé par des lavages avec de l'eau distillée. Le gel de concentration est alors coulé et un peigne est inséré afin de former des puits.

Les échantillons ont été préparés (addition de Laemmli 4X et du DTT) puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Le DTT rompt les ponts disulfures et l'augmentation de la température permet de finaliser la dénaturation des protéines. Les échantillons sont chargés dans les puits. Un marqueur de taille permettra d'identifier la taille des protéines séparées. La migration est effectuée à 90 volts lorsque les échantillons migrent dans le gel de concentration. Une fois dans le gel de séparation le voltage est augmenté à 110 volts.

Lorsque le front de migration atteint le bas du gel, la migration est arrêtée. Le gel est récupéré pour une coloration au bleu de Coomassie ou pour un WB.

II.1.5: Marquage au bleu de Coomassie

Certains gels SDS PAGE sont colorés au bleu de Coomassie. Le colorant s'attache aux a.a. aromatiques et basiques. Après décoloration du gel on peut visualiser sur le gel des bandes correspondantes aux protéines séparées lors de la migration. La

sensibilité est de l'ordre de 100 ng. Le gel est incubé pendant 45 à 60 min à température ambiante sous agitation dans la solution de coloration Coomassie. Ensuite, le gel est décoloré en utilisant une solution de décoloration pendant une nuit à température ambiante et sous agitation. Les photos des gels sont acquises en utilisant le Chemidoc (Biorad).

II.1.4: Transfert

Après migration des échantillons sur gels SDS PAGE ou sur gel d'agarose, les protéines sont transférées sur des membranes de PVDF.

J'ai utilisé d'une part le transfert liquide pour les protéines séparées sur les gels SDS PAGE, et d'autre part un transfert par aspiration sous vide pour transférer sur membrane les capsides ayant migrées sur gel d'agarose. Les deux dispositifs utilisés pour d'effectuer ces transferts sont présentés dans la figure 29 :

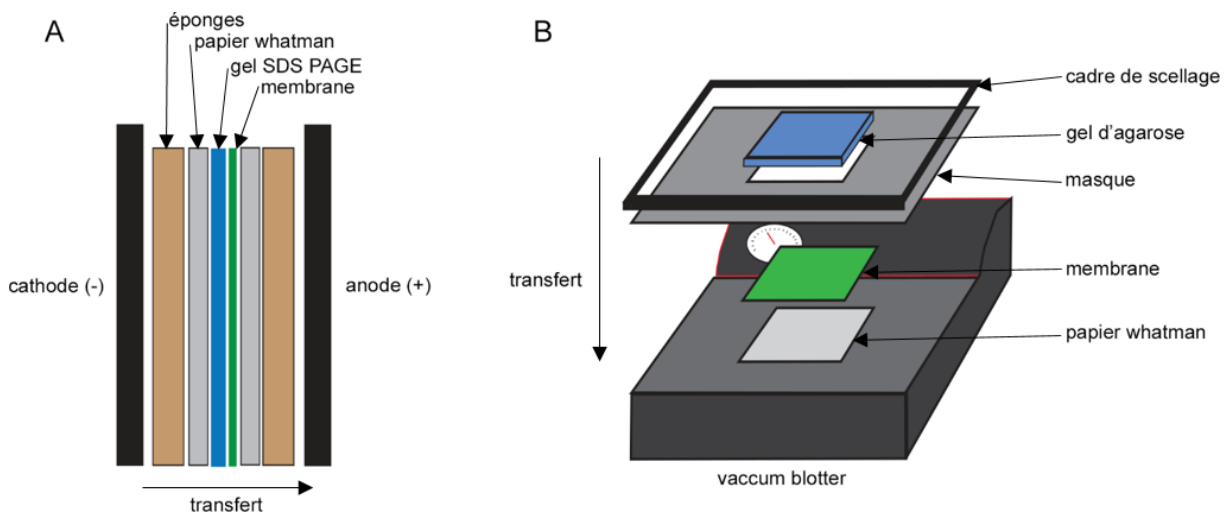


Figure 29 : Montages du transfert liquide et du transfert sous vides

Représentation schématique des montages réalisés lors des transferts liquide figure 29A et sous vide figure 29B. Les flèches indiquent le sens du transfert des protéines du gel vers la membrane.

Pour le transfert liquide, le gel SDS PAGE après migration des échantillons est équilibré dans la solution de transfert liquide 1X. Du papier Whatmann et une membrane de PVDF de la taille du gel sont découpés. La membrane de PVDF nécessite une activation au méthanol. Après activation, la membrane est rincée avec de l'eau distillée puis placée dans la solution de transfert liquide 1X. Le montage selon l'ordre présenté dans la figure 29A est réalisé. De la cathode vers l'anode : 3 éponges, papiers Whatmann (X3) imbibés dans le tampon de transfert, gel, membrane de PVDF, papiers Whatmann (X3) imbibés dans le tampon de transfert et

3 éponges sont superposés. Le montage est complètement immergé dans la solution de transfert liquide 1X. La migration est effectuée pendant 90 min à 400 mA.

Pour le transfert sous vide, j'ai utilisé l'appareil Appligene « vacuum blotter ». Le montage est réalisé comme présenté dans la figure 29B. Sur la plaque est disposé du papier Whatmann au-dessus duquel la membrane de PVDF activée au méthanol est déposée. Un cache en plastique (appelé masque) a été pré-découpé laissant une ouverture légèrement plus petite que la taille du gel d'agarose. Cette découpe permet à l'air et au tampon d'être aspiré uniquement à l'endroit où sera placé le gel d'agarose. Une fois le gel d'agarose déposé à son emplacement celui-ci est recouvert de SSC 10X. Le transfert des protéines présentes dans le gel d'agarose sur la membrane de PVDF s'effectue à 60 mBar pendant 90 min, par aspiration.

II.1.5: Western blot

Cette technique permet la détection des protéines en utilisant des Ac spécifiques. Après le transfert des protéines sur les membranes, ces dernières sont d'abord saturées avec du TBS-T blocage pendant 60 min à température ambiante puis sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire à la dilution appropriée dans du TBS-T blocage pendant 90 min à température ambiante ou toute la nuit à 4°C sous agitation. Trois lavages en TBS1X 0.1% Tween 20 de 5 min, 15 min et 30 min sont réalisés pour éliminer les Ac primaires qui se seraient fixées non spécifiquement sur la membrane. Les membranes sont ensuite incubées pendant 30 à 45 min avec l'Ac secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Ces anticorps couplés à la peroxydase sont également dilués dans du TBS-T blocage. Enfin, trois lavages de 5 min, 15 min et 30 min sont réalisés avec du TBS-T avant révélation.

II.1.6: Révélation (ECL) et acquisitions

Pour la révélation des WB. On dépose sur les membranes du réactif ECL. Nous disposons de plusieurs types d'ECL qui sont choisis en fonction de l'intensité des signaux. Du moins sensible au plus sensible nous utilisons de l'ECL plus, pico ou femto. L'ECL contient un substrat, le luminol, qui émet de la lumière lorsqu'il est exposé à la peroxydase présente sur les Ac secondaires. La lumière émise impressionne des films qui sont ensuite révélés. Nous disposons également du Chemidoc dans lequel la lumière émise est détectée par une caméra CCD qui restitue une image numérique du WB.

II.2 : Capsides

II.2.1 : Préparation de capsides matures (HepG2.2.15)

Le terme de purification n'est pas vraiment applicable dans ce cas, puisque nous obtenons à la fin du protocole des préparations enrichies en capside mature. On utilise 6 surnageants d'environ 35 ml. Les conditions de culture des HepG2.2.15 sont décrites plus tard. Les premières étapes du protocole sont réalisées au laboratoire de sécurité biologique P3 car les virions contenus dans le surnageant sont infectieux. Les surnageants de culture de HepG2.2.15 sont centrifugés pendant 15 minutes à 4000 rpm afin d'éliminer les débris et cellules mortes prélevées en même temps que le surnageant. Ces surnageants sont stockés à -20°C.

Dans des tubes d'ultracentrifugation de 38.5 ml les surnageants sont déposés sur des coussins de 3 ml de TNE-NP40 saccharose. Après équilibrage, les tubes sont centrifugés à 28000 rpm dans des godets oscillants du rotor Beckman SW28Ti pendant 22 heures à 10°C. Chaque culot est récupéré dans 1 ml de PBS1X contenant 0.75% de NP40. Les culots sont translucides et visqueux. Ils sont transférés dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml puis incubés pendant 1 heure à 37°C. Cette étape permet de dissocier l'enveloppe lipido-protéique des virus générant des capsides libres non infectieuses. Dès lors les tubes peuvent être sortis du P3 après décontamination. Les culots sont dilacérés au Potter puis incubés toute la nuit sous agitation douce dans le PBS1X contenant 0.75% de NP40.

Pour éliminer les débris et agrégats, les tubes sont centrifugés 15 min à 13000 rpm à 4°C. Les surnageants sont récupérés et rassemblés (2 X 3 ml). Dans des tubes d'ultracentrifugation Beckman de 5 ml, les 3 ml obtenus sont déposés sur un coussin de TNE-NP40 saccharose de 1ml. Après équilibrage, les tubes sont centrifugés à 55000 rpm pendant 2 heures à 10°C en utilisant le rotor Beckman SW55Ti. Les culots obtenus contenant les capsides matures sont récupérés, et resuspendues dans 100µl de PBS et dilacérés avec le cône. Afin d'éliminer les agrégats, les 100 µl sont centrifugés pendant 15 min à 13000 rpm à 4°C. Seul le surnageant contenant les capsides matures est conservé et stocké à -20°C.

II.2.2 : Capsides vides : traitement RNaseA

Ces capsides sont préparées à partir des capsides recombinantes ARN *E.coli*. A partir d'une préparation de capsides *E.coli* on effectue le mélange suivant :

- 10 µl de capsides E.coli (50µg)
- 39 µl H₂O
- 1 µl RNase A (20mg/ml)

On effectue une première incubation de 10 min à 42°C ce qui induit un désassemblage. La seconde incubation 30 min à 37°C permet la digestion de l'ARN par l'enzyme. Cette préparation est ensuite stockée à 4°C pendant au moins 24h pour que les capsides se réassemblent.

II.3 : Polymérisation *in vitro* des Mt

La nucléation spontanée ou assemblage de Mt *in vitro* est connue. Les purifications de Mt réalisées dans les laboratoires sont souvent contaminées par des MAPs et de qualités variables. J'ai choisi d'utiliser de la tubuline commerciale purifiée à partir de cerveau (bovin, porcin) à 99% (selon le fournisseur). La tubuline commerciale lyophilisée a été resuspendue dans du tampon tubuline (tubulin buffer : HEPES 80mM, MgCl₂ 2mM et EGTA 1mM) à 10 mg/ml, aliquotée, congelée par immersion dans l'azote liquide avant d'être stockées à -80 °C. La polymérisation de la tubuline en Mt est induite en utilisant le tampon de polymérisation (cushion buffer : HEPES 80 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, 60% glycérol) et du GTP.

A 10 µl de tubuline aliquotée (100 µg) on ajoute 5 µl de tampon tubuline, 4 µl de tampon de polymérisation, pour avoir 5% de glycérol en concentration finale, et 1µl de GTP 1 mM. Ce mélange est incubé à 37 °C pendant 45 min ce qui permet la polymérisation des Mt. Après polymérisation, 180 µl de tampon de polymérisation sont ajoutés. La dissociation des Mt provoquée par leur dilution est contrecarrée par la forte concentration en glycérol. On peut alors les distribuer plus facilement dans les expériences de coïmmunoprécipitation.

Dans les expériences de colocalisation entre les capsides et les Mt, le même protocole est utilisé pour la polymérisation des Mt mais on ajoute 5% de tubuline couplée à la rhodamine ce qui permet d'observer directement les Mt juste après leur polymérisation. Pour ces expériences, j'ai utilisé des lames en verre multipuits. Pour augmenter l'adhérence des Mt au fond des puits, ceux-ci sont prétraités avec de la poly-L-lysine pendant 30 min à température ambiante. Les 3 lavages se font par dépôt de quelques gouttes en utilisant une pipette plastique de 5 ml, dans chaque puits de PBS 1X (environs 200 µl) et incubation pendant 5 min avant d'être aspiré. Après saturation avec du PBS 1X 0.2% BSA pendant 30 minutes, on ajoute les

capsides (matures, ARN *E.coli* et vides) diluées dans un volume de 100 µl minimum sur les puits de la lame. Après incubation 90 minutes à température ambiante, suivie de 3 lavages avec du PBS 1X, 100 µl d'anticorps anti capsid (anti HBc DAKO) dilué au 1/1000 sont incubés dans chaque puits pendant 45 à 60 min. Après 3 lavages en PBS 1X 100 µl d'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (dilué au 1/1000) sont incubés dans chaque puits pendant 45 min. Enfin, après 3 lavages en PBS 1X on effectue le montage des lamelles dans du milieu de montage avant leur observation au microscope à épifluorescence.

II.4 : Co immunoprécipitation

Les capsides du VHB pouvant adhérer non spécifiquement à la paroi des tubes, J'ai utilisé pour ces expériences des tubes « low binding » (Sigma, clear view snap cap microtubes 1.5 mL low binding, T4816-250EA). Pour la coimmunoprécipitation j'ai utilisé 3.5×10^6 billes magnétiques, par échantillon. Les billes sont lavées 3 fois dans du PBS 1X. Pour un échantillon de billes on ajoute 25 µg d'Ac anti capsid dans 1 ml final de PBS1X (HBc DAKO) Les billes sont incubées avec l'anticorps anti HBc toute la nuit à 4 °C sur roue. Après 3 lavages dans 1 ml de PBS 1X, les billes sont saturées avec une solution de blocage (PBS 1 X + BSA 0.25%) pendant 1 h à température ambiante. Les billes sont lavées 3 fois dans du tampon de transport, puis reprises dans du tampon de transport contenant 100 ng de capsides pour chaque échantillon. Les témoins sans capsides sont incubés dans du tampon de transport seul. Après incubation pendant 90 minutes à température ambiante sous agitation, on effectue 3 lavages avec du tampon de transport. Pour chaque échantillon, les protéines purifiées (5 µg) avec ou sans lysat cellulaire (RRL lysat de réticulocytes de lapin : 100 µg = 1 µl) sont préparés avec un volume final de 500 µl. Les billes, avec ou sans capsides, sont distribuées en quantités équivalentes dans les mélanges de protéines avec et sans lysat cellulaire. Tous les échantillons obtenus sont incubés entre 60 et 90 min à température ambiante sous agitation. Une dernière étape de 4 lavages avec du PBS 1X est effectuée en utilisant des volumes décroissants (1000µl, 500µl, 200µl et 100µl). Après le second lavage, tous les échantillons sont transférés dans de nouveaux tubes afin d'éviter toute fixation non spécifique de protéines sur la paroi du tube. Après le dernier lavage, les billes sont resuspendues dans 20 µl de PBS1X NP40 0.1%. Tout le précipité est utilisé pour une analyse par WB en ajoutant 8 µl de Laemmli 4X et 2 µl DTT. Les échantillons

contenant les billes sont chauffés à 95°C avant d'être chargés sur gel SDS PAGE ou stockés à 4°C.

II.5 : Co sédimentation

Les conditions de cosédimentation ont été déterminées empiriquement par analyse en WB de la précipitation des capsides et l'absence de précipitation de la GST seule.

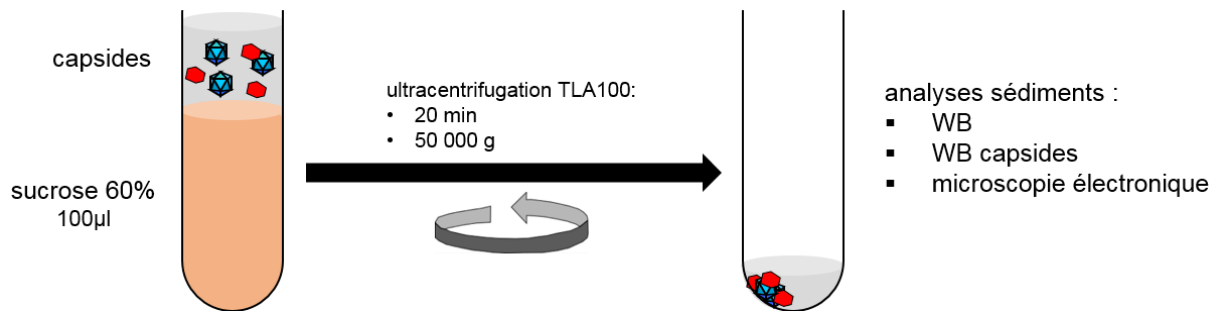


Figure 30 : Représentation schématique du protocole de cosédimentation

Les conditions de cosédimentation sont indiquées dans la figure 30. L'ultracentrifugation est effectuée avec le rotor TLA100 permettant de centrifuger des petits volumes (150 µl maximum) sur l'ultracentrifugeuse Beckman optima. Le mélange de capsides (0.5 à 2 µg), avec ou sans protéines (au maximum 1.5 µg), est préparé dans un volume final de 30 µl et déposé sur le coussin de saccharose de 100 µl à 60 % sacharose. Le rotor étant à angle fixe, une marque est tracée sur les tubes pour indiquer l'orientation des tubes lors de l'ultracentrifugation. Après centrifugation à 50 000 g pendant 20 minutes à température ambiante, les tubes sont récupérés, et leur contenu est éliminé délicatement par aspiration à l'opposé du sédiment. Les sédiments sont repris dans 20 µl de PBS 1X puis immédiatement transférés dans des tubes « low binding ». 2 µl sont prélevés et transférés dans d'autres tubes « low binding » contenant du bleu de charge non dénaturant pour être ensuite chargés sur gel d'agarose (NAGE). Après ajout de 8 µl de Laemmli 4X et 2 µl de DTT 1 M aux 18 µl restants et chauffage à 95°C pendant 30 secondes, ceux-ci sont chargés sur gel SDS PAGE pour une analyse par WB.

III Partie Biologie cellulaire

III.1 : Conditions de culture cellulaire

III.1.1 : Culture des cellules BSL2

Les lignées cellulaires HuH7, HeLa et U2OS sont cultivées dans un laboratoire de type P2. Ces lignées ont été utilisées pour les expériences d'énucléation et des microinjections. Ces cellules adhérentes= sont cultivées en routine dans des flasques de 75 cm² (T75) dans du DMEM complet (DMEM + glutamax, SVF 10 %, pénicilline et streptomycine 100 U/ml) dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Pour chaque passage, les cellules à 85 - 95% de confluence sont lavées en PSB 1X puis décollées par une incubation avec 3 ml de trypsine/EDTA (Gibco). Après neutralisation de la trypsine par addition de milieu complet, les cellules sont comptées en utilisant une cellule de Malassez. Après numération, la quantité de cellules nécessaires estensemencée dans des boîtes de microinjection et/ou une nouvelle T75.

III.1.3 : Culture des HepG2.2.15

Les cellules HepG2.2.15 contenant le génome du VHB intégré sont utilisées pour la production des particules virales. Les particules virales matures sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ces cellules sont cultivées dans un environnement confiné (P3) (Plateforme SFR TransBioMed). Après décongélation à 37°C (au bain-marie) les cellules sont mélangées à 20 ml de DMEM 5% SVF additionné des antibiotiques gentamycine (milieu complet HepG2) etensemencées dans des flasques T75 préalablement enduites de collagène. Le collagène augmente l'adhérence des cellules et permet également d'éviter leur croissance en amas. Pour la collagénisation, le fond des flasques est recouvert de collagène 10% pendant 10 à 15 min. Après récupération de l'excès de collagène, les flasques sont laissées à sécher à température ambiante avant ensemencement. Les cellules sont cultivées comme précédemment décrit et incubées dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂. Pendant plusieurs semaines, les cellules sont amplifiées pour êtreensemencées dans plusieurs flasques de 150 cm². Lorsque le nombre de boites est suffisant, le milieu complet est remplacé par du DMEM gentamycine contenant seulement 1% de SVF (30 ml/T150). Le passage en milieu « appauvri » en sérum permet une meilleure production de virus. Ces flasques sont incubées pendant 5 jours au bout desquels le surnageant est récupéré pour préparer des capsides matures. Les cellules, quant à elles, peuvent être récupérées pour préparer des capsides immatures.

III.2 : Microinjection U2OS

Les cellules sontensemencées dans des boites de microinjection de 35 mm à 1.5×10^5 cellules par boite. 24 heures plus tard, juste avant les microinjections, on remplace le milieu DMEM complet par du milieu CO₂ indépendant. Lors des microinjections, les boîtes sont placées sur une plaque chauffante permettant de maintenir la température à 37 °C. Les microinjections sont réalisées sous microscope à l'objectif 20X en contraste interférentiel différentiel (DIC). La solution microinjectée est préparée juste avant les microinjections. Elle est constituée de capsides diluées dans du tampon de transport pour être à une quantité de 800 capsides pour 100 femtolitres et d'Alexa 594 dilué à 0.4 µg/ml final. L'Alexa 594 ajouté sert de témoin de microinjection et permet après fixation et immunofluorescence de retrouver les cellules ayant été microinjectées avec succès. La solution à microinjecter est centrifugée avant la microinjection 10 min à 13000 g, afin d'éliminer les agrégats qui pourraient boucher les aiguilles de microinjection. Les microinjections dans le cytoplasme des cellules sont effectuées à l'aide d'une microaiguille reliée au femtojet : appareil qui permet d'exercer une pression constante (entre 15 et 45 Hpa) dans l'aiguille. L'injection n'est pas déclenchée sur commande, et se fait donc en continu.

Les cellules ont été fixées puis marquées par immunocytochimie permettant d'observer le réseau de Mt, le MTOC, les capsides et l'ADN.

III.3 : Enucléation des cellules

Le protocole d'enucléation que j'ai mis en place dans le laboratoire est schématisé dans la figure ci-dessous :

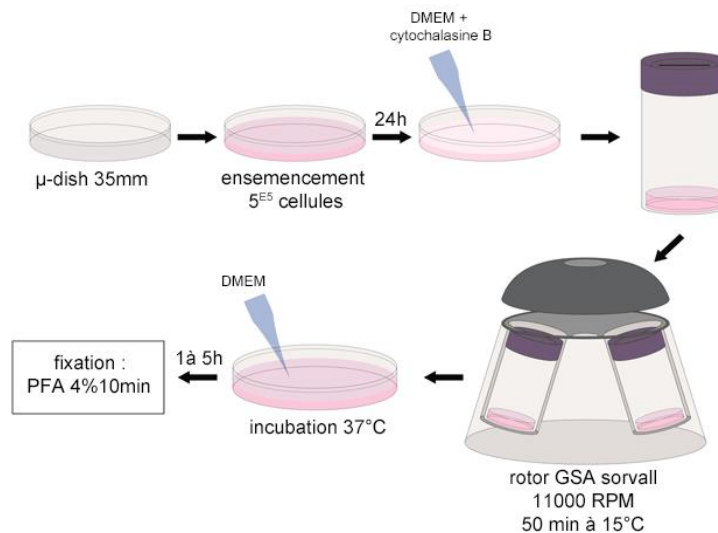


Figure 31 : Schéma du protocole d'enucléation de cellules

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de microinjection de 35 mm à 5×10^5 cellules par boîte. 24 heures après, les cellules sont incubées avec de la cytochalasine B (10 µg/ml) pendant 45 à 60 min. Les boîtes sont ensuite remplies de milieu contenant de la cytochalasine B pour éviter que les cellules soient dépourvues de milieu lors de la centrifugation. Les boîtes sont refermées et scellées avec du parafilm. Elles sont ensuite insérées et bloquées au fond du godet du rotor. Après centrifugation à 11 000 rpm pendant 50 min à 15°C les boîtes sont récupérées et les cellules sont lavées en PBS avant d'être ré-incubées pendant au moins 1h dans du DMEM complet dans un incubateur 37°C 5% CO₂. Dans les expériences effectuées, les cellules ont été incubées à 37°C 1h ou 5h après centrifugation, à la suite de quoi les cellules sont fixées en PFA 4% pour un marquage en immunocytochimie (immunofluorescence) (Bailey et al 2003; Yamamoto et al 2006; Lee et al 2012).

III.4 : Immunofluorescence

Que ce soit après énucléation ou après microinjection, les cellules ont été lavées avec 2 ml de PBS 1X puis fixées avec du PFA 4%. Les cellules sont lavées 4 fois en PBS 1X pour retirer toute trace de PFA. Il y a une première étape de

perméabilisation en utilisant du PBS 1X Triton X100 0.2%, ce qui permettra par la suite aux anticorps d'entrer dans les cellules. Après lavage en PBS puis saturation pendant 10 minutes avec la solution de blocage (PBS 1X, SVF 10%, saponine 0.1%), les cellules sont de nouveau lavées en PBS 1X 4 fois. Le marquage est réalisé avec un anticorps primaire contre les protéines d'intérêt pendant 90 minutes. Après 4 lavages en PBS 1X, la solution contenant le(s) anticorps secondaire(s) couplé(s) à des Alexa est incubée pendant 30 minutes. Après 4 lavages en PBS 1X les cellules sont incubées pendant 10 minutes à température ambiante avec du DAPI ce qui permettra de marquer l'ADN des noyaux. Les boîtes sont conservées à 4°C dans le noir.

Les anticorps primaires et secondaires utilisés figurent dans le Tableau 12 et sont dilués dans la solution de blocage. Les fluorophores utilisés sont soit l'Alexa 488 () soit l'Alexa 594 () soit l'Alexa 654 (). Les trackers utilisées dans les expériences (MitoTracker® et LysoTracker®) sont utilisés sur cellules vivantes 1 heure après énucléation selon les recommandations du fournisseur.

III.5 : Microscopie

Pour les expériences de colocalisation des capsides avec les Mt polymérisés in vitro et les énucléations de cellules, j'ai utilisé les microscopes à épifluorescence axioplan (Zeiss) ou DMI6000 (Leica) munis de l'objectif 40X en enregistrant les prises de vue de la caméra en 12 ou 16 bits avec le logiciel Metamorph.

Pour les cellules U2OS microinjectées et les énucléations de cellules, j'ai utilisé le microscope confocal SP5 (Leica) avec les objectifs 40X ou 63X à immersion d'huile. Les acquisitions ont été effectuées *via* le logiciel Leica en 12 ou 16 bits avec une résolution de 1024*1024 pixels (taille de pixel entre 80 et 100 nm). Les acquisitions sont biséquentielles, bi-directionnelles et moyennées sur 3 images. Les lasers argon et HeNe et une lampe à diode ont été utilisés et réglés chacun en fonction des Alexa utilisés. Le gain et l'offset ont été réglés sur le plan focal des cellules à chaque session. Le réglage du gain permet d'éviter la saturation du photomultiplicateur (PMT) et donc la perte d'information. Le réglage de l'offset permet d'éliminer le bruit de fond.

III.6 : Préparation des ovocytes de *Xenopus laevis*

En collaboration avec Nelly Panté (Vancouver), j'ai réalisé la préparation des ovocytes et l'injection avec l'aide de Shelly Au. La grenouille est anesthésiée en la plaçant dans une solution de tricaine methane sulfonate (Sigma) à 30 mg/ml tamponné à pH 7.5 par ajout de bicarbonate de soude pendant 45 minutes. Des lobes d'ovaire sont retirés chirurgicalement après incision de la peau et de la couche musculaire en bas de l'abdomen au niveau d'une des pattes postérieures. Après le prélèvement, l'incision est suturée. Les ovaires récupérés sont dilacérés à l'aide de pinces, lavés trois fois en MBS pour enlever les traces de sang et de débris de tissus. Les ovocytes sont défolliculés en les incubant avec 5 mg/ml de collagénase () dans du MBS dépourvu de calcium pendant 60 min à température ambiante sous agitation lente. On vérifie l'efficacité de la digestion du collagène en testant la résistance d'un ou deux ovocytes avec une pince. Les ovocytes sont lavés 3 fois dans du MBS puis resuspendus dans une boîte de Petri stérile contenant du MBS contenant 1% de pénicilline et de streptomycine. Les ovocytes peuvent alors être conservés durant 5 à 10 jours, à 4 °C.

III.7 : Injection des ovocytes de *Xenopus laevis*

En utilisant une pince, les ovocytes de stade VI sont sélectionnés (taille de 1 à 1,2 mm avec un contraste marqué entre les deux pôles) En coupant le bout d'un cône de micropipette de 100 µl, les ovocytes sont aspirés délicatement puis transférés dans une plaque contenant des micropuits (Nunc 10 µl well plate). Tous les ovocytes sont orientés pour une injection cytoplasmique : pôle végétatif (couleur crème) vers le haut. Les injections sont effectuées avec des microcapillaires gradués manuellement sous binoculaire pour des injections de 50 nl. La solution microinjectée contient du PBS 1X additionné de bleu de bromophénol et des capsides. Selon le type de capside utilisé, pour 50 nl injectés, il y aura 5×10^8 capsides (vides ou *RNA E.coli*) ou 9×10^7 capsides matures par ovocyte. Les injections sont faites en position équatoriale, dans l'hémisphère végétatif proche de l'hémisphère animal (comme indiqué sur la figure 32)

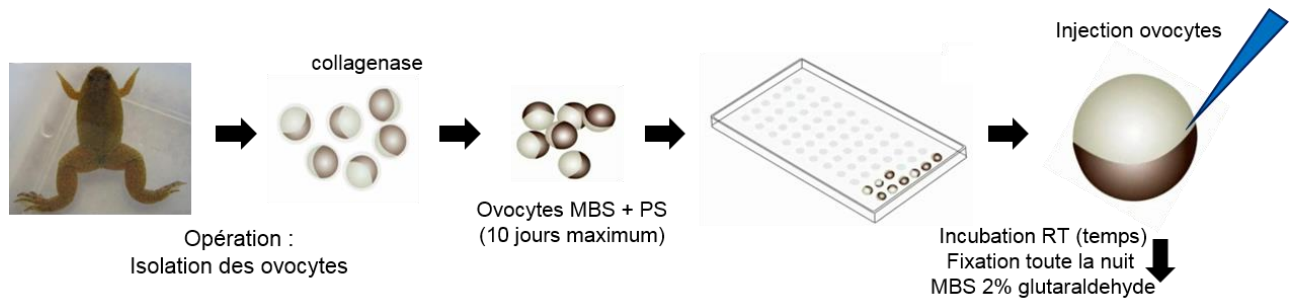


Figure 32 : Prélèvement des ovocytes et injection

Pole végétatif (couleur crème) et pole animal (marron) (adapté de Cohen et al JOVE)

Après l'injection, les ovocytes sont transférés dans des boîtes de Pétri pour incubation à température ambiante selon les temps prévus (60 min et 15 min). Après incubation les ovocytes sont fixés toute la nuit à 4°C dans du MBS contenant 2% de glutaraldéhyde.

III.8 : Inclusion des ovocytes en résine

Les ovocytes injectés et fixés sont préparés avant d'être inclus en résine. Les ovocytes sont d'abord rincés en MBS 3 fois pendant 5 min. Ils sont ensuite transférés dans une boîte de Pétri avec du LSB. Avec des pinces, les ovocytes sont hémisectionnés manuellement. Le pôle végétatif est jeté et l'on ne garde que le pôle animal (marron foncé à noir). La réussite de la microinjection peut être vérifiée directement par l'observation d'une coloration cytoplasmique localisée de couleur bleue due au bleu de bromophénol inclus dans la solution d'injection. Les ovocytes injectés sont fixés dans du LSB contenant 2% de glutaraldéhyde pendant 1 heure à température ambiante. Ils sont ensuite rincés 3 fois 5 min avec du LSB et intégrés dans de l'agarose (low melting). Après solidification, les pièces d'agar contenant les ovocytes sont découpées avec un scalpel et fixées avec du LSB contenant 1% de tétrahydroxyde d'osmium (OsO_4) pendant 1 heure. Après 3 lavages en LSB pendant 5 min, les échantillons peuvent être stockés à 4°C. L'étape suivante consiste à déshydrater les échantillons. Ils sont incubés pendant 20 minutes, successivement dans de l'éthanol à 50%, 70%, 90% puis deux fois à 100%. La dernière étape de déshydratation se fait par une incubation de 20 min dans de l'acétone à 100%.

Les échantillons déshydratés sont infiltrés par un mélange EPON 875 / acétone. (Résine / acétone). L'infiltration de la résine est progressive : un premier mélange 1 :1 (v :v) pendant 1 heure, un second mélange 2 :1 (v :v) pendant 2 heures, puis finalement dans de l'EPON 875 pure pendant au moins 6 heures. Les échantillons

sont ensuite disposés dans une plaque contenant des fenêtres permettant de mouler la résine. Avec de l'EPON 875 fraîchement préparée, les échantillons sont déposés dans les fenêtres et orientés, avec le côté hémisectionné vers le haut pour faciliter la taille et la découpe des échantillons. Une fois correctement placés, les plaques contenant les échantillons sont incubées 2 jours à 60°C. Les principales étapes sont présentées dans la figure 33

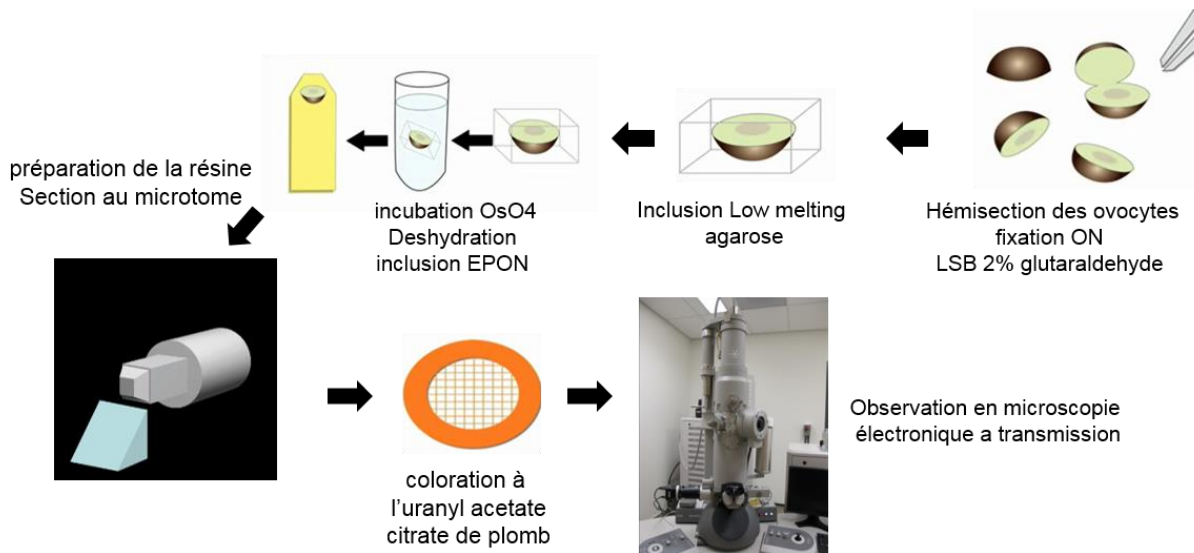


Figure 33 : Inclusion des ovocytes injectés en résine EPON, coupe, et coloration positive
Pole végétatif (couleur crème) et pole animal (marron) (adapté de Cohen et al JOVE)

III.9 : Coupe au microtome et observation en microscopie électronique à transmission

Cette partie correspond aux dernières étapes présentées dans la figure 33. Le bloc de résine d'EPON est taillé en prisme autour de la région du noyau (visualisable sous binoculaire). Après la taille de la résine, celle-ci est placée sur le microtome. La lame de diamant permet d'obtenir des coupes ultrafines d'environ 50 nm d'épaisseur (200 nm pour de la tomographie). Les coupes obtenues sont transférées par capillarité sur des grilles de cuivre (EM grids 200) préalablement préparées par dépôt d'une fine couche de parlodium puis conditionnées. Après séchage à température ambiante, les grilles sont successivement incubées dans une goutte d'acétate d'uranyle à 2%, lavées dans quatre gouttes d'eau distillée, incubées dans du citrate de plomb à 2%, lavées dans quatre gouttes d'eau distillée puis finalement laissées sécher à l'air. Après séchage complet, les grilles sont utilisées pour observer les échantillons en microscopie électronique à transmission. Pour l'acquisition des images, j'ai utilisé le

microscope Tecnai 20 avec le logiciel associé. Après localisation et identification de l'enveloppe nucléaire, les acquisitions ont été obtenues sur les deux types de caméras : celle de résolution normale et celle de haute résolution, avec des grossissements respectifs de 49000X et 70000X.

Résultats

I : Caractérisation des capsides vides

I.1 : Digestion de l'ARNm et réassemblage

J'ai utilisé :

- Des capsides matures, qui sont purifiées après un traitement au NP40 des virus contenus dans le surnageant de culture des HepG2.2.15 (Rabe et al 2003).
- Des capsides recombinantes produites et purifiées à partir d'*E.coli*, contenant de l'ARNm bactérien (capside ARN) (fournis par le professeur Paul Pumpens, Riga, Letonie).
- Des capsides vides obtenues à partir des capsides recombinantes d'*E.coli* (Kann et al 1999)

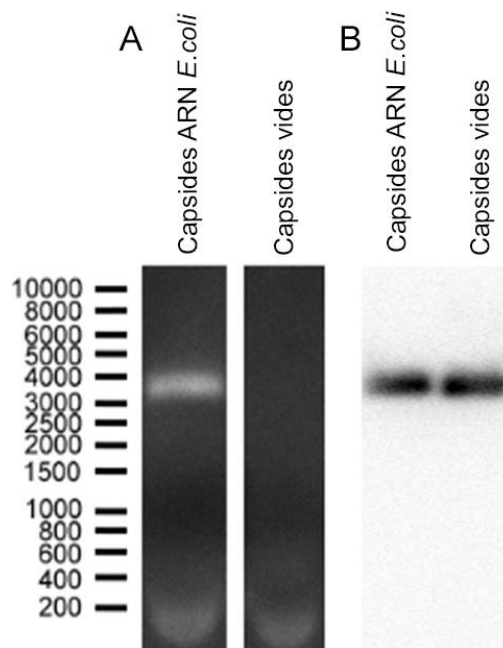


Figure 34 : Digestion de l'ARN des capsides *E.coli* et réassemblage des capsides

Les gels ont été chargés avec des quantités équivalentes de capside (500ng sur le gel d'agarose et 50 ng pour le WB). (Calculé d'après le facteur de dilution) A : gel agarose 1% coloration BET B: WB anticorps anti HBC

Les capsides d'*E.coli*, lors de leur auto assemblage, encapsident un ARNm bactérien d'une taille comprise entre 3,2 et 3,5 kb, correspondant à la taille du génome du VHB (Birnbaum and Nassal 1990). La digestion effective de l'ARNm est vérifiée après migration des capsides traitées à la RNase A sur un gel d'agarose en condition

native et coloration au bromure d'éthidium (Figure 34). On observe bien la disparition de la bande entre 3 et 4 kb.

Le réassemblage a été vérifié par un WB en utilisant l'anticorps anti-HBc (Dako) qui ne reconnaît que les structures assemblées de la protéine HBc. Ainsi, on peut vérifier que les capsides se sont bien reformées (réassemblées) (Figure 34). (Nous comparons ces préparations à des capsides ARN *E.coli* conservées à 4°C où leur stabilité est préservée sur une longue période). Le WB obtenu montre bien une migration identique ainsi que des intensités de signaux luminescents similaires entre les capsides ARN *E.coli* et les capsides vides. Ce résultat indique que la majorité des capsides se sont bien réassemblées en capsides après la digestion de l'ARN.

I.2 : Stabilité des capsides vides

J'ai ensuite analysé la stabilité des préparations de capsides vides en les stockant cinq semaines à différentes températures, et après des ultracentrifugations réalisées lors des expériences de cosédimentation.

- 4°C, température à laquelle sont stockées les capsides
- 0°C, température à laquelle sont soumises les capsides sur glace
- 20°C, température ambiante
- Ultracentrifugation de 16 min à 60 000g dans du tampon de transport
- Ultracentrifugation de 20 min à 50 000g sur coussin de saccharose à 60%

Pour regarder leur intégrité, les capsides ont été observées à une concentration de 80 ng/µl en microscopie électronique à transmission.

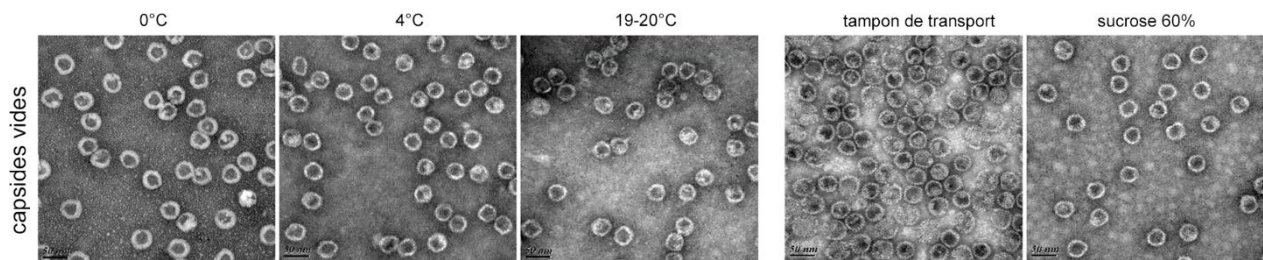


Figure 35 : Stabilité des capsides vides par observation en TEM

Images représentatives des observations effectuées en microscopie électronique à transmission après stockage des capsides vides à 0°C, 4°C et 20°C pendant cinq semaines. Observation des capsides après deux protocoles différents d'ultracentrifugation. Grossissement X300 000. La barre représente 50 nm.

Sur la figure 35, on constate que les capsides stockées à différentes températures ont conservé leur structure. Ces capsides vides paraissent similaires aux autres capsides matures (Sells et al 1987) et capsides ARN *E.coli* (Wingfield et al 1995) observées en microscopie électronique à transmission. Les capsides sont isolées (pas d'agrégation), en quantité suffisante, et elles ne se sont pas désassemblées. Nous n'observons pas d'agrégation sur les clichés. L'ultracentrifugation ne semble pas non plus avoir d'effet délétère (désassemblage, agrégation...) sur les préparations de capsides vides puisque nous sommes capables de les observer. Les capsides vides sont à une concentration de 1 mg/ml.

II : Transport cytoplasmique vers le noyau : expériences *in cellulo*

Pour analyser le transport cytoplasmique des capsides du VHB, j'ai microinjecté des capsides dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Cette technique permet d'analyser les étapes précoces de l'infection en s'affranchissant de l'étape d'entrée du virus (Pante and Kann 2002; Panté 2006; Cohen et al 2009), une étape limitante pour le VHB. La taille des ovocytes (environ 1 mm) de xénope permet d'injecter des volumes plus importants que dans les cellules somatiques et facilite la préparation des échantillons pour la microscopie électronique. Des travaux du laboratoire ont montré que les capsides matures injectées dans des ovocytes de xénope sont visualisables au NPC (Pante and Kann 2002; Schmitz et al 2010).

II.1 : Injection de capsides VHB dans des ovocytes de *Xenopus laevis*.

Lors d'un séjour de 2 mois au sein de l'équipe de Nelly Panté (Life science Institut, UBC Vancouver) le cumul de mes expériences d'injection a avoisiné près de 250

ovocytes injectés dont seuls 15 % des ovocytes préparés ont pu être analysés au microscope électronique à transmission pendant mon séjour.

II.1.1 : Localisation des capsides aux NPC

Sur la base des expériences antérieures, 5×10^8 capsides ARN *E.coli* ou de capsides vides ont été injectées par ovocyte. Les capsides matures, disponibles en quantités plus limitées, ont quant à elles été injectées à 9×10^7 capsides par ovocyte (soit 5,7 fois moins que pour les capsides vides). Lors de la cinétique j'ai analysé l'arrivée des capsides aux NPC après des incubations de :

- 15 min après injection correspondant au temps « précoce »
- 60 min après injection correspondant au temps « tardif »

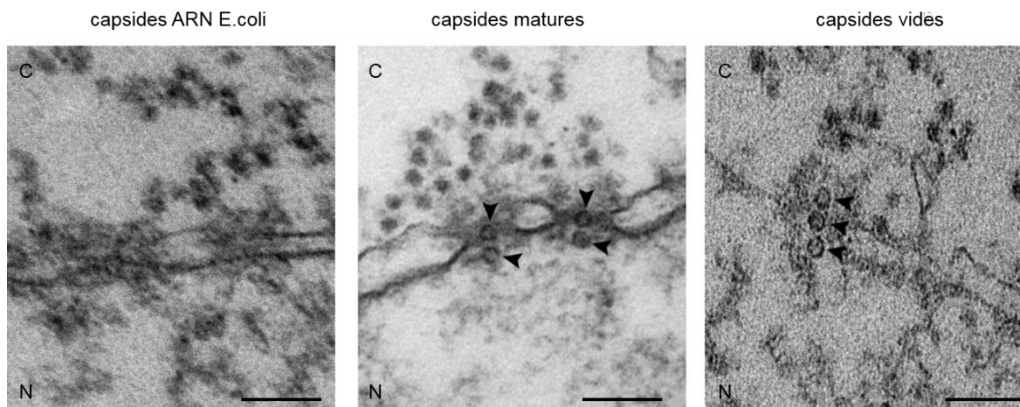


Figure 36 : Localisation des capsides aux NPC à 60 min

Microscopie électronique à transmission de sections de l'enveloppe nucléaire présentant une région cytoplasmique C et une région nucléaire N. Ovocyte de *Xenopus leavis* injectés avec différents types de capsides du VHB (capsides ARN d'*E.coli*, capsides matures et capsides vides) et incubés à température ambiante pendant 60 minutes. La préparation des échantillons est détaillée dans la section matériels et méthodes. Les flèches pointent les capsides présentes au niveau des NPC (barre représente 100 nm)

Comme le montre la figure 36, on identifie l'enveloppe nucléaire séparant le noyau du cytoplasme qui sont distinguables l'un de l'autre par les granules (ribosomes) présents dans le cytoplasme. Les NPC apparaissent plus denses et décorent l'enveloppe nucléaire. Le contraste obtenu par la coloration positive nous permet de distinguer des capsides présentes aux NPC. Je n'ai jamais identifié de capsides ARN *E.coli* présentes au NPC tant à 15 qu'à 60 min au contraire des capsides matures et des capsides vides clairement repérables (Figure 36).

II.1.2 : Quantification des NPC et capsides

A partir des acquisitions effectuées, j'ai analysé image par image tous les NPC en quantifiant le nombre et la localisation des capsides dans les NPC. Les résultats des quantifications figurent dans le tableau ci-dessous.

		15 min	60 min
capside matures	NPC totaux	n= 77	n=106
	NPC contenant capsides	n=9	n=42
	capsides	n=10	n=76*
	% NPC contenant capsides	12%	40%
	n capsides/NPC	1,11	1,81
		15 min	60 min
capsides vides	NPC totaux	n=99	n=148
	NPC contenant capsides	n=31	n=76
	capsides	n=58	n=195
	% NPC contenant capsides	31%	51%
	n capsides/NPC	1,87	2,57

Tableau 14 : Quantifications des NPC et des capsides dans les ovocytes injectés avec capsides matures et capsides vides

Quantification pour deux types de capsides (matures et vides) injectées dans des ovocytes à 15 et 60 minutes post-injection, nombre de NPC (totaux et contenant des capsides) nombre de capsides, pourcentage de NPC contenant des capsides et nombre moyen de capside par NPC (* les capsides nucléaires n'ont pas été comptabilisé)

Le nombre de NPC totaux analysés est assez important, ayant travaillé pour ces quantifications sur une centaine de clichés comportant de trois à douze NPC par cliché. Cependant le nombre de NPC contenant des capsides matures et le nombre de capsides matures identifiées dans les NPC à 15 min sont faibles : respectivement 9 et 10. A 60 min sur les 106 NPC analysés, 42 NPC contenaient des capsides matures pour un nombre total de 76. Les capsides vides sont identifiées aux NPC en plus grande quantité tant à 15 min qu'à 60 min mais ces différences quantitatives s'expliquent au moins en partie par la différence du nombre de capsides injectées. En effet dès 15 min j'ai identifié 58 capsides en analysant 99 NPC. Seuls 31 NPC contenaient des capsides vides. A 60 min j'ai quantifié 195 capsides sur un total de 148 NPC analysés dont 76 contenaient des capsides vides.

Une diffusion passive ne peut permettre un transport aussi rapide (dès 15 min) des capsides du site d'injection à la périphérie nucléaire. Considérant la taille moyenne des ovocytes utilisés (1,2 mm) et la localisation du noyau dans le pôle végétatif ainsi que de sa taille (environ 400 μm de diamètre). Cela représente une distance de 400

à 500µm à parcourir. Cela implique donc que ce transport vers le noyau est « dirigé ».

II.1.3 : Capsides et complexe du pore nucléaire (NPC)

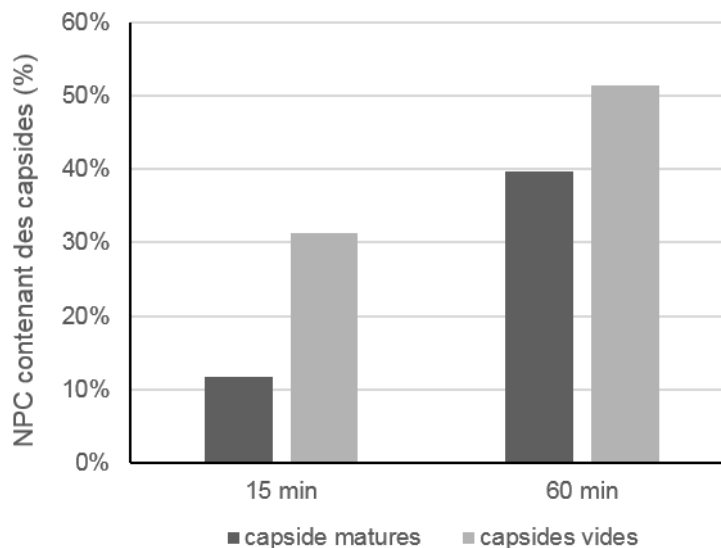


Figure 37 : Histogramme des pourcentages de NPC contenant au moins une capside

Représentation en histogramme des données figurant dans le tableau 14 : calcul de la quantité de NPC contenant des capsides par rapport au nombre total de NPC analysées. Noir : capsides matures ; Gris : capsides vides,

Pour chaque type de capside, on peut observer une augmentation du nombre de NPC contenant au moins une capside au cours du temps: 11% des NPC analysés contiennent des capsides matures à 15 min. Ce pourcentage augmente à 39% à 60 min. Pour les capsides vides, le pourcentage de NPC contenant des capsides est plus élevé, il est de 31% à 15 min et de 51% à 60 min.

L'augmentation du pourcentage de NPC contenant des capsides vides et matures indiquent que ces deux types de capsides sont transportées de façon similaire à travers le cytoplasme jusqu'aux NPC sans être aussi efficace. En effet, en injectant presque 6 fois moins de capsides matures que les capsides vides on observe une différence d'un facteur 3 à 15 min qui se réduit à un facteur de 1,25 à 60 min indiquant que le système de transport n'est pas saturé.

Considérant le nombre de capsides contenues dans les NPC nous pouvons calculer le nombre moyen de capsides par NPC (Tableau 14) représenté sur l'histogramme en figure 38.

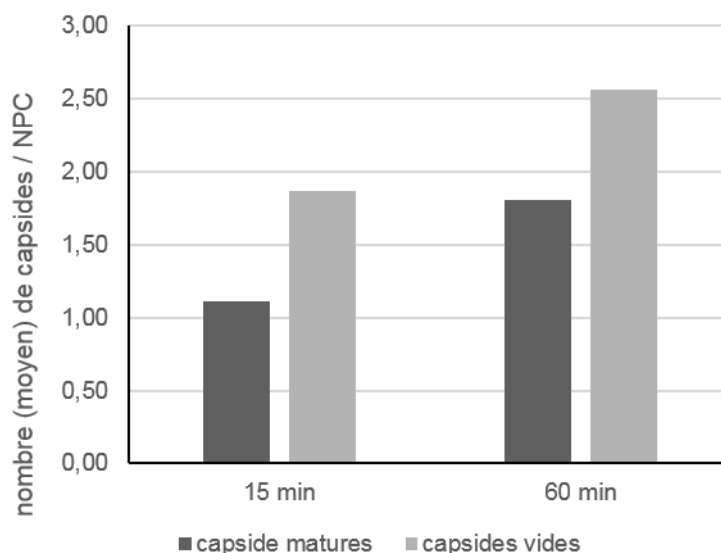


Figure 38 : Histogramme du nombre moyen de capsides par NPC

A partir des quantifications figurant dans le tableau 14, en ne considérant que les NPC contenant des capsides, calcul du nombre moyen de capsidie par NPC. Noir : capsides matures ; Gris : capsides vides.

Les quantifications indiquent une augmentation de la quantité de capsides matures aux NPC au cours du temps : le nombre moyen de capsides matures par NPC est de 1,11 à 15 min et de 1,80 à 60 min. Il y a une augmentation moyenne d'environ 0,7 capsides par NPC. Il est important de noter qu'à 60 min des capsides nucléaires sont également observées sur les images de microscopie électronique en utilisant des capsides matures mais sont exclues de ces quantifications. Le nombre moyen de capsidie par NPC est donc sous-estimé. Ces capsides nucléaires résultent d'un désassemblage des capsides au niveau du NPC permettant l'import des protéines HBc qui se réassembleront en capsidie dans le noyau (Rabe et al 2009). Je n'ai par contre jamais observé de capsidie nucléaire dans les ovocytes injectés avec des capsides vides.

Le nombre moyen de capsides vides par NPC est plus élevé que celui déterminé pour les capsides matures probablement en raison des différences de quantités injectées. Il est de 1,87 capsides vides par NPC à 15 minutes et de 2,56 à 60 minutes. Ainsi, il y a une augmentation du nombre moyen de presque 0,7 capsidie par NPC, comme observé pour les capsides matures. Pour ces échantillons nous n'avons pas observé de capsidie nucléaire ce qui implique une accumulation de ces capsides au NPC et explique que le nombre moyen de capsidie par NPC soit supérieur par rapport aux capsides matures.

Pour les deux types de capsides les nombres moyens de capsides sont différents et s'expliquent vraisemblablement par les quantités différentes de capsides injectées dans les ovocytes. Cependant, on constate une augmentation similaire du nombre moyen (+0,7) de capsides par NPC au cours du temps ce qui implique également que la perte de capsides matures par désassemblage est limitée pendant la période d'observation et des conditions d'incubation (20°C).

II.1.3 : Distribution des capsides aux NPC

II.1.3.1 : Distribution quantitative des capsides aux NPC

Bien qu'étant aux prises avec des quantités différentes de capsides injectées, lors de l'acquisition des données au microscope, j'ai calculé les rapports du nombre de capsides par NPC, différents en fonction du temps pour chaque type de capsid. Les données présentées en figure 38 fournissent des informations quantitatives. Les résultats présentés dans la figure 39 apportent des informations qualitatives. Les histogrammes représentent le pourcentage de NPC contenant de 1 à 5 capsides pour les deux types de capsid à 15 minutes et à 60 minutes après microinjection.

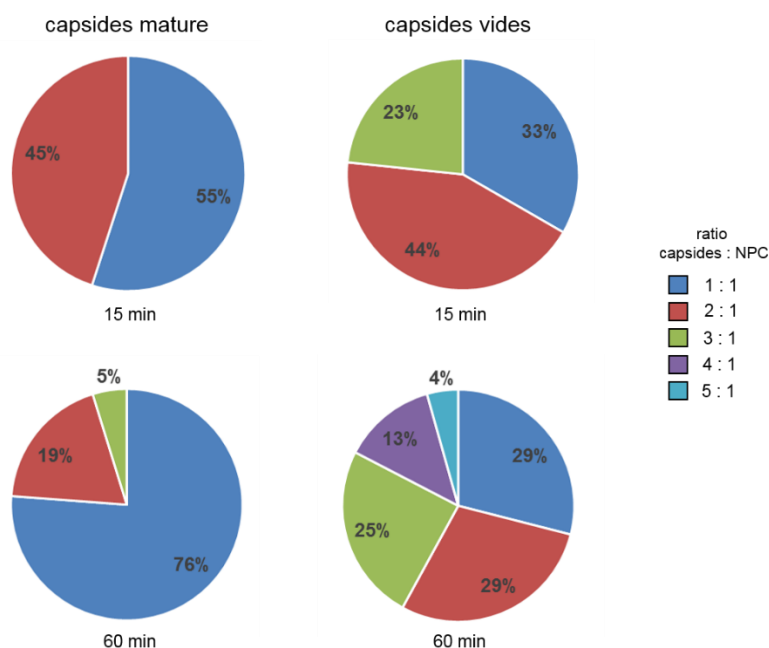


Figure 39 : Distribution qualitative des capsides au NPC

Histogramme représentant le nombre de capsides par NPC pour tous les NPC pour lesquels ont été identifiés des capsides à 15 min et 60 min. A partir de la quantification des ratios de capsides par NPC (capside : NPC : (1 :1, 2 :1, 3 :1, 4 :1, 5 :1)) nous avons calculé les pourcentages de NPC en fonction des différents ratios.

Comme on peut le voir sur la figure 39, que ce soit à 15 ou à 60 min la majorité des NPCs contiennent 1 capsides mature. A 15 min, 45% des NPC ont 2 capsides matures et ce nombre diminue à 19% à 60 min. Le pourcentage de NPC contenant deux capsides matures diminue au cours du temps, cependant dans 5% des NPC analysés j'ai identifié 3 capsides matures. Comme attendu, les capsides matures passent au travers du NPC et se désassemblent pour ensuite se réassembler dans le noyau.

En ce qui concerne les capsides vides les résultats sont différents. A 15 minutes, la majorité (67%) des NPC contient déjà au moins 2 capsides, probablement dû à la quantité injectée et non à la cinétique. Cependant 33% des NPC ne contiennent qu'une seule capsides. Cette proportion est maintenue à 60 minutes puisque 29% des NPC ne contiennent qu'une capsides, la majorité, soit 54%, des NPC contiennent 2 ou 3 capsides. Et enfin 17% des NPC possèdent 4 voire même 5 capsides.

Les résultats des expériences effectuées au laboratoire convergent vers un désassemblage des capsides dans le panier nucléaire. Ce désassemblage semble

être l'étape limitante des capsides vides ce qui entraîne une accumulation des capsides vides dans les NPC. J'ai donc analysé la distribution des capsides aux NPC.

II.1.3.2 : Localisation des capsides dans le NPC

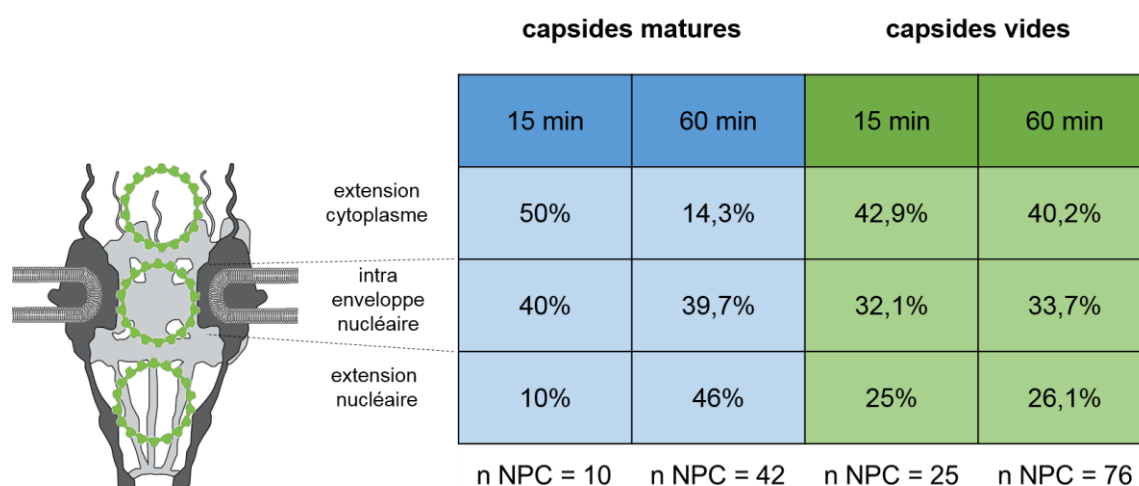


Figure 40 : Distribution des capsides au sein du NPC

Quantification des capsides matures et vides selon leur localisation au niveau de la structure du NPC (n= nombre de capside quantifiées)

Considérant la structure du NPC (voir VI.4 import nucléaire) trois zones ont été sélectionnées : l'extension cytoplasmique du NPC, la zone au niveau de l'enveloppe nucléaire et le panier nucléaire.

Pour les capsides matures à 15 minutes après microinjection, la majorité des capsides (50%) sont au niveau des fibrilles cytoplasmiques, 40% dans la zone centrale du NPC et 10% au niveau du panier nucléaire.

A un temps précoce (15 min après injection), les capsides viennent d'arriver à la périphérie nucléaire et sont donc localisées majoritairement du côté cytoplasmique du NPC.

Plus tardivement à 60 minutes après microinjection, cette répartition est complètement inversée : la majorité des capsides (48%) est localisée dans le panier nucléaire et seulement 14,3% sont au niveau des fibrilles cytoplasmiques. Le pourcentage de capsides dans la partie centrale du NPC reste similaire à celui observé à 15 min (39,7%). Ainsi, nous pouvons observer une progression des capsides matures dans les NPC au cours du temps, du cytoplasme vers le panier nucléaire. Nous devons cependant pondérer ces observations par le peu de

capsides observées à 15 min (n=10). Ce nombre réduit de capsides peut s'expliquer par le fait que les cargos cellulaires sont également transportés pendant l'expérience. Ces résultats suggèrent que la libération du panier nucléaire par désassemblage de la capsid est l'étape limitante.

La répartition des capsides vides à 15 min et à 60 min est identique : un peu plus de 40% des capsides sont localisées au niveau des fibrilles cytoplasmiques, 30 à 35% dans l'anneau central et 25% des capsides vides sont dans le panier nucléaire.

Cette répartition des capsides est relativement proche de la distribution des capsides matures à 15 minutes. Notre hypothèse propose que le désassemblage soit le facteur limitant et explique la plus grande quantité de capsides observée au NPC. Le blocage dans le panier nucléaire ne permet pas l'arrivée d'une proportion élevée de capsides vides dans le panier nucléaire.

En résumé, les capsides matures et vides sont transportées dans les cellules de façon active et similaire vers les NPC. Les deux types de capsides passent par le NPC, les capsides matures s'y désassemblent alors que les capsides vides s'y accumulent.

II.1.4 : Transport dans le cytoplasme

L'identification de ces capsides aux NPC est une étape consécutive au transport cytoplasmique des capsides. Pour se concentrer sur cette étape cytoplasmique nous avons effectué deux types d'expérience *in cellulo* :

- Microinjection des capsides dans les ovocytes de xénope pré-injectés avec des anticorps
- Microinjection des capsides dans des cellules de mammifère (U2OS)

II.1.4.1 : Injection dans des ovocytes de xénope pré-injectés

Avec le même procédé utilisé précédemment, les ovocytes de xénope ont été injectés deux fois. Une première fois avec un anticorps et la seconde fois avec les capsides matures. Un anticorps anti tubuline qui se fixera sur les Mt ce qui va altérer la dynamique des Mt (Füchtbauer et al 1985) et un anticorps anti parvovirus H1, une protéine nucléaire utilisée comme contrôle d'injection. Ces anticorps ont été pré-

injectés dans des ovocytes différents. Par analyse des capsides aux NPC on apprécie l'effet des anticorps sur le transport au noyau.

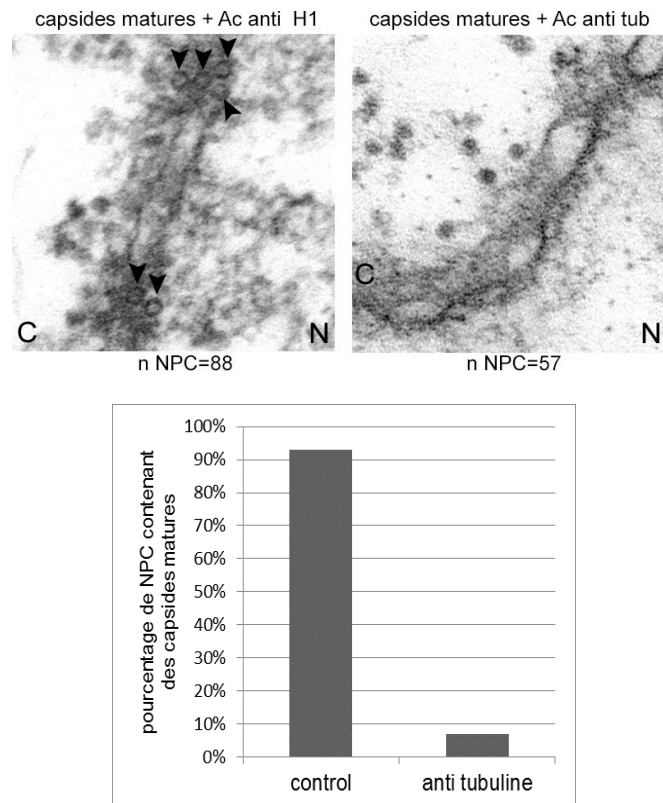


Figure 41 : Localisation des capsides matures aux NPC dans des ovocytes pré injectés

Images représentatives des acquisitions effectuées en microscopie électronique à transmission. Préinjection d'anticorps anti parvovirus H1 (Ac anti H1) ou anticorps anti tubuline (Ac anti tub) puis injection de capsides matures. Les capsides sont identifiées *via* les flèches. N : noyau, C : cytoplasme. Histogramme représentant le pourcentage de NPC analysés contenant des capsides matures.

Nous observons distinctement des capsides aux NPCs sur la figure 41. Comme attendu la pré-injection d'anticorps anti Histone H3 ne perturbe pas le transport des capsides matures au NPC (97% des NPCs analysés contiennent au moins une capside). Lorsque l'anticorps anti tubuline est pré-injecté nous observons très peu de capsides matures visibles aux NPCs (seuls 7% des NPCs analysés contiennent au moins une capside). Le transport cytoplasmique vers la périphérie nucléaire et *in extenso* au NPC est inhibé lorsque l'anticorps anti tubuline est pré injecté.

Ces résultats indiquent que le transport des capsides matures vers le noyau utilise le réseau de Mt.

C'est un volume de 50nl qui est microinjecté dans les ovocytes qui, rapporté au volume du cytoplasme ne représente qu'un faible pourcentage du volume total. Ce système de microinjection dans des ovocytes de *Xenopus laevis* est optimal pour

observer les NPCs mais ce n'est pas très compatible pour analyser les Mt en microscopie électronique à transmission. J'ai donc opté pour une alternative en réalisant des microinjections dans des cellules U2OS, qui sont des cellules de mammifères (*Homo sapiens*) possédant un large cytoplasme ce qui facilite les microinjections cytoplasmiques. Le système de transport par les Mt est phylogénétiquement conservé (Little and Seehaus 1988; Pfister et al 2006). Il ne semble pas y avoir de différence significative entre les deux systèmes. Techniquement le volume injectable dans les cellules U2OS est limité, les expériences ont donc été effectuées uniquement avec des capsides recombinantes (*E.coli* et vides).

II.1.4.2 : Micro injection dans les cellules U2OS

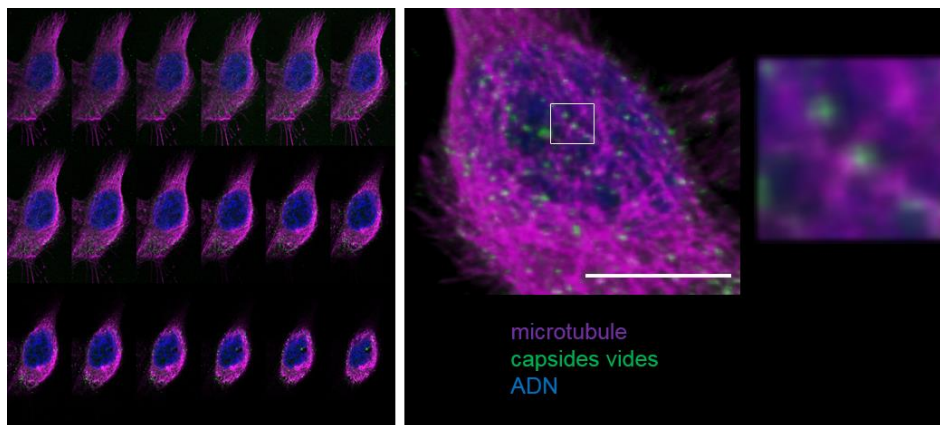


Figure 42 : Immunofluorescence de cellules U2OS microinjectées avec des capsides vides
Image représentative des cellules microinjectées avec des capsides vides entre 1h et 2 h après microinjection. Le panel de gauche représente toutes les acquisitions selon l'axe en Z sur des tranches de 0.3µm. A droite, une reconstruction 3D d'une cellule microinjectée est présentée (ImageJ). Les capsides sont en vert, (anticorps anti HBc l'ADN en bleu, les Mt en magenta (anticorps anti tubuline) un agrandissement de la zone nucléaire permet d'apprécier les colocalisations entre les capsides vides et les Mt. Les barres d'échelle représentent 15µm

L'utilisation du logiciel ImageJ (NIH) a permis de faire une reconstruction 3D de la cellule afin de reconstituer le réseau de Mt et de regarder la localisation des capsides. Après microinjection de capsides vides dans les cellules U2OS, on observe que les capsides sont localisées dans le cytoplasme et sont associées avec les Mt. Sur le panel de gauche je n'ai pas identifié de capside dans le noyau, cela indique que les capsides observées sur la reconstruction 3D (projection) au niveau de noyau sont les capsides situées au-dessus ou en dessous du noyau.

Sur l'agrandissement de la reconstruction 3D (image à droite de la figure 42) on observe des colocalisations entre les capsides vides et les Mt. Les capsides sont

situées le long des Mt. Ces observations ont été effectuées sur 63 cellules microinjectées avec les capsides vides.

Cependant, je n'ai pas observé d'accumulation de capsides vides à l'enveloppe nucléaire des U2OS microinjectées, contrairement à ce qui avait été observé dans les ovocytes de *Xenopus laevis* ainsi que dans les expériences de transport en 10 min sur cellules perméabilisées (Delaleau, Rabe *et al* non publié).

Après injection d'ovocytes de *Xenopus laevis* les capsides ARN *E.coli* n'étaient pas identifiables au NPC, et notre hypothèse était que ces capsides étaient bloquées lors d'une étape précédant l'arrivée au NPC. Des microinjections de capsides ARN *E.coli* ont également été réalisées dans les cellules U2OS comme présenté sur la figure 43.

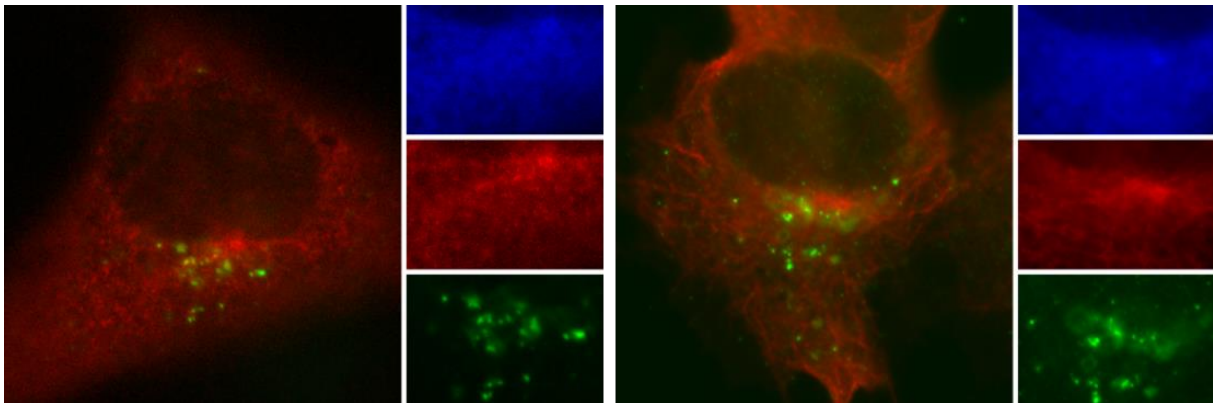


Figure 43 : IF de cellules U2OS microinjectées avec des capsides ARN *E.coli*

Image représentative des cellules microinjectées avec des capsides ARN *E.coli* entre 1h et 2 h après microinjection. Deux acquisitions représentatives de la majorité des cellules microinjectées. Acquisitions en microscopie à épifluorescence. Les capsides sont en vert, (anticorps anti HBc), marqueur de microinjection en bleu (IgG Alexa), les Mt en rouge (anticorps anti tubuline)

Lors d'un marquage immunocytochimique des capsides *via* l'anticorps anti HBc puis un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488, et des Mt avec un anticorps anti tubuline, j'ai observé une accumulation de capsides ARN *E.coli* autour d'une zone dense en Mt dans la majorité des cellules.

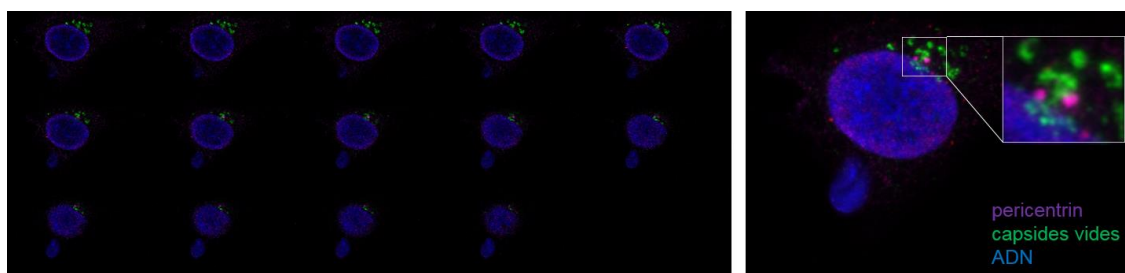


Figure 44 : IF de cellules U2OS microinjectées avec des capsides ARN *E.coli*

Image représentative des cellules microinjectées. Le panel de gauche représente toute les acquisitions selon l'axe en Z sur des tranches de 0,3 μm . A droite, figure une reconstruction 3D de cellules microinjectées (ImageJ) Les capsides sont identifiables par leur marquage à l'Alexa 488 (en vert) En bleu l'ADN, en magenta la péricentrine.

Sur la figure 44, j'ai constaté une accumulation des capsides ARN *E.coli* dans une région proche du noyau. Cette accumulation est localisée autour de la péricentrine, marqueur du centre organisateur des Mt (MTOC) (Archer and Solomon 1994; Doxsey et al 1994).

Cette accumulation des capsides ARN *E.coli* au MTOC explique pourquoi elles n'ont pu être identifiées aux NPC des ovocytes de xénope. Les observations faites sur les U2OS microinjectées indiquent que les capsides ARN *E.coli* devaient être transportées *via* les Mt à travers le cytoplasme mais ne semblaient pas capables d'atteindre le NPC car ces capsides devaient être « bloquées » autour du MTOC.

III : Capsides du VHB et Mt

Dans l'ensemble les capsides interagissent avec les Mt. Afin d'étudier plus précisément l'interaction des différentes capsides avec les Mt, je me suis servi d'un essai *in vitro* employant des Mt polymérisés.

III.1 Capside du VHB et Mt polymérisés *in vitro*

La littérature fait état de mécanismes différents qui permettent le transport actif. Ce transport peut être directement dû aux Mt et utilise les mécanismes de polymérisation et depolymérisation, le mécanisme de tapis roulant (treadmil) ou des protéines associées aux Mt (MAPs) qui ont des fonctions de transport comme les kinésines et les dynéines.

L'interaction capside Mt est-elle directe ou nécessite-t-elle un médiateur cellulaire ?

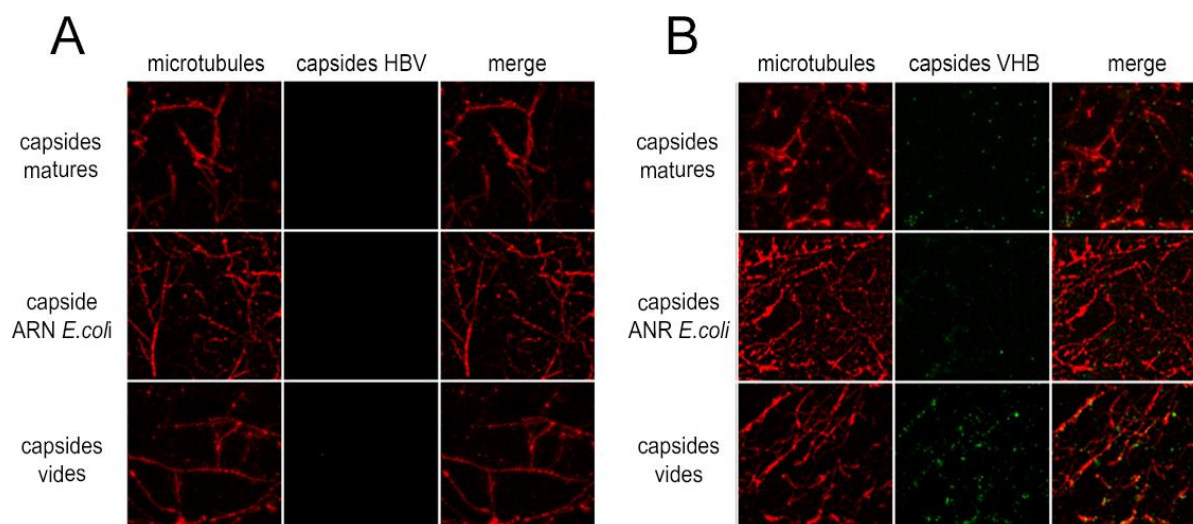


Figure 45 : Colocalisation de Mt polymérisés *in vitro* avec les différentes capsides

Clichés représentatifs des acquisitions obtenues sur les expériences de colocalisation des capsides de HBV avec des Mt. Les Mt apparaissent colorés en rouge (rhodamine) et les capsides en vert (Ac primaire anti HBc suivi d'anticorps secondaire marqué à l'Alexa 488) Panneau A: les capsides seules sont ajoutées à des Mt polymérisés ; Panneau B : Les capsides, en présence de lysat cellulaire, sont ajoutées à des Mt polymérisés (n=2 à 5)

La figure 45A présente les images obtenues lorsque les capsides ont été directement incubées avec les Mt polymérisés *in vitro* en absence de protéine cytoplasmique. Nous n'observons pas de marquage des capsides, ce qui indique qu'aucune des différentes préparations de capsides n'interagit directement avec les Mt. Par contre, lorsque du lysat cellulaire (RRL) est rajouté (figure 45B) on constate cette fois que les capsides matures et les capsides vides se retrouvent associées avec les Mt.

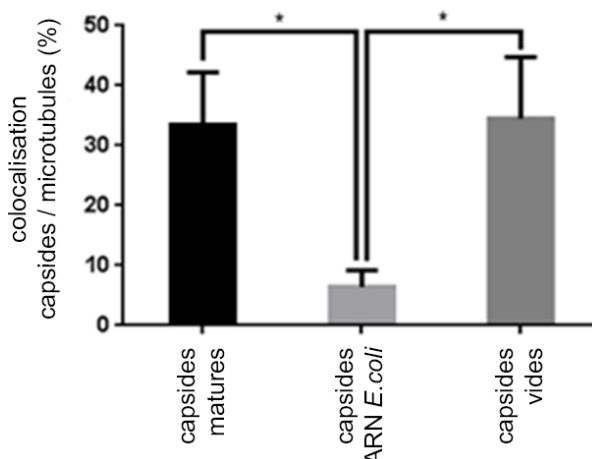


Figure 46 : Quantification du taux de colocalisation des capsides avec les Mt

Histogramme représentant les pourcentages de colocalisation entre capsides et Mt polymérisés *in vitro* en présence de lysat cellulaire. Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ muni d'un greffon de colocalisation, sur une dizaine de clichés pour chaque type de capsides. * : Test statistique de Fisher

Sans lysat aucune colocalisation n'a pu être quantifiée entre les capsides et les Mt polymérisés *in vitro*. L'histogramme de la figure 46 représente le pourcentage de colocalisation entre les différents types de capsides et les Mt en présence de lysat cellulaire. On constate que très peu (5% environ) de capsides ARN *E.coli* colocalisent avec les Mt, alors que les capsides matures et les capsides vides ont des pourcentages de colocalisation avec les Mt nettement plus élevés, d'environ 35%.

Les colocalisations observées lors de ces expériences *in vitro* confortent notre hypothèse d'une interaction entre les capsides et les Mt. De plus, cette interaction apparaît ne pas être directe puisqu'elle nécessite la présence additionnelle de lysat cellulaire. Un ou plusieurs facteurs contenus dans ce lysat doivent jouer le rôle de médiateur.

III.2 : Coïmmunoprécipitation des capsides avec les Mt

Pour confirmer les résultats de colocalisation suggérant une association entre les capsides et les Mt, j'ai recherché l'existence d'une interaction entre les capsides et les Mt par coïmmunoprécipitation.

Après polymérisation des Mt *in vitro*, ces derniers ont été incubés avec des quantités équivalentes de capsides ARN *E.coli* ou de capsides matures (100 ng) immobilisées sur des billes magnétiques (*via* des anticorps anti HBc). Les échantillons obtenus

après précipitation magnétique suivie de lavages ont été analysés sur gel SDS-PAGE et par WB. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 47.

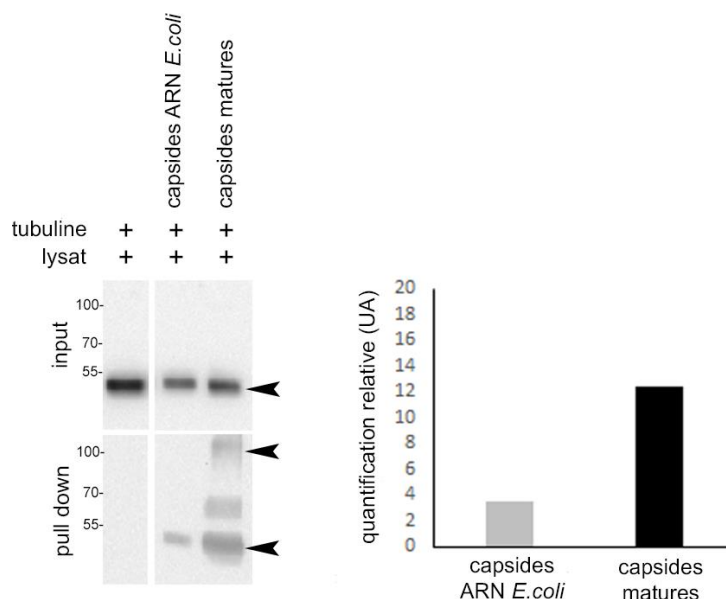


Figure 47 : Coimmunoprécipitation des Mt

Analyse sur gel SDS PAGE 11% suivi de WB révélé avec un anticorps anti tubuline (T6199) de la coprécipitation des Mt par les capsides ARN *E.coli* et les capsides matures quantifications relative de la précipitation de tubuline réalisés via ImageJ

Les Mt ne précipitent pas de manière non spécifique avec les billes. En présence de lysat cellulaire, on constate une coprécipitation des Mt pour les deux types de capsides. En effet, il apparait, d'une part qu'un peu de tubuline coprécipite avec les capsides ARN *E.coli*, et d'autre part que la coprécipitation des Mt par les capsides matures est plus importante. En effet, on observe une bande correspondant à la tubuline monomérique (flèche du bas) ainsi que des dimères de tubuline (flèche du haut). La bande intermédiaire que l'on observe également pourrait correspondre à de la tubuline modifiée post-traductionnellement.

Les résultats de la partie III étayent notre hypothèse d'une interaction entre les capsides et les Mt. Les expériences présentées montrent que cette interaction est indirecte puisqu'un ou plusieurs facteurs cellulaires augmentent la capacité d'interaction et de colocalisation des capsides de VHB avec les Mt. Parmi les protéines susceptibles de jouer ce rôle de médiateur, les MAPs sont de bonnes protéines candidates. Parmi les MAPs, je me suis concentré sur le complexe de la dynéine, responsable du transport rétrograde dans la cellule (voir partie I V.3 : MAPs motrices : le complexe de la dynéine).

IV : Dynéine : médiateur de l'interaction capsid Mt

La dynéine étant un complexe multi-protéique, plusieurs de ses protéines constitutives sont des candidates potentielles pour l'interaction des capsides avec les Mt.

IV.1 : GST dynéine : production et purification des protéines recombinantes

Parmi les protéines constitutives de ce complexe, j'ai sélectionné les chaînes qui sont habituellement impliquées dans les interactions avec des cargos cellulaires ou viraux appartenant au sous-complexe d'interaction (voir partie I VI.1 et VI.2) :

- La chaîne intermédiaire
- Les protéines appartenant au trois familles des chaînes légères
 - Famille Tctex (Tctex1 et Tctex3)
 - Famille Lc8 (LL1 et LL2)
 - Famille Rb (Rb1 et Rb2)

J'ai choisi d'utiliser des protéines recombinantes de la dynéine étiquetées avec la GST (Glutathione S Transferase). Le tag GST augmente la solubilité des protéines recombinantes et est utilisé pour la purification. Il a été placé en N-ter pour ne pas empêcher la dimérisation des chaînes légères, car ces homo-dimérisations dépendent des parties C-ter. Les séquences codantes de ces protéines ont été insérées dans des plasmides Pgex (4T-1 ou 5X-1) obtenus auprès du Dr. Beate Sodeik (Hanovre, Allemagne). La taille des inserts a été vérifiée sur gel d'agarose 1% après digestion des plasmides par EcoR1 et Xho1.

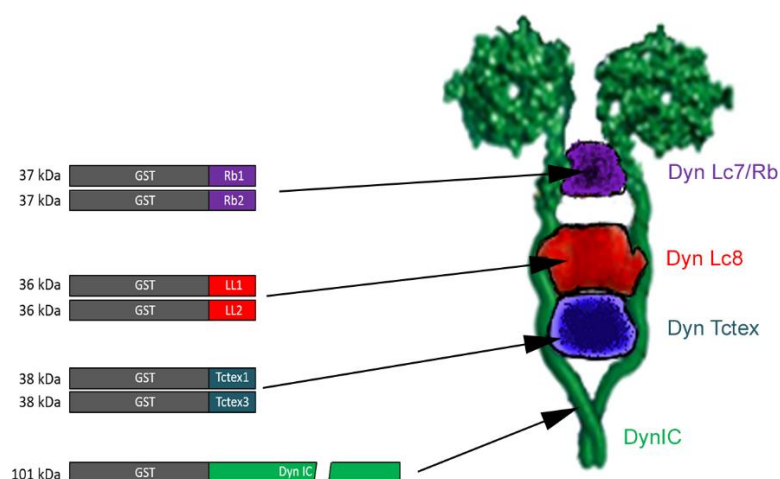


Figure 48 : Schéma des protéines recombinantes GST dynéine

Représentation schématique des protéines recombinantes : en gris le tag GST, en magenta Rb1 et Rb2, en rouge LL1 et LL2, en bleu Tctex1 et Tctex3 et en vert Dyn IC (forme entière)

Des tests d'induction ont été préalablement effectués afin de déterminer le type de souche bactérienne (BL21(DE3), origami et rosetta gami) présentant la meilleure production de protéines, ainsi que les concentrations d'IPTG (0,5 mM et 0,1 mM), les durées d'induction (4h, 16h = ON et 68h) et la température (29°C et 16°C) les plus favorables. Les résultats de ces tests d'induction figurent dans le tableau 15 ci-dessous et figure 49.

	dénomination	kDa	concentration IPTG et temps d'induction	fraction protéine majoritaire	ordre de grandeur quantité
Dyn Tctex	GST Tctex1	38	0,1 mM IPTG, 29°C ON	insoluble	mg/ml
	GST Tctex3	38	0,5 mM IPTG, 16°C 68h	insoluble	mg/ml
Dyn Lc8	GST LL1	34	0,1 mM IPTG, 29°C ON	soluble	mg/ml
	GST LL2	34	0,5 mM IPTG, 16°C 68h	insoluble	mg/ml
Dyn Lc7	GST Rb1	33	0,1 mM IPTG, 29°C ON	insoluble	µg/ml
	GST Rb2	33	0,5 mM IPTG, 16°C 68h	soluble*	mg/ml
Dyn IC	GST DIC	101	0,1 mM IPTG, 29°C ON	insoluble**	µg/ml

Tableau 15 : Dénomination et condition d'induction des protéines recombinantes GST dynéine
Tableau récapitulatif des caractéristiques et des conditions d'induction des protéines recombinantes GST dynéine. Dénomination utilisée dans le manuscrit, taille en kDa, condition d'induction : concentration IPTG, température et durée de l'induction. Solubilité des protéines surexprimées. Quantité (ordre de grandeur) des protéines obtenues après purification puis dialyse. (* : Précipitation de la protéine ; ** : produit de synthèse partiel ou de dégradation)

La meilleure production a été observée après transformation dans des BL21(DE3). La masse moléculaire théorique des protéines recombinantes est exprimée en kDa et les conditions d'induction sont présentées dans le tableau 15. Dans le tableau 15

est indiqué la fraction où on l'on retrouve la majorité des protéines, néanmoins toutes les purifications ont été effectuées à partir des fractions solubles en utilisant des billes de glutathion sépharose 4B. Des échantillons de chaque étape de la purification sont analysés sur SDS PAGE après coloration au bleu de Coomassie. Les ordres de grandeur des concentrations des protéines purifiées obtenues (allant de quelques $\mu\text{g/ml}$ à plusieurs mg/ml) sont renseignés dans le tableau 15.

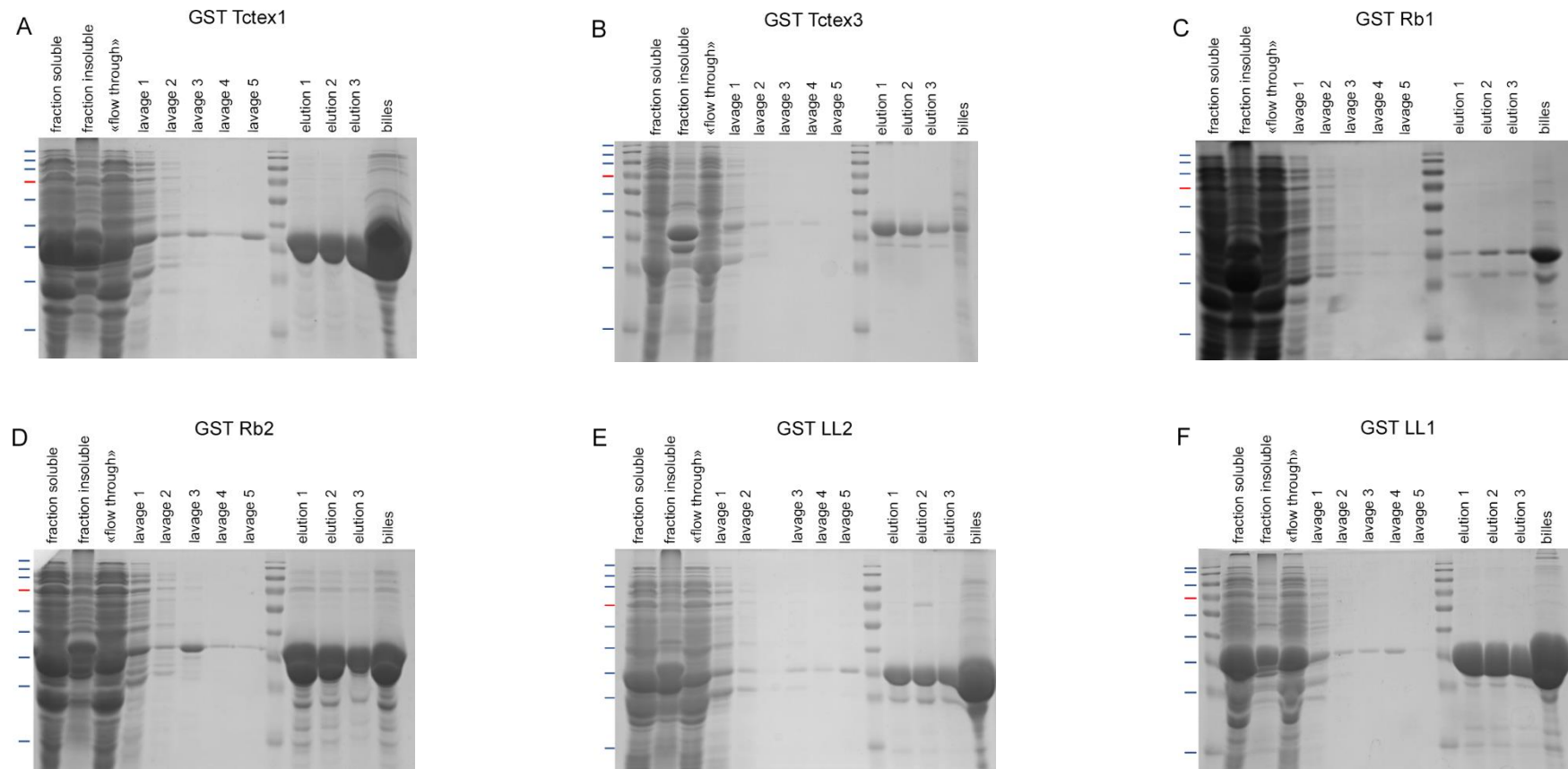


Figure 49 : Surexpression et purification des GST dynéine

Gel SDS PAGE 11% coloré au bleu de Coomassie pour chaque étape de la purification des GST dynéine : A : GST Tctex1 ; B : GST Tctex3 ; C : GST Rb1 ; D : GST Rb2 ; E : GST LL2 ; F : GST LL1 **Tampon de lavage** : Tris 50mM, EDTA 2mM ; NaCl 50mM ; PMSF 1mM ; pH8. **Tampon d'éluion** : Tris 50mM ; glutathion 10mM ; pH8. Marqueur « Protein Ladder 26616 » de haut en bas : 170,130,100, 70 (coloré en rouge), 55, 40, 35, 25 kDa

La figure 49 permet d'apprécier la qualité de purification de chaque protéine. En effet pour les protéines : GST Tctex1 (A), GST Rb2 (D), GST LL2 (E) et GST LL1 (F), on observe une bande majoritaire qui correspond à la protéine surexprimée dans les trois éluions. Cependant, on remarque qu'après les trois éluions il subsiste encore des protéines fixées aux billes de sépharose. Pour les deux autres protéines surexprimées, GST Tctex3 (B) et GST Rb1 (C), on constate que nous récupérons les protéines surexprimées dans les trois éluions alors que ces deux protéines sont présentes majoritairement dans la fraction insoluble. La GST DIC a été purifiée de façon analogue en très faible quantité. Pour cette protéine purifiée j'ai observé beaucoup de produits de synthèse partielle / de dégradation ou de contaminants (non montrés).

Les éluions sont regroupées, dialysées, quantifiées par la méthode de Bradford puis aliquotées et finalement stockées à -20°C . J'ai vérifié le degré de pureté des protéines purifiées par gel SDS coloré au Bleu de Coomassie ainsi que leur reconnaissance par l'anticorps anti GST en WB.

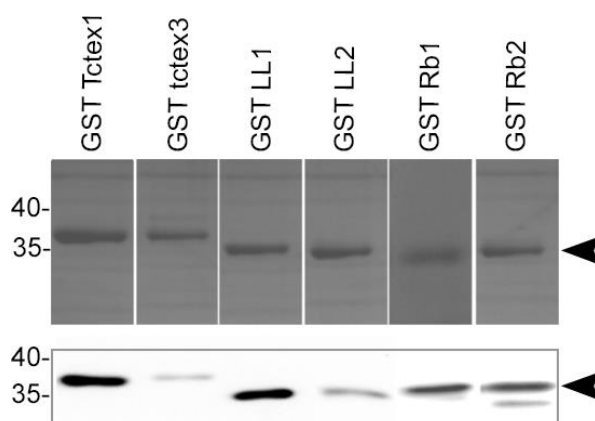


Figure 50 : Analyse des GST dynLC purifiées

En haut : Gel SDS PAGE 11% coloré au bleu de Coomassie. En bas WB révélaté avec l'anticorps anti GST

Sur la figure 50, on observe des quantités équivalentes ($0,8 \mu\text{g}$ quantité déposée) de protéines purifiées sur le gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie. Les bandes visibles au-dessus des protéines purifiées (indiquées par la flèche) indiquent la présence de protéines contaminantes minoritaires. Le WB atteste la reconnaissance des protéines purifiées par l'anticorps anti-GST. Les quantités obtenues de GST Tctex3 et GST LL1 apparaissent plus faibles que pour les autres protéines purifiées. Enfin GST Rb2 apparaît être accompagné d'un produit de dégradation.

IV.2 : Dimérisation des protéines purifiées : vers la formation d'un complexe

Dans les cellules, les chaînes légères de la dynéine interagissent avec la chaîne intermédiaire de la dynéine (DynIC) (cf chapitre concerné). Cette interaction est nécessaire à la formation/assemblage du complexe de la dynéine.

Pour les familles Tctex et Lc8, cette interaction nécessite leur homodimérisation qui conduit à la formation d'un sillon et permet l'interaction avec la DynIC. Pour la famille Rb, les modalités d'interaction sont différentes mais l'homodimérisation est également requise.

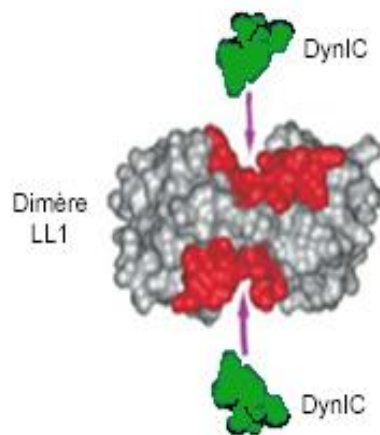


Figure 51 : Schéma de l'interaction entre l'homodimère de DynLC (DynLL1) et la DynIC

Structure tridimensionnelle du dimère de Lc8 en gris, formation d'un sillon identifiable par la zone marquée en rouge. Un domaine de la DynIC en vert s'insère dans ce sillon.

Pour vérifier si les protéines taguées GST sont fonctionnelles par rapport à cette caractéristique, j'ai analysé la précipitation de la DynIC par les différentes chaînes légères de la dynéine en utilisant des billes greffées chimiquement avec du glutathion.

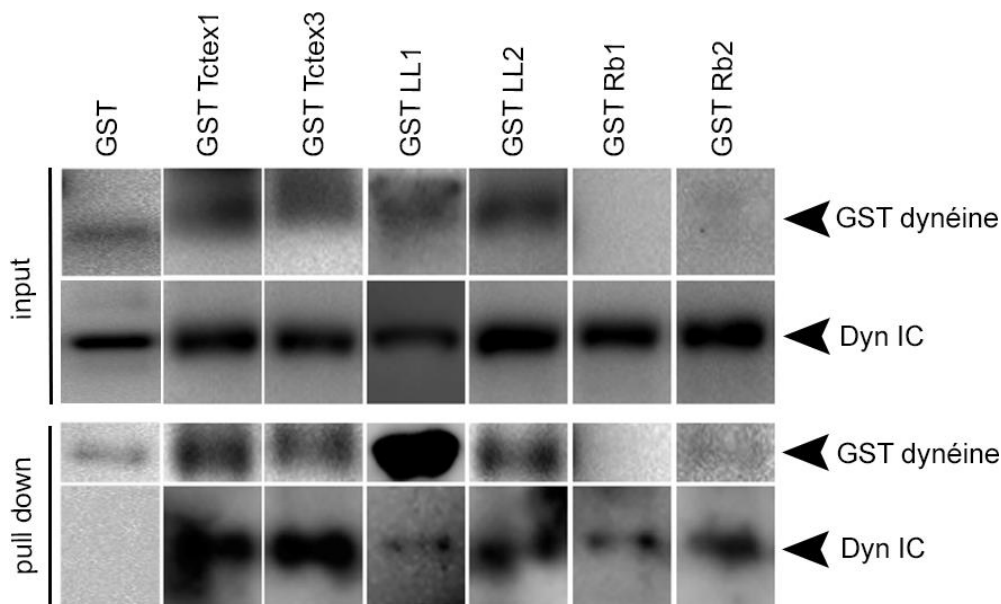


Figure 52 : Précipitation de la DynIC via les GST dynLC purifiées

Analyse par WB de la précipitation de la DynIC provenant du lysat cellulaire RRL par les GST DynLC (GST Tctex1, GST Tctex3, GST LL1, GST LL2 GST Rb1 et GST Rb2) en utilisant des billes glutathion sépharose. L'Ac anti GST est utilisé pour visualiser les chaînes de la dyneine et Ac anti DynIC pour révéler la DynIC. De haut en bas, input : 5% des protéines avant cosédimentation, pull down : protéines après coimmunoprécipitation.

Les résultats de la coprécipitation de la DynIC (Figure 52) montrent que j'ai bien pu détecter dans le lysat la DynIC (input Ac anti DynIC) et que toutes les protéines recombinantes sont capables de précipiter la DynIC. Cela signifie :1) que GST Tctex1, GST tctex3 dimérisent pour former le sillon qui permet l'interaction avec le motif LGMAKITQVDF (AA 110 à 122) de la DynIC. 2) que les GST LL1 et GST LL2 dimérisent pour former le sillon qui interagit avec le motif KETQTP (AA 126 à 135) de la DynIC. 3) que les GST Rb1 et GST Rb2 dimérisent pour former des crevasses hydrophobes dans lesquelles des hélices amphipatiques de la DynIC s'insèrent. Cependant pour la dyneine GST LL1 j'ai dû utiliser 5 fois plus de protéine pour pouvoir observer une coprécipitation de la DynIC en plus faible quantité. L'homodimérisation de GST LL1 semble donc moins efficace.

IV.3 : Interaction avec la capsid du VHB

Pour identifier la chaîne de la dyneine qui interagit avec les capsides du VHB, j'ai entrepris deux types d'expérience :

- Des coimmunoprécipitations avec différents types de capsides (capsides ARN *E.coli* et matures)

- Des cosédimentations avec des capsides vides pour la vérification des résultats obtenus par les coïmmunoprécipitations. Ces expériences nécessitant de grosse quantités de capsides, elles ont été réalisées avec des capsides vides.

IV.3.1 : Coïmmunoprécipitation

Les coïmmunoprécipitations permettent de consommer 10 fois moins de capsides que les expériences de cosédimentation. Ces expériences ont pu être réalisées avec les capsides matures que l'on purifie au laboratoire en quantité limitée. Lors de ces expériences, j'ai immobilisé soit des capsides matures soit des capsides ARN sur des billes utilisant un anticorps (anti HBc DAKO) puis je les ai incubées avec les différentes chaînes légères de la dynéine en présence ou non de lysat cellulaire RRL. Le lysat cellulaire additionné peut être une source de facteurs compétiteurs ou au contraire facilitateurs pour l'interaction. Les résultats de la coïmmunoprécipitation sont présentés dans la figure 53 ci-dessous :

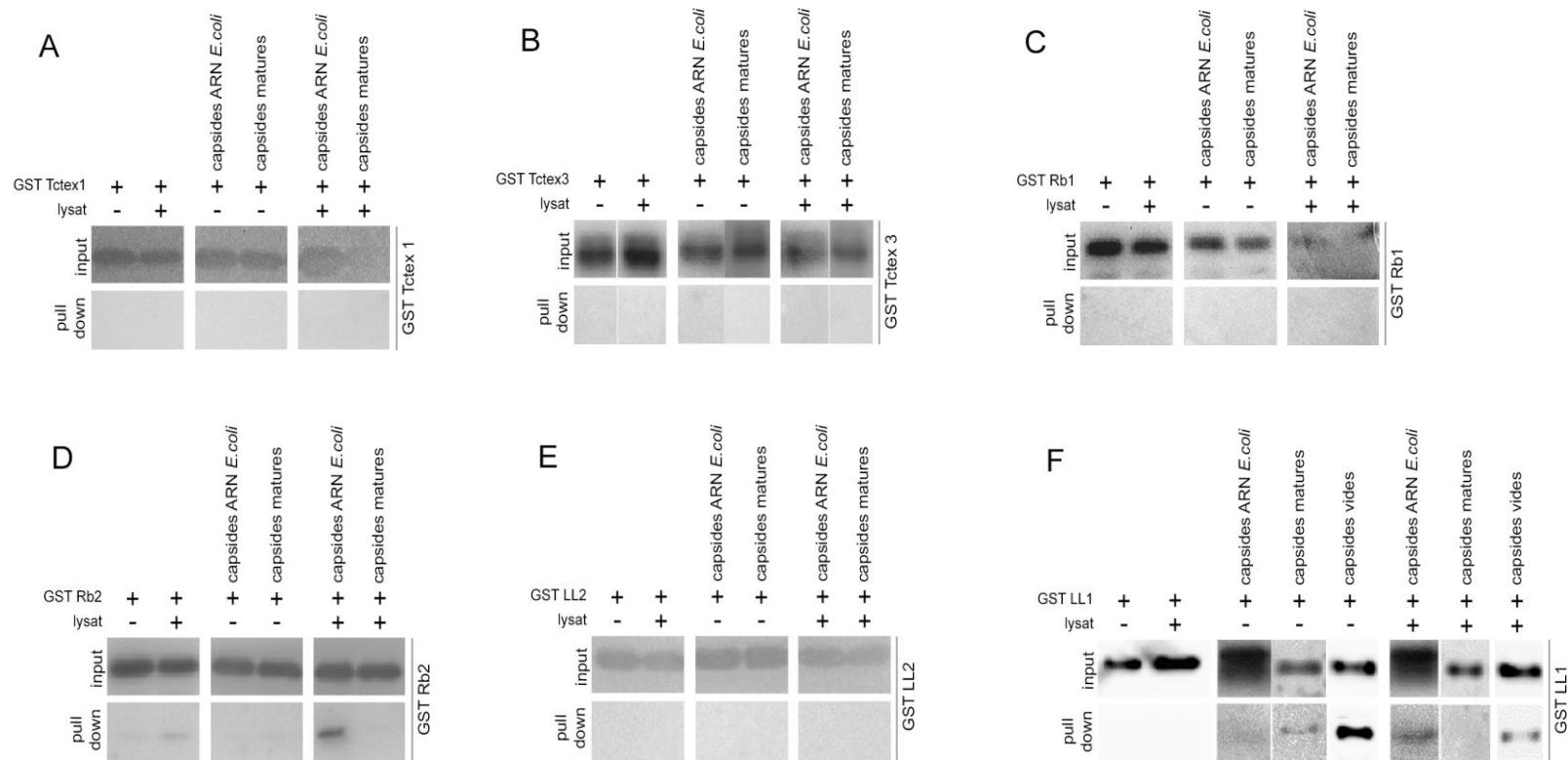


Figure 53 : Coïmmunoprécipitation des GST dynéine avec les capsides du VHB

Analyse par WB (Ac anti GST) de la coprécipitation des différentes GST dynéines avec des capsides matures ou RNA ou vides avec ou sans lysat cellulaire. A : GST Tctex1, B : GST Tctex3, C : GST Rb1, D GST Rb2, E : GST LL2 et F : GST LL1 Pour chaque panneau, , figure en haut (input) l'analyse en WB (Ac anti GST) avant coïmmunoprécipitation, et en bas (pull down) résultats après immunoprécipitation magnétique et lavages en TB des échantillons.

Les panneaux A, B, C et E montrent des résultats d'immunoprécipitation similaires. En absence de capsid on vérifie bien l'absence d'immunoprécipitation non spécifique des chaînes légères comme le montre les contrôles dans les figures A, B, C et E (2 colonnes de gauche). Dans les échantillons contenant des capsides ARN *E.coli* ou des capsides matures, je n'ai pas observé de coimmunoprécipitation entre les capsides et les protéines purifiées. GST Tctex1, GST Tctex3 GST Rb1 et GST LL2, n'interagissent ni avec les capsides matures ni avec les capsides ARN *E.coli*, et l'ajout de lysat cellulaire ne modifie pas les résultats obtenus.

Les résultats sont différents pour GST Rb2. En effet, on constate l'existence d'une fixation non spécifique puisque l'on détecte la protéine sans capsid après coimmunoprécipitation. Mais en ajoutant les deux types de capsides je n'ai pas observé d'augmentation du signal ce qui indique que GST Rb2 n'interagit pas avec les capsides. Par contre, lorsque du lysat cellulaire est ajouté, j'observe une augmentation (par rapport à la précipitation « non spécifique ») de la coprécipitation de Rb2 par les capsides ARN *E.coli*. Cela ne peut s'expliquer par une augmentation de la fixation non spécifique de GST Rb2 dû au lysat car ceci n'est pas observé avec les capsides matures. Ces observations suggèrent l'implication d'un ou plusieurs facteurs cellulaires pour l'interaction avec les capsides du VHB.

Pour GST LL1, (Figure 53, panneau F), sans ajout de lysat, on observe une précipitation des trois types de capsides, ARN, matures et vides. Les capsides ARN *E.coli* précipitent légèrement la GST LL1, précipitation intermédiaire avec les capsides matures, et fortement avec les capsides vides. Lorsque du lysat cellulaire est ajouté on observe une augmentation de la coprécipitation de GST LL1 par les capsides ARN *E.coli* mais une diminution pour les autres capsides. GST LL1 interagit donc avec les différents types de capsides, et cette interaction est modulée positivement ou négativement en fonction de l'ajout de lysat. Ces différences ne peuvent s'expliquer que par des caractéristiques différentes selon le type de capsides et seront développées dans la discussion.

Avec les capsides ARN *E.coli*, j'ai observé des résultats similaires avec deux protéines, GST Rb2 et GST LL1, à savoir une augmentation de la précipitation avec les capsides en présence de lysat cellulaire. Pour les capsides vides et les capsides matures qui coprécipitent GST LL1, cette coimmunoprécipitation est diminuée lorsque l'on ajoute du lysat cellulaire. Cela implique une compétition par un ou

plusieurs composants présents dans le lysat cellulaire. On peut penser à la LL1 endogène ou à d'autres protéines contenues dans le lysat et connues pour interagir avec les capsides.

IV.3.2 : Cosédimentation

Le protocole de cosédimentation sur coussin de saccharose a été établi empiriquement en utilisant de la GST purifiée et des capsides vides. Après la mise en place d'un protocole de cosédimentation, j'ai testé les protéines GST DynLc8 avec les capsides vides. De par la quantité de matériel nécessaire dans ces expériences, les essais ont été limités aux capsides vides.

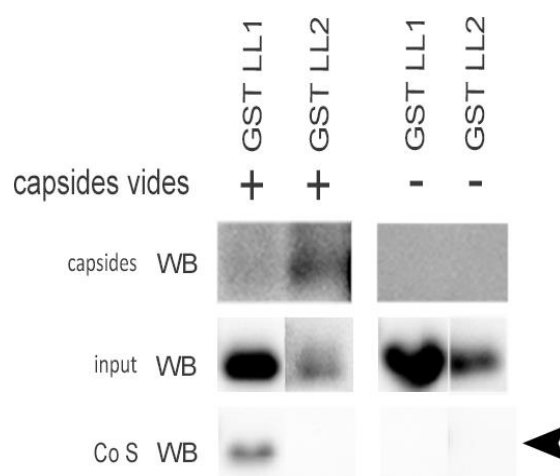


Figure 54 : Interaction entre les capsides vides et GST Lc8 par cosédimentation

Analyse de la cosédimentation par WB en utilisant un Ac anti HBc pour détecter les capsides et un Ac anti GST pour détecter les chaînes légères de la dynéine. De gauche à droite, la sédimentation des GST DynLc8 : GST LL1 et GST LL2 en présence de capsides vides puis en leur absence. Analyse par WB de haut en bas 5% des « sédiments » (Ac anti HBc), input 5% avant cosédimentation (Ac anti GST), Co S : analyse des « sédiments » (Ac anti GST).

En absence de capsid il n'y a pas de sédimentation de GST LL1 et GST LL2. Lorsque j'ai effectué des cosédimentations en présence de capsid vide j'ai observé la cosédimentation d'une seule protéine purifiée : GST LL1 (Figure 54).

Par cosédimentation, seule GST LL1 coprécipite avec des capsides vides ce qui s'explique par une interaction capsid LL1.

IV.4 : La famille Lc8 LL1 / LL2 comparaisons

Dyn LL1 et Dyn LL2 étant deux isoformes de la même famille de protéine, Dyn Lc8, la comparaison des séquences protéiques (les protéines transcrites et traduites *in silico* à partir de nos résultats de séquençage sont bien identiques aux séquences

déposées dans la base de données du NCBI pour les protéines dynéine LL1 et LL2 (*Homo sapiens*) de LL1 et LL2 a été réalisée en utilisant le logiciel BlastP. Le résultat est présenté dans la figure 55, ci-dessous :

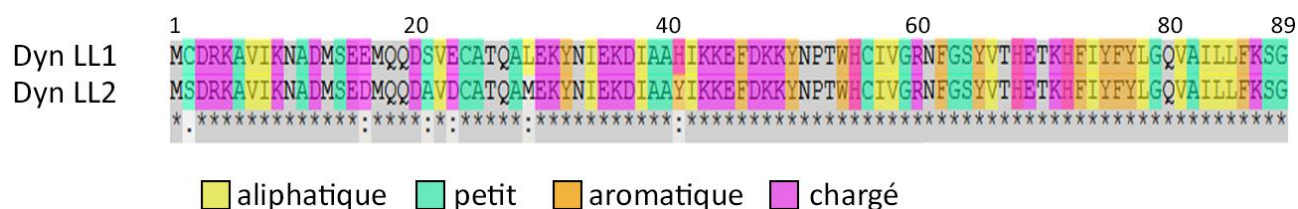


Figure 55 : Comparaison des séquences protéiques de Dyn LL1 et Dyn LL2

Alignement des séquences protéiques de Dyn LL1 (NCBI ref NP_001032584) et Dyn LL2 (NCBI ref : NP_542408.1) les a.a. sont colorés selon leur propriété : aliphatique en jaune, petit en vert aromatique en orange et chargé en magenta. (*) a.a. identique, (.) différent, (:) similaire

Comme on peut le voir sur la représentation schématique de la comparaison de séquences, les séquences protéiques de Dyn LL1 et Dyn LL2 sont très fortement similaires (93% d'identité). Ces protéines sont petites : 89 a.a.. Il y a six a.a. différents dans la partie N-ter de la protéine aux positions 2, 16, 21, 23, 29 et 41. Pour les positions 16 et 23, il n'y a que peu de différence ; les a.a. étant tous les deux des résidus acides E → D (acide glutamique et acide aspartique). En position 2, il y a des a.a. différents, mais la cystéine et la sérine restent des résidus non chargés polaires C → S. En position 21, S → A fait apparaître un changement d'un a.a. non chargé polaire (sérine) pour un résidu non chargé hydrophobe (alanine). En position 29, L → M la leucine et la méthionine sont tous deux des résidus non chargés apolaires. Par contre, pour la position 41 H → Y il y a une différence plus importante entre l'histidine : résidu chargé positivement aromatique et la tyrosine : résidu non chargé polaire contenant un cycle aromatique.

A la lumière de cet alignement des séquences protéiques, on constate qu'il y a très peu de différences entre les deux isoformes de la famille Dyn Lc8. En outre, les structures secondaires et tertiaires sont identiques.

IV.5 : GST LL1 mutants : production et purification des protéines recombinantes

Sur la base de cette homologie, j'ai analysé l'implication des a.a. différents entre les deux protéines dans l'interaction avec les capsides du VHB. Par mutagenèse dirigée j'ai remplacé les a.a. présents dans Dyn LL1 par ceux qui sont normalement dans Dyn LL2. Après mutagenèse, j'ai obtenu des simples mutants de Dyn LL1, vérifiés par séquençage. Les mutants de GST LL1 (appelé génériquement GST LL1* dans

les figures) ont été dénommés selon l'a.a. qui a été substitué (GST LL1 C2S, LL1 E16D, LL1 S21A, LL1 E23D, LL1 L29M, LL1 H41Y). Un autre mutant a été construit en remplaçant la sérine 88 par une arginine GST LL1 S88R. Cet a.a. est placé dans la partie C-ter de la protéine. Normalement, la sérine 88 lorsqu'elle est phosphorylée entraîne la dissociation du dimère de LL1. Toutes les protéines GST « LL1 mutants » ont été exprimées et purifiées suivant le protocole établi pour la GST LL1.

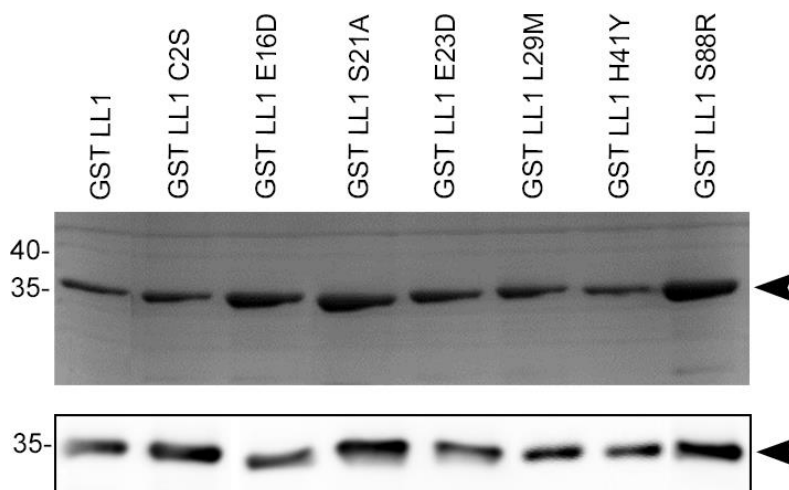


Figure 56 : Analyse des GST LL1* purifiées

Panneau supérieur : 0,8 µg de chaque protéine sur gel SDS PAGE 11% coloré au bleu de Coomassie. Panneau inférieur : WB révélaté par l'anticorps anti GST.

La figure 56 présente la pureté des protéines produites, vérifiée sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Peu de contaminants sont observés et il n'y a pas de GST seule. Les échantillons ont été préparés pour charger 0,8 µg à partir d'aliquotes congelées des protéines purifiées. Je n'observe que de légères variations de quantités de protéines après révélation au bleu de Coomassie. Ce résultat indique que les protéines ne semblent pas précipiter après décongélation. Sur le WB l'anticorps anti GST reconnaît toutes les protéines qui ont été purifiées. Aucun produit de dégradation ou de synthèse partielle n'a été observé.

IV.6 : Dimérisation des protéines mutantes

In vitro, les protéines GST LL1 et LL2 sont capables d'interagir avec DynIC (Figure 52). La dimérisation des Dyn LL1/Dyn LL2 implique la partie C-ter de la protéine qui permet la formation du sillon et *in fine* l'interaction avec la DynIC. Les mutations réalisées dans la partie N-ter ne devraient pas *a priori* empêcher cette interaction. C'est ce que j'ai voulu vérifier.

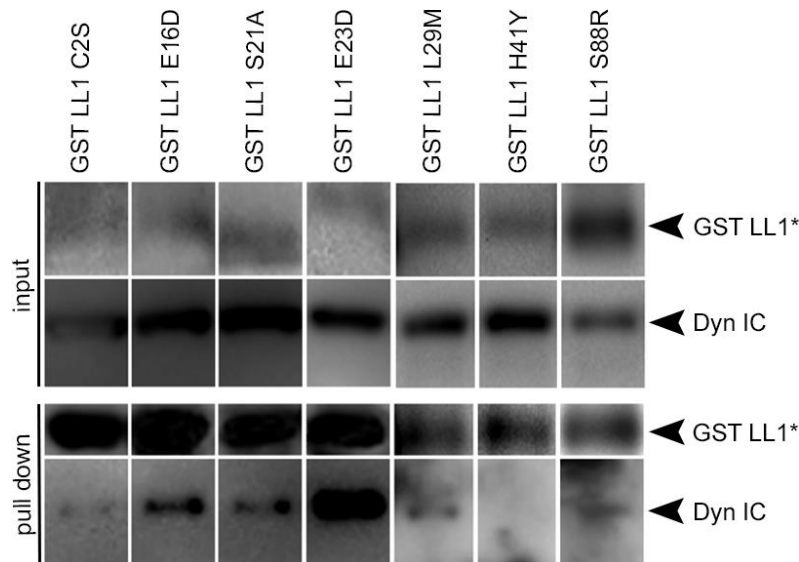


Figure 57 : Précipitation de la DynIC via les GST LL1* purifiées

Analyse par WB de la précipitation de la DynIC provenant du lysat cellulaire RRL par les GST LL1* (GST LL1 C2S, LL1 E16D, LL1 S21A, LL1 E23D, LL1 L29M, LL1 H41Y et LL1 S88R) en utilisant des billes glutathion sépharose. L'Ac anti GST est utilisé pour visualiser les chaînes de la dyneine et Ac anti DynIC pour révéler la DynIC. De haut en bas, input : 5% des protéines avant cosédimentation, pull down : protéines après coïmmunoprécipitation.

On constate que pour six des sept GST LL1* il y a coprécipitation de la DynIC. Il s'agit respectivement de GST LL1 C2S, GST LL1 E16D, LL1 S21A, LL1 E23D, LL1 L29M et GST LL1 S88R. Si l'on compare les intensités on constate que certaines chaînes coprécipitent peu la DynIC : il s'agit de GST LL1 C2S, LL1 L29M, et GST LL1 S88R. En effet, les résultats obtenus avec ces mutants sont très similaires à ceux obtenus avec GST LL1 (Figure 52). Deux autres mutants, GST LL1 E16D et LL1 S21A, coprécipitent plus efficacement la DynIC. En effet la quantité de protéine coprécipitée est supérieure. La précipitation de DynIC est quantitativement la plus forte avec le mutant LL1 E23D. Concernant la GST LL1 H41Y il n'y a pas coprécipitation de la DynIC. Bien que la Dyn LL2 (possédant une tyrosine en position 41) soit retrouvée dans le complexe de la dyneïne, l'expression hétérologue (en cellule HEK) d'un mutant de LL1 H41Y redirige l'interaction vers la myosine Va ce qui est en accord avec nos observations (Day et al 2004).

En conclusion, toutes les protéines purifiées à l'exception d'une seule (LL1 H41Y) sont capables de s'homodimériser et d'interagir avec la DynIC. Cependant leurs capacités d'interaction avec la DynIC sont différentes. Ces protéines peuvent donc former des complexes partiels de la dyneïne : un homodimère de DynLC pour deux DynIC.

IV.7 : Interactions avec la capside du VHB

J'ai utilisé toutes les GST LL1* purifiées dans des expériences de cosédimentation dont les résultats figurent ci-dessous, afin d'identifier les a.a. impliqués dans l'interaction entre la capside du VHB et la Dyn LL1. Deux types de capsides ont été utilisés : les capsides vides et les capsides ARN *E.coli*.

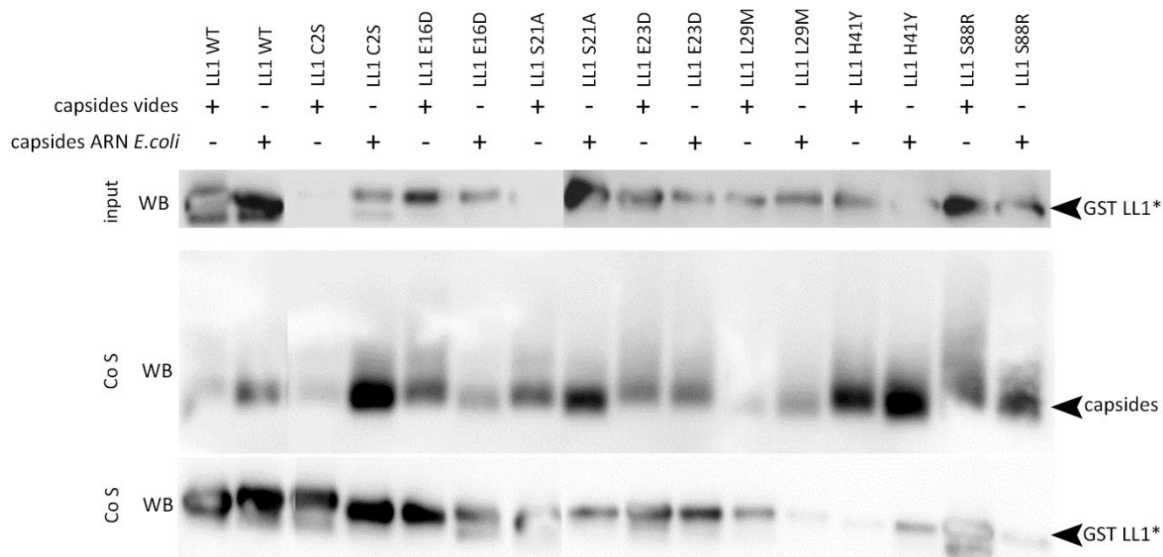


Figure 58 : Interactions entre les capsides vides ou ARN *E.coli* et GST LL1* par cosédimentation
 Analyse en WB de la cosédimentation des GST LL1* (GST LL1 C2S, LL1 E16D, LL1 S21A, LL1 E23D, LL1 L29M, LL1 H41Y et LL1 S88R) par les capsides vides et les capsides ARN *E.coli*. Ac anti HBc est utilisé pour les capsides et Ac anti GST pour les GST LL1*. De haut en bas, input : analyse des échantillons avant cosédimentation, Co S : analyse des « sédiments » d'une part pour les capsides et d'autre part pour les GST LL1* (3 expériences indépendantes).

Comme pour les cosédimentations réalisées avec la GST LL1, j'ai préalablement vérifié que dans nos conditions de sédimentation, les GST LL1* ne sont pas détectées après ultracentrifugation en l'absence de capside (résultats non montrés). On constate des cosédimentations avec les deux types de capsides pour le témoin GST LL1 (témoin positif) comme observé sur la figure 53. Néanmoins, l'intensité des bandes semble équivalente donc il ne semble pas y avoir de variations d'interaction de LL1 avec les capsides VHB (*E.coli* ou vides). GST LL1 C2S, GST LL1 E16D, GST LL1 S21A et GST LL1 E23D cosédimentent avec les deux types de capsides. Il ne semble pas y avoir de différence lors des cosédimentations. Les résidus en position 2, 16, 21 et 23 ne semblent donc pas importants dans l'interaction de LL1 avec les capsides. Pour les trois autres GST LL1*, les résultats sont variables en fonction du type de capside. En effet, on constate que pour GST LL1 L29M, il y a cosédimentation avec les capsides vides mais très atténuée avec les capsides ARN

E.coli. Pour GST LL1 H41Y, j'observe peu de cosédimentation avec les deux types de capsides. Si on compare les quantités de capsides récupérées après cosédimentation pour GST LL1 L29M et LL1 H41Y, on constate des différences. Mais comparativement à GST LL1, l'affinité entre les capsides et les deux mutants est diminuée.

Pour GST LL1 S88R, j'ai observé des différences de cosédimentation en fonction du type de capside utilisée. En effet, avec les capsides vides, il y a une cosédimentation de la protéine. La saturation du signal indique même une grande quantité de protéine. *A contrario* avec les capsides ARN *E.coli* on observe une nette diminution de la cosédimentation de GST LL1 S88R. Le mutant S88R, bien que complètement artificiel, cosédimente différemment en fonction du type de capside.

Bien que l'aspect quantitatif ne soit pas possible sur ces expériences en raison de la quantité de capside variable obtenue après ultracentrifugation, on peut néanmoins dire que les résidus en position 29 et 41 semblent importants lors de l'interaction avec les capsides. Sur les reconstructions tridimensionnelles du dimère de LL1 en considérant le domaine d'interaction de DynLL1 avec la DynIC (sillon coloré en rouge sur la figure 59) on constate que cinq a.a. sur les six sont localisés à la surface du dimère. Les deux a.a. en position 29 et 41, qui semblent importants dans l'interaction avec les capsides, sont localisés à la surface du complexe Dyn LL1/ DynIC. Ces a.a. seraient accessibles pour des interactions avec les capsides (Figure 59).

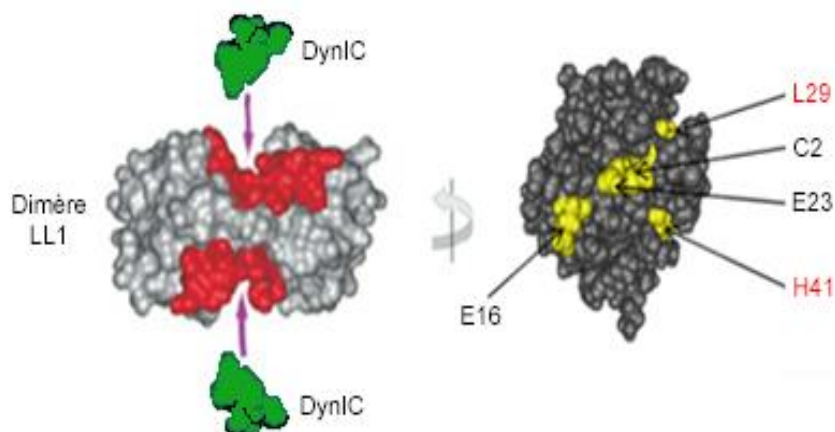


Figure 59 : Structure du dimère de LL1 en vue latérale et de face

A partir des structures 3D du dimère de LL1, à gauche est représentée une vue latérale du dimère avec la localisation du sillon (en rouge) qui est le domaine d'interaction des DynIC (en vert). A droite, après rotation du dimère de 90 degré, sont colorés (en jaune) les a.a. différents de LL2. En écriture rouge sont identifiés la leucine en position 29 et l'histidine en position 41.

IV.8 : Formation de l'hétéro complexe dynéine-capsides

Les GST dynéines purifiées sont capables d'interagir avec la DynIC. Parmi ces protéines, la GST LL1 interagit avec la capsid. Si Dyn LL1 est le médiateur de l'interaction entre la capsid et le complexe de la dynéine, est-ce que la capsid, DynLL1 et DynIC peuvent former un complexe ?

IV.8.1 : Clivage de GST LL1, purification de DynIC 295

Comme décrit dans la partie IV.1, la GST DynIC entière est difficile à purifier. En effet, la protéine surexprimée est insoluble. Le peu de protéine purifiée à partir de la fraction soluble correspond à des produits de synthèse partielle de la protéine.

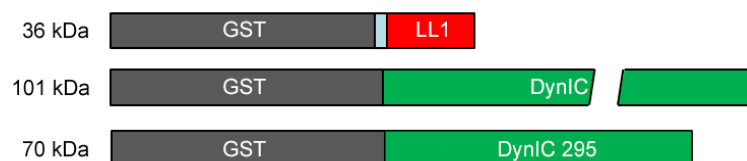


Figure 60 : Schéma protéines recombinantes GST LL1 et GST DynIC 295

Représentation schématique des protéines recombinantes, en gris le tag GST, en rouge LL1 et en vert DynIC (forme entière) et DynIC 295 (forme tronquée). En bleu figure le site de clivage par la protéase (factor Xa).

Les domaines d'interaction de la DynIC avec les chaînes légères sont localisés dans la partie N-ter. J'ai donc construit une forme tronquée de la protéine ne comportant que les 295 premiers a.a. contenant ces domaines (Figure 10) (Mok et al 2001; Susalka et al 2002; Nyarko and Barbar 2011). Pour éviter la dimérisation due au tag

GST, un site de clivage Ile-(Glu ou Asp)-Gly-Arg par le facteur Xa est intercalé entre le tag GST et la protéine LL1. Après son immobilisation sur billes de glutathion sépharose, la GST-LL1 a été incubée en présence de factor Xa et la protéine LL1 a été récupérée.

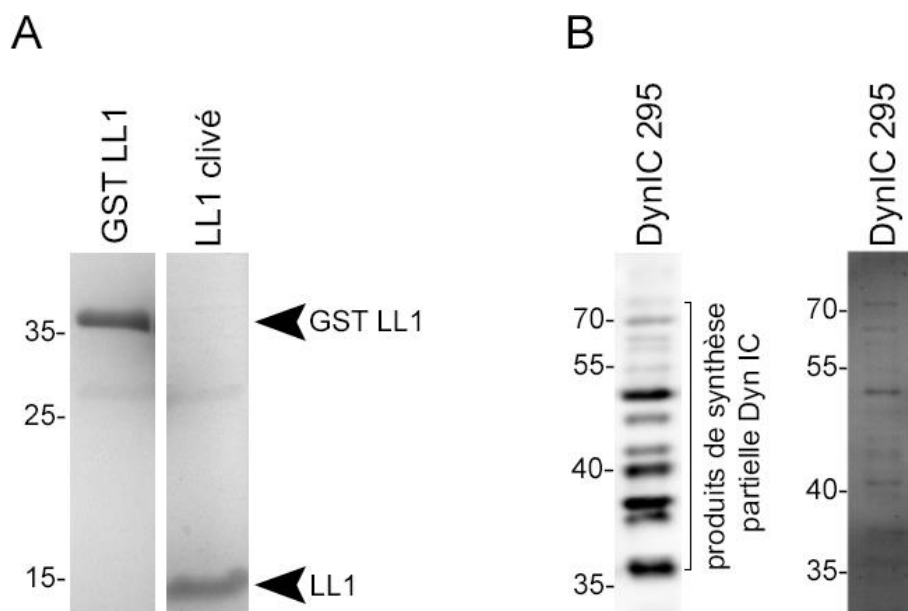


Figure 61 : Clivage de GST LL1 et purification de GST DynIC 295

A : Analyse sur SDS PAGE (gel 15%) coloré au bleu de Coomassie de GST LL1 non clivé et GST LL1 après clivage. B : Analyse en WB (révélé par Ac anti GST) et coloration au bleu de Coomassie des protéines purifiées à partir de la fraction soluble d'un lysat de bactérie BL21/DE3 surexprimant DynIC 295.

Comme on peut le voir sur la figure 61, après clivage de la GST LL1 par le facteur Xa on observe en dessous de 15Kda qui correspond à LL1 clivé. J'ai constaté l'absence de contamination par la GST LL1 montrant une bonne efficacité de clivage.

La construction DynIC 295 permet d'exprimer une protéine tronquée qui est purifiée plus facilement que la forme entière. La figure 61B montre que la DynIC 295 purifiée est constituée de bandes de tailles différentes comprises entre 35 kDa et 70 kDa (protéine tronquée entière). Les bandes majoritaires (36 kDa, 38 kDa, 40 kDa et 50 kDa) sont des produits de synthèse partielle ou de dégradation. Le tag GST étant localisé en partie N-ter, il y a une majorité de protéines qui sont reconnues par l'Ac anti GST. La taille théorique minimale de GST DynIC nécessaire à l'interaction avec Dyn LL1 est de 41 kDa, parmi les protéines purifiées, la majorité contient le domaine d'interaction avec LL1.

IV.8.2 : Formation d'un hétérocomplexe : capsides + LL1 + DynIC 295

Afin de déterminer si LL1, Dyn IC et les capsides VHB étaient capables de former des complexes, j'ai réalisé des expériences de cosédimentation avec la LL1 clivée, la DynIC 295 purifiée et les capsides vides.

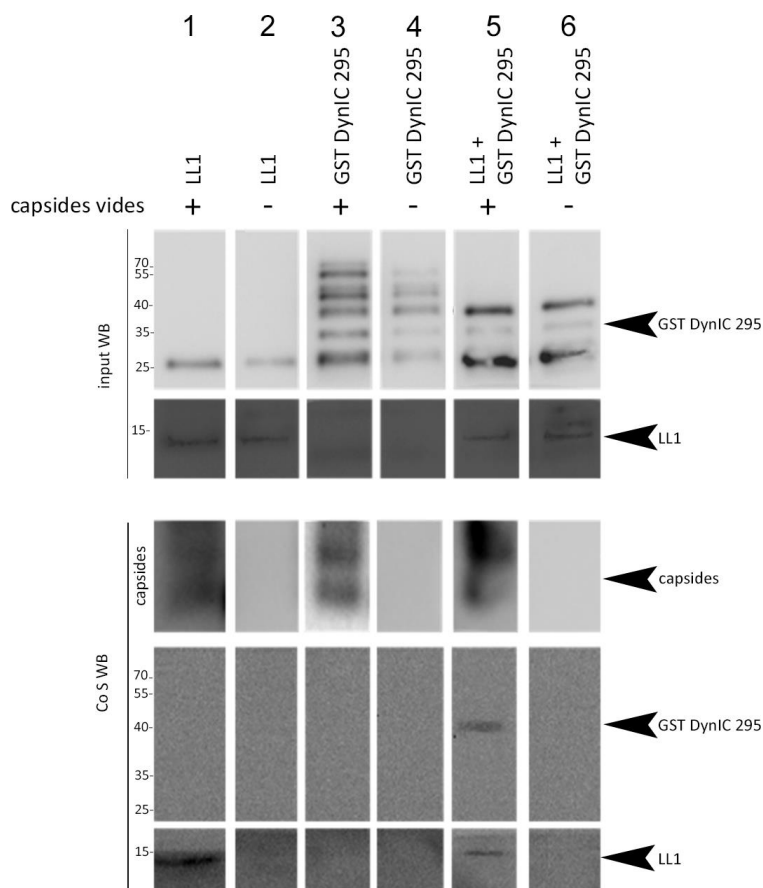


Figure 62 : Formation d'un hétérocomplexe capside / DynLL1 / DynIC 295

Analyse en WB (révélé avec Ac anti HBC, Ac anti GST et Ac anti LL1/2) des sédiments obtenus après ultracentrifugation de capsides vides avec LL1 clivée et GST DynIC 295. De haut en bas, input : échantillons avant cosédimentation (révélé avec Ac anti GST et avec Ac anti LL1/2). Co S : analyse des « sédiments » (révélé avec Ac anti HBC ou Ac anti GST ou avec Ac anti LL1/2). Images représentatives des 3 expériences indépendantes.

La figure 62 présente les résultats obtenus par cosédimentation des capsides vides avec LL1 clivée seule, GST DynIC 295 seule et LL1 clivée en présence de GST DynIC 295. Pour vérifier que les protéines purifiées ne sont pas sédimentées pendant la centrifugation, elles ont été centrifugées sans capsides vides (piste 2, 4 et 6). Comme on peut le voir sur la figure de gauche à droite, il y a cosédimentation de LL1 uniquement en présence de capsides (piste 1). La DynIC 295 seule ne cosédimente pas que ce soit avec ou sans capsides (piste 3 et 4). Dans les piste 3 et 4, il semble y avoir moins de DynIC 295 dans la piste 4. Lorsque les capsides sont

incubées avec LL1 clivée et la GST DynIC 295, on constate que LL1 et GST DynIC cosédimentent avec la capsid.

Au niveau des WB anti GST des inputs dans les pistes 1 et 2 des bandes à 25kDa sont visibles. C'est peut être une contamination par de la GST issue du clivage de GST LL1, même si cela n'avait pas été détecté sur la figure 61. De manière surprenante, dans les pistes 5 et 6 lorsque LL1 et GST DynIC 295 sont mélangées le profil du WB input anti GST est différent.

Néanmoins, ces résultats indiquent clairement que la capsid, LL1 et DynIC 295 interagissent pour former un hétérocomplexe. La formation de ce complexe est compatible avec le transport de la capsid par le complexe de la dynéine. En effet si les capsides du VHB peuvent interagir avec la dynéine assemblée et fonctionnelle, on peut supposer que les capsides sont transportées sur les Mt jusqu'à la périphérie nucléaire.

V : LL1 médiateur de l'interaction dynéine/capsides : conséquences *in vitro* et *in cellulo*

Pour tester si l'interaction entre les capsides et LL1 est essentielle pour le transport cytoplasmique par les Mt j'ai utilisé deux approches différentes :

- *In vitro* en quantifiant la colocalisation des capsides et des Mt polymérisés en présence et en absence de GST LL1.
- *In cellulo* sur les coupes d'ovocytes de xénope microinjectés en analysant notamment l'effet de la coïnjection de la GST LL1 sur l'abondance relative de capsides vides identifiables aux NPC.

V.1 : Compétition *in vitro* (colocalisation de Mt / capsides)

Précédemment en incubant des capsides en présence de lysat cellulaire sur des Mt polymérisés *in vitro*, des colocalisations de capsides avec les Mt ont été observées et quantifiées. Dans le même type d'expériences, j'ai ajouté au lysat cellulaire de la GST LL1 afin de déterminer si un excès de LL1 modifiait la liaison des capsides avec les Mt. Trois résultats sont envisageables : 1) aucun effet, car le système est déjà saturé, le RRL ayant par lui-même fourni toutes les chaînes de LL1 nécessaires. 2) La GST LL1 soluble rajouté entre en compétition avec la LL1 endogène ou 3) LL1 est limitant dans le RRL et donc l'addition de LL1 provoque une augmentation du taux de

liaison. Les résultats des quantifications effectuées sont présentés dans la figure 63 ci-dessous :

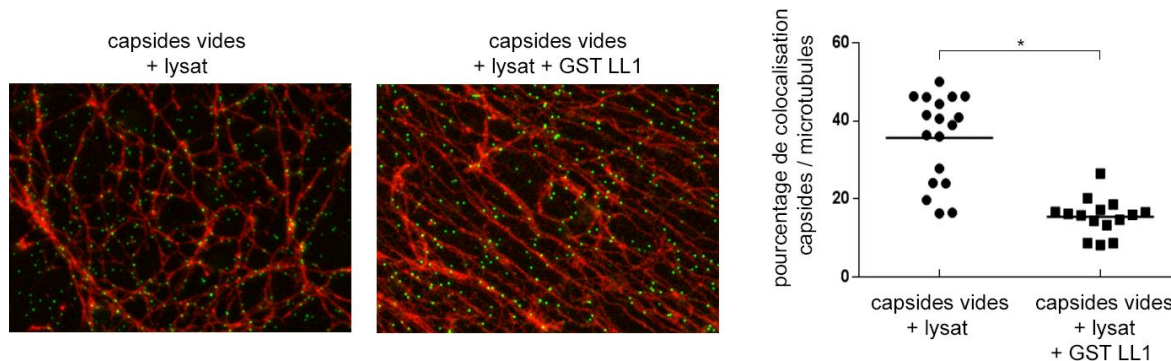


Figure 63 : Colocalisations capsides vides / Mt en présence ou non de GST LL1

Images illustratives des expériences de colocalisation capside Mt avec du lysat cellulaire en présence ou en absence de GST LL1. Les différents pourcentages de colocalisation sont représentés en nuage de point. Chaque rond et carré noir représentent le pourcentage de colocalisation sur une image, la barre représentant la moyenne des quantifications effectuées. (* : T test)(cumul de deux expériences indépendantes).

Lorsque la GST LL1 est ajoutée lors de l'incubation des capsides et du lysat cellulaire avec les Mt, on constate que la colocalisation moyenne est à environ 15% soit une réduction de 20%. Cette réduction est significative (Figure 63).

GST LL1 est capable de former un complexe partiel avec DynIC *in vitro*. On peut penser que la GST-LL1 remplace la LL1 endogène. L'hypothèse 2 expliquerait l'inhibition partielle de la colocalisation.

Ces résultats indiquent que les GST LL1 ajoutées en excès lors de ces expériences agissent comme des compétiteurs et diminuent l'interaction capsides / Mt. La majorité des protéines GST LL1 concurrencerait le complexe de la dynéine et empêcherait les capsides de colocaliser avec les Mt. Au vu des résultats d'interaction avec la DynIC (Figure 52), une minorité de GST LL1 semble pouvoir interagir avec la DynIC et cette minorité pourrait donc potentiellement remplacer la Dyn LL1 endogène. Ces résultats indiquent que dans la solution contenant la GST LL1 on dispose de plusieurs « populations » de protéine, la majorité d'entre elles interagissent avec la capside et une minorité est capable d'interagir avec la DynIC et la capside en même temps.

V.2 : Compétition *in vivo* (microinjection d'ovocytes de *Xenopus laevis*)

V.2.1 : Quantification des NPC et capsides

Lors des injections dans les ovocytes de xénope j'ai également réalisé des co injections de capsides vides avec de la GST LL1 (ratio 1/1000). Comme pour les expériences précédentes, j'ai choisi un temps précoce de 15 min et un temps tardif de 60 min. De façon analogue aux analyses précédentes, j'ai quantifié le nombre de capsides identifiées aux NPC. Les résultats des quantifications sont consignés dans le tableau 16 ci-dessous :

		15 min	60 min
capsides vides	NPC totaux	n=99	n=148
	NPC contenant capsides	n=31	n=76
	capsides	n=58	n=195
	% NPC contenant capsides	31%	51%
	n capsides/NPC	1,87	2,57
		15 min	60 min
capsides vides + GST LL1	NPC totaux	n=79	n=88
	NPC contenant capsides	n=3	n=14
	capsides	n=3	n=18
	% NPC contenant capsides	5%	16%
	n capsides/NPC	1	1,28

Tableau 16 : Quantifications des NPC et des capsides dans les ovocytes injectés avec des capsides vides avec et sans GST LL1

Quantification des capsides vides 15 ou 60 minutes après injection dans des ovocytes de xénope. Le nombre de NPC (totaux et contenant des capsides), le nombre de capsides, le pourcentage de NPC contenant des capsides et le nombre moyen de capside par NPC sont présentés.

J'ai analysé pour les ovocytes injectés avec les capsides vides et GST LL1 une vingtaine de clichés. A 15 min, j'ai identifié 3 capsides vides dans 3 NPC différents pour un total de 79 NPC analysés. A 60 min, j'ai identifié 18 capsides vides dans 14 NPC différents pour un nombre total de 88 NPC identifiés.

L'addition de GST LL1 lors des injections semble diminuer le nombre de capsides identifiées aux NPC. Cela signifie que l'ajout de cette protéine recombinante en excès inhibe partiellement le transport des capsides jusqu'aux NPCs et agit bien comme compétiteur.

V.2.2 : Capsides et complexe du pore nucléaire (NPC)

Les résultats du pourcentage de NPC contenant au moins une capsid e et du nombre moyen de capsid e par NPC figurent dans les deux histogrammes ci-dessous

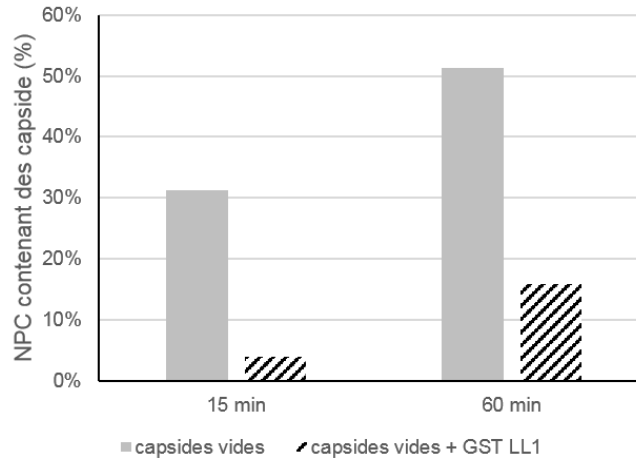


Figure 64 : Pourcentage de NPC contenant au moins une capsid e vide

Représentation en histogramme des données figurant dans le tableau 16, calcul de la quantité de NPC contenant des capsid es par rapport au nombre total de NPC. Gris capsid es vides, hachuré capsid es vides en présence de GST LL1. Test statistique Fisher, pvalue=0,0824.

Sur l'histogramme de la figure 64, j'ai calculé le pourcentage de NPC contenant au moins une capsid e. Dans les deux conditions le même nombre de capsid es vides a été injecté (5×10^8 capsid es par ovocyte). A 15 min j'ai calculé que 31% des NPC analysés contenaient au moins une capsid e vide. Ce pourcentage est réduit à moins de 5% lorsque les capsid es vides et GST LL1 sont coinjectés. J'ai également constaté une différence au temps tardif : 60 min. En effet, quand l'injection est effectuée avec des capsid es vides uniquement, 50 % des NPC analysés contiennent au moins une capsid e. Lors de la coïnj ection en présence de LL1 le taux de NPC contenant au moins une capsid e chute à 15% ! Ainsi, la coïnj ection de GST LL1 diminue le nombre de capsid es vides transportées jusqu'au noyau. Malgré la réduction observée en présence de GST LL1, on observe une augmentation du nombre de capsid es identifiables aux NPCs en fonction du temps, donc il n'y pas d'inhibition complète du transport des capsid es vides dans le cytoplasme.

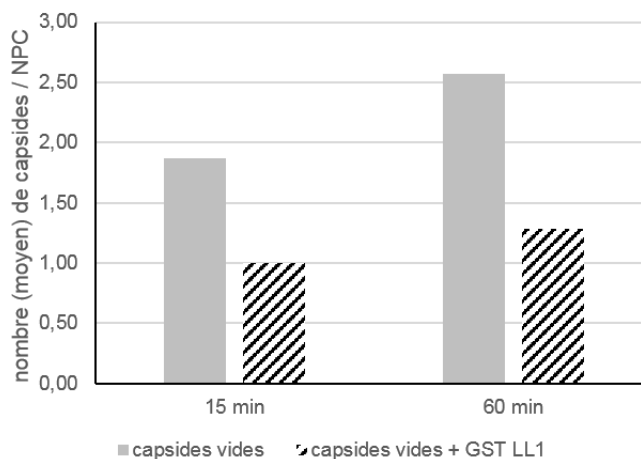


Figure 65 : Histogramme du nombre moyen de capsides par NPC

A partir des quantifications figurant dans le tableau 16, en ne considérant que les NPC contenant des capsides : calcul du nombre moyen de capside par NPC. Gris capsides vides, hachuré capsides vides en présence de GST LL1.

Au niveau du nombre moyen de capside par NPC on constate également des différences aux deux temps : à 15 minutes, j'ai observé une réduction d'un facteur 2 du nombre de capsides par NPC (1,87 capsides par NPC lors des injections et 1 capsides par NPC lors des coïnjections). A 60 min, j'ai également observé une réduction d'un facteur 2 du nombre moyen de capsides par NPC (2,57 lors des injections et 1,28 lors des coïnjections). Si on considère l'augmentation au cours du temps, on constate que le nombre moyen de capsides est augmenté de 0,7 entre 15 et 60 minutes lors des injections et de 0,28 seulement lors des coïnjections.

Pour les deux temps (précoce et tardif) j'ai observé une très nette diminution du pourcentage de NPC contenant des capsides. La coïnjection de GST LL1 n'inhibe pas complètement le transport des capsides jusqu'au NPC puisque j'ai pu en identifier. Cependant on constate que le transport est beaucoup moins efficace. L'ajout de GST-LL1 perturbe le transport des capsides, on peut donc penser que la GST-LL1 est soluble et sature les sites d'interaction avec les complexes de la dynéine endogène ce qui explique l'inhibition partielle observée.

VI : L'énigme du détachement des Mt les cellules énuclées nouvel outil d'analyse ?

Jusqu'ici le transport des capsides a été exploré en se concentrant sur deux mécanismes distincts : le transport *via* le réseau de Mt (transport cytoplasmique) d'une part, que j'ai tenté d'éclaircir avec les résultats présentés ci-dessus, et le

transport au niveau de l'enveloppe nucléaire (transport nucléaire) d'autre part qui a également été abordé puisque ce mécanisme implique la localisation des capsides aux NPC.

Le mécanisme de détachement des cargos des Mt à la périphérie nucléaire est complètement inconnu non seulement pour les capsides du VHB mais aussi pour les autres virus et même les protéines cellulaires (cargos). C'est une étape qui doit être rapide pour permettre le recyclage des complexes moteurs. Pour les virus, cette étape n'est pas synchrone car certaines particules virales sont localisées à d'autres endroits dans les cellules. Il s'avère donc ardu de se focaliser sur ce mécanisme. Les cellules sans noyau (cellules énucléées) devraient bloquer physiquement les virus juste avant l'étape du transport nucléaire, sauf si un facteur nucléaire est nécessaire au détachement des Mt. Dans ce dernier cas, l'impact du noyau sur le détachement des Mt est également analysé.

Basé sur les protocoles de Bailey et Lee, l'incubation des cellules avec de la cytochalasine B induit la dépolymérisation de l'actine puis sous l'action de la force centrifuge le noyau est « expulsé » des cellules (Bailey et al 2003; Lee et al 2012).

VI.1 : Caractérisation des cellules énucléées

Les tests d'énucléation ont été réalisés sur les lignées HuH7 (cellules d'origine hépatique qui permettent la réplication du VHB), U2OS (cellules ayant pour origine un ostéosarcome et utilisées pour les microinjections), HeLa (cellules provenant d'un cancer du col de l'utérus utilisées dans le laboratoire). Lors de la centrifugation, des cellules sont perdues mais il reste suffisamment de cellules adhérentes au fond de la boîte (estimation visuelle 40-50%). Juste après la centrifugation les cellules ont une morphologie étirée qui se résorbe lors de leur incubation à 37°C. Ce taux de survie des cellules permet de disposer de temps pour réaliser des expériences. Lors des marquages en IF, j'ai également calculé un pourcentage de cellules énucléées pour chacune des lignées (Figure 66).

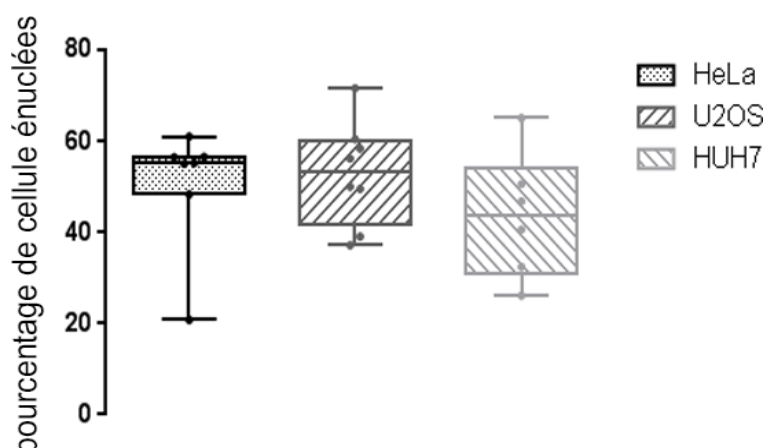


Figure 66 : Pourcentage de cellules énucléées à 1h en fonction des lignées cellulaires

Représentation en histogramme du pourcentage de cellules énucléées de 3 lignées cellulaires HeLa, U2OS et HuH7. Les quantifications ont été réalisées par numération manuelle lors de l'observation des acquisitions effectuées en microscopie à épifluorescence. Les cellules marquées, soit actine soit Mt, sont identifiées. La présence du marquage Dapi dans les cellules permet d'estimer le nombre de cellules énucléées (absence de Dapi). Entre 6 et 8 quantifications indépendantes ont été accomplies pour chaque lignée. Représentation graphique en boîte à moustache, toutes les quantifications sont représentées par les points, les extrémités (tiret noir) représentent le minimum et le maximum, les valeurs indiquées par les boîtes représentent 25% percentile et 75% percentile.

Les points sur l'histogramme de la figure 66 représentent les valeurs de pourcentage de cellule énucléées quantifiées dans des expériences indépendantes. Toutes lignées confondues, le pourcentage de cellules énucléées obtenues est compris entre 20% et 70%. La moyenne du pourcentage d'énucléation est entre 40 et 50% pour les trois lignées utilisées.

Pour caractériser les cellules énucléées j'ai choisi de marquer le cytosquelette et certains compartiments cellulaires pour analyser l'impact de l'énucléation sur la structure de la cellule ainsi que les protéines ayant un intérêt dans l'investigation du mécanisme de dissociation de cargo des Mt comme les protéines du transport cytoplasmique (dynéine) et du transport nucléaire (importines).

Une partie des observations ont été faites sur les trois lignées cellulaires utilisées dans les énucléations. Seuls les résultats des IF effectués sur les cellules U2OS sont présentés dans la figure 67.

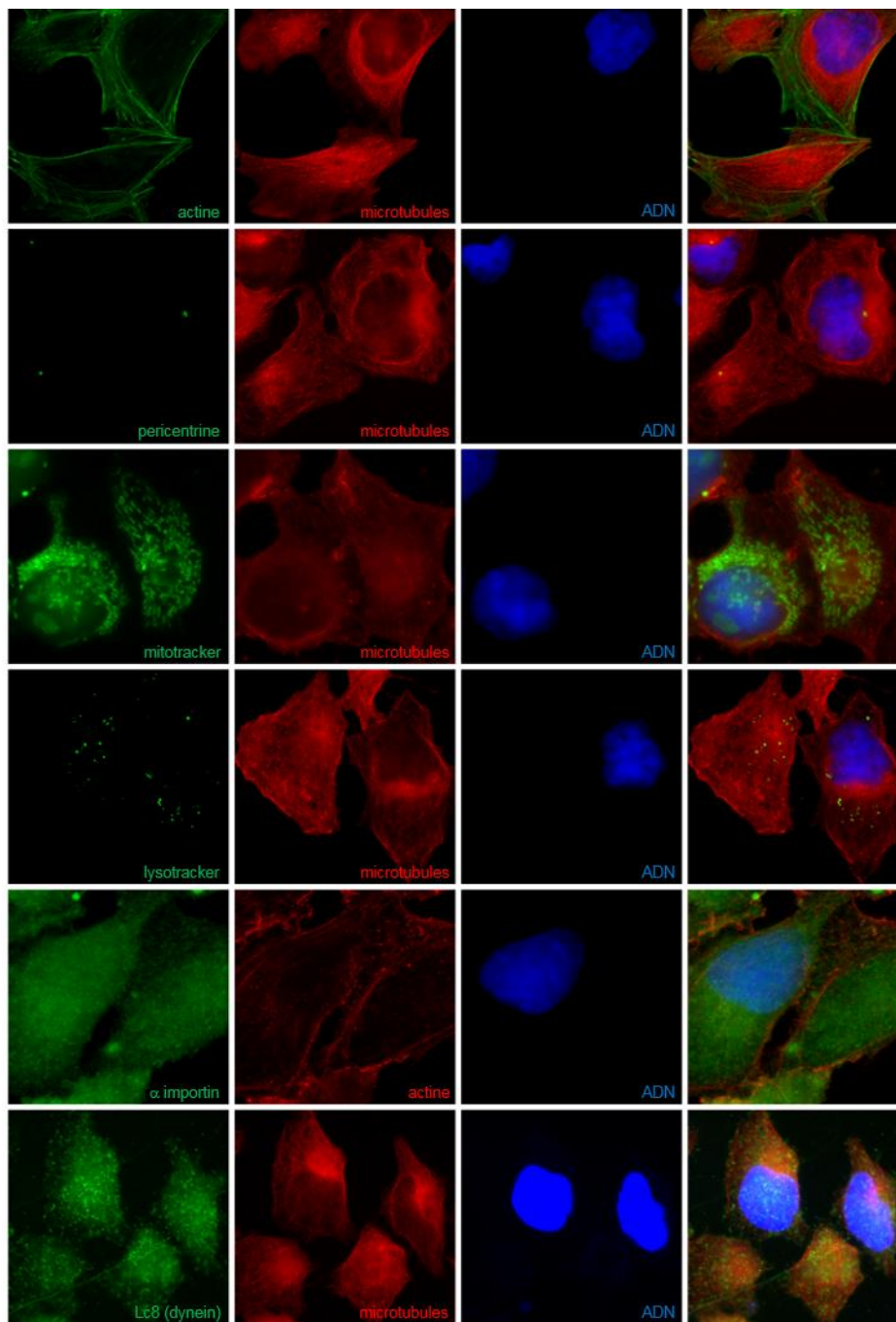


Figure 67 : Immunofluorescence des U2OS énucléées

1 à 2h après leur énucléation, les cellules ont été fixées par du PFA 4% puis marquées en utilisant des anticorps ou des trackers contre différentes cibles : actine : phalloïdine, Mt : Ac anti tubuline, pericentrine : Ac anti péricentrine, mitochondrie : MitoTracker®, lysosome ; LysoTracker®, importine alpha : Ac anti importine alpha, dynéine : Ac anti Lc8, ADN : Dapi. Acquisition réalisée au microscope à épifluorescence expérience réalisé 1h après énucléation pour les marquages anticorps, plus tardivement (environs 2 heures) pour les marquages LysoTracker® et MitoTracker®.

En suivant l'actine on peut observer l'impact de la cytochalasine B et de l'énucléation sur le réseau d'actine. Après énucléation, j'observe des filaments d'actine aussi bien dans les cellules avec noyau que sans. Les filaments d'actine se sont reformés après l'action de la cytochalasine B et l'énucléation. L'action de la cytochalasine B est donc

transitoire. Les fibres de stress sont caractéristiques et visibles dans le corps cellulaire. Ici, tant pour les cellules avec noyau que les cellules sans noyau, le marquage de l'actine est périmembranaire et je n'ai pas observé de fibres de stress. On retrouve un marquage typique des cellules.

Les marquages des Mt sont similaires entre les cellules avec et sans noyau donc l'énucléation n'a pas modifié le réseau de Mt. J'ai observé des Mt dans l'ensemble de la cellule. Dans les deux types de cellules on distingue une région plus dense en Mt ce qui suggère que la polarisation du réseau de Mt est maintenu. Le marquage de la péricentrine a permis d'identifier le MTOC dans les cellules avec et sans noyau. Dans les cellules énucléées, cette structure est localisée dans la région dense en Mt, comme dans les cellules avec noyaux.

La conservation des organites tels que les mitochondries et les lysosomes sont des témoins de l'état général des cellules. Les organites tels que les mitochondries sont présents dans les cellules avec et sans noyau. Le concept de mitochondrie en tant qu'organite est aujourd'hui plutôt envisagé comme un réseau mitochondrial avec une dynamique et un équilibre entre la fusion des mitochondries, où l'on observera un vrai réseau mitochondrial, et la fission (ou fragmentation) où l'on observe des mitochondries bien individualisées. En comparant les réseaux mitochondriaux des cellules avec et sans noyau, il semblerait que le réseau soit plus fragmenté que la normale pour les cellules énucléées, comme cela s'observe dans des situations de stress, en réponse à certains antiviraux et dans certaines pathologies. Le marquage avec le MitoTracker® étant effectué sur cellules vivantes cela indique que la réaction chimique (estérification), permettant la rétention du tracker dans les mitochondries, est fonctionnelle dans les cellules sans noyau.

Les lysosomes marqués *via* le LysoTracker® sont également présents dans les deux types de cellules. Le marquage est également réalisé sur cellules vivantes ce qui indique que le pH est toujours acide dans les vésicules lysosomales.

Au-delà des résultats propres aux organites observés nous pouvons supposer que malgré l'expulsion du noyau par centrifugation les structures cellulaires plus petites telles que les mitochondries et les lysosomes sont conservées. On peut supposer qu'il en est de même pour d'autres compartiments, tels que l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique.

Des protéines du transport cytoplasmique (dynéine) et du transport nucléaire (importine alpha) ont également été analysées. Le marquage de Lc8 dans les cellules avec noyau est ponctiforme et localisé dans le cytoplasme et le noyau. Ce marquage ponctiforme est conservé dans les cellules sans noyau. Le marquage de l'importine alpha montre une localisation diffuse dans le cytoplasme et dans le noyau. Le marquage diffus dans le cytoplasme est retrouvé aussi dans les cellules sans noyau. J'ai toutefois observé que sur des temps plus longs (5h et 16h après énucléation) il y a eu une accumulation / agrégation d'importines alpha au centre de la cellule (à l'ancien emplacement du noyau).

Malgré le stress que représente l'énucléation des cellules par centrifugation, j'ai constaté que de nombreuses structures du cytosquelette de la cellule sont conservées. Dans un délai court après l'énucléation (1h à 2h) certaines activités métaboliques dans les cellules sans noyaux sont actives (MitoTracker® et LysoTracker®). Je ne les ai pas testées à des temps plus tardifs (5h ou 16h).

Ces cellules énucléées semblent être un outil de choix pour analyser des mécanismes indépendants du noyau en microscopie. Que ce soit pour les cellules HuH7, U2OS et HeLa, les pourcentages d'énucléation sont similaires aux alentours de 50%. Cela permet de disposer sur une même boîte de cellules avec et sans noyau. Des comparatifs entre les deux types de cellules sont possibles lors d'analyse en IF. Cependant, au cours du temps une partie des cellules énucléées adoptent une morphologie étirée. J'ai appelé cette morphologie « colibri like » en référence au phénotype des cellules épithéliales gastriques induit par CagA (toxine produite par *H.pylori*) (Saadat et al 2007).

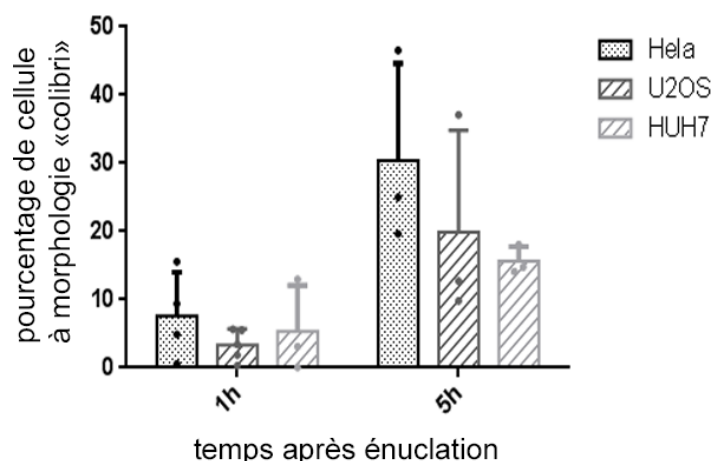


Figure 68 : Pourcentage de cellules énucléées à morphologie « colibri like »

Représentation en histogramme du pourcentage de cellules énucléées ayant une morphologie « colibri like » de 3 lignées cellulaires HeLa, U2OS et HuH7. Les quantifications ont été réalisées par numération manuelle *via* l'observation des acquisitions effectuées en microscopie à épifluorescence. Quantification réalisée sur l'aspect morphologique des cellules. Il y a entre 3 et 5 énucléations indépendantes par lignée et par temps (les points représentent les valeurs des quantifications avec la moyenne et l'écart type).

Les quantifications de ce phénotype « colibri like » des cellules énucléées ont été réalisées 1h et 5h après énucléation et sont représentées sur l'histogramme de la figure 68. A 1h, le pourcentage de cellules énucléées présentant une morphologie « colibri like » est inférieur à 10% pour toutes les lignées cellulaires. Ce pourcentage augmente à 5h post énucléation pour atteindre 15 et 30%. Cela signifie qu'au cours du temps une population croissante de cellules sans noyau perdent de l'adhérence et deviennent morphologiquement incompatible avec des microinjections ou des analyses en microscopie. On peut supposer que ce changement de morphologie est induit par une perte de la polarité cellulaire.

VI.2 : Infection des cellules énucléées

Des expériences préliminaires ont été réalisées avec l'adénovirus qui infecte les U2OS.

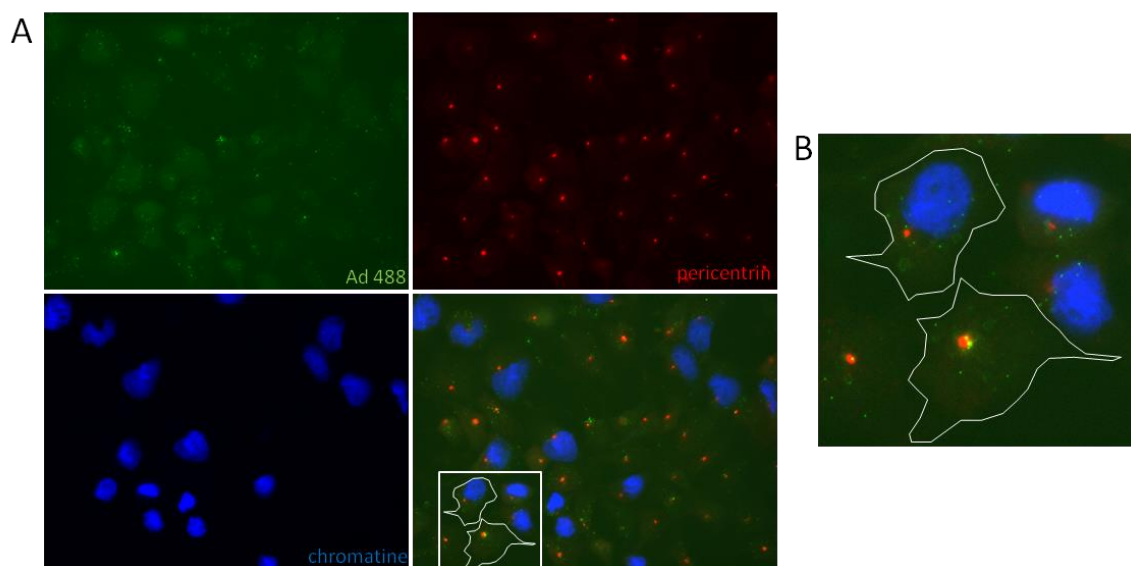


Figure 69 : Immunofluorescence des U2OS énucléées et infectées avec l'adénovirus

Après énucléation pendant 1 heure à 37°C ; les cellules ont été infectés avec de l'adénovirus marqué à l'Alexa 488 (MOI 1000). Après incubation avec le virus, le milieu est changé (T0 infection). 1h après, les cellules sont fixé en PFA 4% pour immunofluorescence. Les virus sont visualisable en vert (Alexa 488) la péricentrine en rouge et l'ADN en bleu.

Lors de ces essais j'ai observé des virus à l'intérieure des cellules avec et sans noyau (Figure 69A). Sur la majorité des cellules énucléées j'ai observé une accumulation des adénovirus marqués à l'Alexa autour du MTOC (Figure 69B). Les U2OS énucléées sont permissives à l'infection par l'adénovirus. Les virus sont transportés jusqu'au MTOC Cette accumulation avait déjà été observée par le groupe de Bailey (Bailey et al 2003). Ainsi, les cellules sans noyau peuvent a priori être utilisées pour appréhender le mécanisme de libération des cargos à partir des Mt.

Conclusions discussion

Durant ce projet j'ai utilisé trois types de capsides :

Des capsides dérivées d'une production de virions relarguées dans le surnageant de culture de cellules HepG2.2.15. Ces capsides sont obtenues par centrifugation et après extraction des protéines de surface. En effet Rabe *et al* ont montré que le traitement avec un détergent non ionique supprime pratiquement toutes les protéines de surface HBs (Rabe et al 2009). La contamination de ces préparations de capsides matures par ce que l'on appelle des "naked capsids" peut être exclue au vue des conditions de culture utilisées (1% SVF). La proportion de ces capsides dans le surnageant est en effet très faible. Ces capsides matures, lorsqu'elles sont lipofectées dans des cellules hépatiques (HuH7), induisent une infection productive: formation d'ADNccc, production de particules virales relarguées dans le surnageant (Rabe et al 2006).

Comme équivalent des capsides immatures (capsides intracellulaires) j'ai utilisé des capsides exprimées chez *E.coli* contenant de l'ARN bactérien. Ces capsides sont produites et purifiées par nos collaborateurs. Par cryo électro microscopie, ces capsides ne sont pas différentiable des capsides immatures. La partie C-ter non structurée n'est pas directement observable mais est localisée à l'intérieur des capsides (Zlotnick et al 1997; Rabe et al 2003).

Les préparations des capsides matures contiennent des quantités non négligeables de protéines contaminantes (provenant le plus souvent du sérum ajouté dans le milieu de culture). Après purification, nous ne disposons que de quelques microgrammes de capsides matures ce qui rend les expériences biochimiques compliquées. Leur concentration est insuffisante pour des microinjections dans les cellules U2OS utilisées dans cette étude. Pour s'affranchir de ce problème, et pouvoir réaliser ces expériences, j'ai utilisé des capsides vides préparées à partir de capsides exprimées chez *E.coli* en utilisant la RNaseA qui digère l'ARN bactérien encapsidé.

Des capsides vides ont également été observées *in vivo* dans le sérum et le foie chez des patients infectés (Miller et al 1984; Ning et al 2011). Ces capsides vides *in*

vivo ne peuvent pas être enveloppées (Gerelsaikhan et al 1996) et ne sont pas impliquées dans la propagation du virus.

La digestion de l'ARN bactérien nécessite un désassemblage au moins partiel de la capsidie suivis d'un réassemblage. Des observations en microscopie électronique, après marquage négatif, ont montré que ces capsides vides reformées sont morphologiquement similaires aux capsides contenant de l'ARN (Kann and Gerlich 1994). L'existence physiologique des capsides vides a initié des études structurales qui ont montrées que ces capsides vides bien que morphologiquement similaires aux capsides contenant de l'ARN, celles-ci présentent une exposition du domaine C-ter (ou CTD) à la surface des capsides comme chez les capsides matures (Kann and Gerlich 1994; Chen et al 2011). Une étude biophysique a même permis d'évaluer la probabilité d'exposition des différents a.a. composant la partie C-ter. Lorsque les capsides sont vides les probabilités d'exposition sont beaucoup plus élevées que les capsides contenant de l'ARN (Kim and Wu 2014).

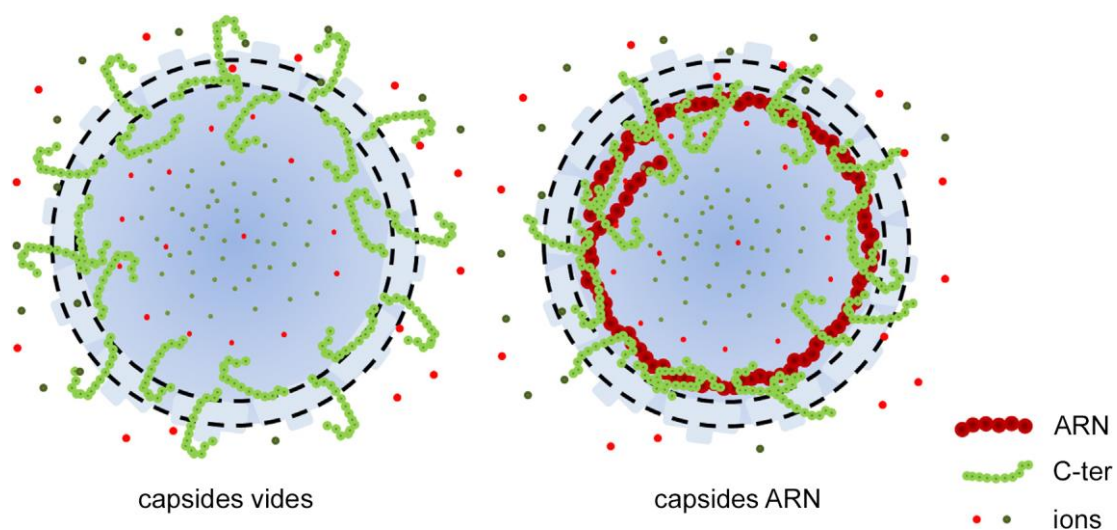


Figure 70 : Localisation des C-ter de la protéine HBc dans des capsides vides et ARN

Représentation schématique de la localisation de la partie C-ter des protéines HBc constituant les capsides vides et des capsides contenant de l'ARN. Les cercles en pointillé représentent la structure générale des capsides. Adapté de (Kim and Wu 2014).

Cette double localisation de la partie C-ter avait déjà été décrite après désassemblage et réassemblage de capsidie en utilisant de l'urée (Wang et al 2012).

Pour nos préparation de capsides vides, il serait intéressant d'évaluer les proportions de capsides de symétrie T3 et T4 par rapport aux capsides contenant de l'ARN *E.coli* (en mesurant la taille des capsides en microscopie électronique haute résolution). Les résultats que j'ai obtenu indiquent que les capsides ARN *E.coli* et les capsides

vides migrent de façon identique dans un gel d'agarose en condition native. Ce résultat implique que les changements structuraux entre les deux types de capsides sont limités. La quantité de capside avant et après réassemblage est identique ce qui indique que pratiquement toutes les capsides désassemblées se sont réassemblées. Cette interprétation est confirmée par le fait que des capsides désassemblées par dénaturation puis réassemblées migrent plus lentement que des capsides ARN *E.coli* (Kann et al 1997).

Le domaine CTD de la protéine HBc interagis avec une plus forte affinité pour les molécules d'acides nucléiques simple brin que pour les molécules double brin (Melegari et al 1991). Comme proposé par Rabe et al, nous pensons que l'interaction CTD-ARN entraîne la séquestration des domaines C-ter à l'intérieur des capsides (Rabe et al 2003). La phosphorylation *in vitro* du domaine CTD par la PKC diminue les interactions entre le domaine C-ter et les acides nucléiques (Kann and Gerlich 1994) Cependant je n'ai pas inclus les capsides phosphorylées *in vitro* dans cette étude. En effet, bien que les phosphorylations semblent nécessaires à la maturation des capsides, leurs déphosphorylations ont été décrites *in vivo* (Melegari et al 2005) De plus il semblerait que les capsides matures *in fine* ne sont pas phosphorylées (Melegari et al 2005).

Microinjection ovocyte de *Xenopus laevis* :

Pour vérifier que les capsides vides ont des caractéristiques communes avec les capsides matures lors du transport cytosolique et lors de l'interaction avec les NPCs, j'ai utilisé la microinjection des capsides dans des ovocytes de xénopes.

Au contraire des parvovirus qui comme le VHB possèdent une capside dont la taille est inférieure au diamètre du NPC. Ces derniers déstabilisent la membrane nucléaire pour y former un trou permettant l'accès au noyau (Cohen and Pante 2005; Cohen et al 2011; Porwal et al 2013). Les capsides du VHB sont retrouvées au niveau du panier nucléaire (Pante and Kann 2002).

Après avoir réalisé les expériences de microinjection de capside du VHB dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, plusieurs conclusions peuvent être tirées :

- Les capsides matures et vides sont transportées avec une cinétique similaire jusqu'aux NPC.

- Tous les NPC ne contiennent pas des capsides, le système n'est pas saturé dans nos conditions expérimentales et/ou certains NPC ne sont pas permissifs à l'interaction avec les capsides matures et les capsides vides.
- Les capsides matures se désassemblent au panier nucléaire et se réassemblent dans le noyau.
- Les capsides vides interagissent avec le NPC mais ne se désassemblent pas au niveau du panier nucléaire. Le blocage des capsides vides au NPC explique leur accumulation à des ratios de 3, 4, 5 capsides par NPC à 60 minutes. Cela suggère également qu'un facteur viral semble nécessaire pour ce mécanisme.

La pré-injection d'anticorps dirigés contre la tubuline provoque une stabilisation des Mt et l'inhibition stérique des protéines motrices. Des expériences d'injection d'anticorps dans des cellules somatiques ont inhibées la méiose et la mitose qui sont des phases cellulaires où la dynamique des Mt est très importante (Füchtbauer et al 1985; Oka et al 1990; Lessman et al 1997). Dans notre cas les Ac anti tubuline inhibent le transport des capsides jusqu'aux NPC. Cela indique que la tubuline est indispensable au transport cytosolique des capsides. Ces résultats vont dans le même sens que les données publiées par Rabe *et al* qui ont montré que les Mt sont essentiels pour le transport des capsides dans des cellules somatiques (HuH7) (Rabe et al 2006). Le processus de transport des capsides du VHB semble similaire entre le modèle xénope utilisé dans ce projet et les HuH7.

En considérant le nombre de capsides utilisées lors des microinjections, on calcule un facteur 6 entre les capsides matures et les capsides vides. Cependant les différences observées sont bien inférieures. Il y a 3 fois plus de capsides vides que de capsides matures aux NPC. Les capsides matures seraient donc transportées plus efficacement que les capsides vides. On constate également une augmentation du nombre de capsides matures dans les NPCs entre 15 min et 60 min indiquant que le désassemblage des capsides matures dans le panier nucléaire est dans nos conditions expérimentales un processus lent.

D'autres résultats non publiés (Delaleau, Rabe *et al*), utilisant ces capsides vides dans des expériences d'import nucléaire sur cellules de mammifère perméabilisées, montrent une colocalisation des capsides avec les NPC au niveau de l'enveloppe

nucléaire. Ces résultats associés aux microinjections effectuées dans les ovocytes de *Xenopus laevis* suggèrent que ces capsides vides sont capables d'interagir avec la machinerie du transport nucléaire (importines).

Dans nos conditions expérimentales j'ai quantifié dans certains NPC des accumulations pour les deux types de capsides. Cependant j'ai également observé à 60 min des NPC ne contenant qu'une seule capside et des NPC contenant aucune capside. Bien que l'hypothèse la plus évidente soit que notre système n'est pas saturé, ces observations proposent également une autre interprétation : une spécialisation de différente population de NPC. Des données très récente obtenues également sur des ovocyte en utilisant la super résolution ont montré des sous populations de NPC ayant des symétries nonagonale et decagonale alors que la structure connue est octogonale (Löschberger et al 2014). De ce fait, on peut postuler qu'il y aurait des familles de NPC (dans ce cas déterminées par leurs structures) spécialisées dans certain type de transport nucléaire. Cela peut également expliquer les accumulations de capsides que j'ai observées dans certain NPC. Des modifications post-traductionnelles sur les protéines composant les NPC pourraient également intervenir dans cette spécialisation.

Capsides du VHB et Mt :

Des colocalisations ont pu être observées après microinjection de capsides vides dans des cellules U2OS ou directement sur des Mt polymérisés *in vitro*.

Les conditions de microinjection ne m'ont pas permis de voir une accumulation des capsides vides à la membrane comme on pouvait le supposer au regard des résultats de microinjection dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. La microinjection des U2OS est délicate. Lors des sessions de microinjection la vitesse d'exécution des microinjections est dépendante de facteur non maitrisable (aiguille qui peut se boucher, cellules dans lesquelles l'entrée de l'aiguille est difficile...). En moyenne 100 à 200 cellules sont microinjectées. Après la fixation (1 heure à 3 heures après le début des microinjections) puis immunocytochimie seulement 30 à 80 cellules sont observables. Des expériences d'imagerie en temps réel pourraient apporter davantage de donnée comme la vitesse de transport des capsides *via* du tracking de particule. Il existe quelques données sur des capsides du VHB marquées et visualisables en microscopie à fluorescence : comme les molécules BODIPY

fluorescente (Stray et al 2006). Des capsides recombinantes ayant encapsidé la GFP (Lee and Tan 2008). Ou encore *via* des infections de cellules exprimant le récepteur d'entrée (NTCP) avec des virus marqués à l'Alexa (Cheng *et al* non publiés HBV meeting 2014). Le marquage de capsides *in vivo* et *in vitro* peut également être envisagé. L'ajout d'une courte séquence de six a.a. dans HBc pouvant être reconnus par un ligand fluorescent (FLaSH) a déjà été utilisé avec les capsides du VHB (Adams et al 2002; Sun et al 2013).

Les capsides vides et matures colocalisent en présence de lysat avec des microtubules polymérisés *in vitro*. Lors de ces expériences la qualité des microtubules préparés a été variable. Mais j'ai quand même pu quantifier les colocalisations capsides Mt et de façon surprenante les pourcentages de colocalisation sont très similaires.

Des expériences de suivis en temps réel de capsides fluorescentes pourraient également être utilisées avec les Mt polymérisés *in vitro*. Ce genre d'expérience a déjà été mis en place avec le complexe moteur de la kinésine (Korten et al 2011). La kinésine est composé de moins de protéine que la dynéine ce qui facilite la mise en place de ces essais. Les expériences de mobilité de la dynéine sont inversées : c'est la mobilité des Mt fluorescents qui est observée *via* l'activité des chaînes motrice de la dynéine fixé sur le support.(glidding) (DeWitt et al 2014)

Biochimiquement j'ai observé la coprécipitation de la tubuline en présence de lysat cellulaire avec les capsides matures mais également avec des capsides ARN *E.coli* mais dans une moindre mesure. Ces résultats vont dans le même sens que les quantifications de colocalisation entre les capsides et les Mt polymérisés *in vitro*. En effet la cosédimentation est supérieure pour les capsides matures par rapport aux capsides ARN *E.coli*. Les capsides matures semblent donc interagir avec plus d'affinité avec le partenaire qui permet de colocaliser et de coprécipiter les microtubules. Même si pour les colocalisations les résultats avec les capsides vides sont similaires, la précipitation des microtubules par les capsides vides serait un argument supplémentaire en faveur d'une forte similarité entre capsides vides et capsides matures.

GST dynéine et capsides :

Des données préliminaires suggéraient l'implication du complexe de la dynéine. Les DynLC sont souvent impliquées dans les interactions avec les cargos cellulaires et des protéines virales. Pour déterminer si une ou plusieurs DynLC interagissent avec les capsides du VHB, les protéines ont été surexprimées en fusion avec le tag GST dans un système hétérologue bactérien. Après purification, je devais vérifier le repliement correct des DynLC. L'une des caractéristiques de ces DynLC est leur forte capacité d'homodimérisation, dont leur activité biologique en dépend. En effet la dimérisation permet l'interaction avec la DynIC. Cependant la GST ajouté en N-ter possède aussi des qualités intrinsèques de dimérisation.

Il n'existe pas d'Ac contre toutes les DynLC : aucun Ac commercial contre les DynRb, les Ac commerciaux contre DynLc8 reconnaissent les deux isoformes (LL1 et LL2). Des expériences de copréciptation des DynLC contenus dans un lysat cellulaire n'étaient donc matériellement pas possible. C'est pourquoi j'ai utilisé la capacité des DynLC à interagir avec la DynIC. Dans des expériences de copréciptation, la DynIC a été précipitée par toutes les DynLC purifiée confirmant que nos GST DynLC peuvent dimeriser. De toutes les GST DynLC purifiée, seul la GST LL1 a été précipité par les capsides matures et les capsides vides. L'ajout de lysat cellulaire lors de ces expériences diminue la précipitation de GST LL1 avec les deux types de capsides. Dans le lysat une ou plusieurs protéines entrent en compétitions avec la GST LL1 en inhibant l'interaction GST LL1 capsides. On peut certes suspecter la DynLL1 endogène mais d'autres protéines cellulaires pourraient également entrer en compétition avec la GST DynLL1.

Via les coïmmunoprécipitation, j'ai observé une précipitation non spécifique de GST Rb2. La similarité entre Dyn LL1 et Dyn LL2 nécessitait une confirmation d'interaction qui a été réalisé par cosédimentation. Cette technique nécessite l'utilisation de quantités plus élevées de protéines, l'analyse s'est donc limitée aux capsides vides.

GST LL1 et mutant de LL1 :

La dimérisation de Lc8 a été très analysé en raison de son rôle de protéine « Hub ». En effet, en plus de son rôle dynéine dépendant ces protéines ont un rôle dynéine indépendant. Elles interagissent avec beaucoup de protéines cellulaires. DynLc8 n'est donc pas considéré seulement comme une protéine du complexe de la dynéine. DynLc8 serait donc plutôt un catalyseur d'homodimérisation de ses

interactants (Barbar and Nyarko 2014). La revue de Rapali et al 2011 fait un état des lieux précis sur les nombreuses protéines qui interagissent avec DynLc8.

Des études structurales (magic angle spinning NMR spectroscopy) ont été mises au point avec DynLc8 pour étudier la structure du complexe (Sun et al 2011) Les propriétés thermodynamique du complexe de DynLc8 ont également été analysées (Benison and Barbar 2009). D'autres études de RMN ont montrées que l'ionisation de l'histidine en position 55 était importante pour la dédimérisation de DynLc8 (Nyarko et al 2005) et ont également étudiées l'effet de la phosphorylation de la sérine 88 sur le dimère de DynLc8 (Benison and Barbar 2009). Cette phosphorylation est dépendante de l'interaction de DynLc8 avec Pak1 (P21 Activated Kinase 1) cette interaction elle-même importante pour l'import nucléaire de Pak1 (Lightcap et al 2009) cependant elle pourrait jouer un rôle dans le désassemblage de la dynéine.

La majorité des protéines qui interagissent avec DynLL1 possède souvent le motif KXTQT pour s'insérer dans le sillon formé par l'homodimérisation de DynLL1. Les 66 protéines connues qui interagissent avec la DynLc8 partagent des caractéristiques communes telles que la localisation du motif KXTQT dans des domaines désordonnés (DD domain) ainsi que la proximité de domaine coiled-coil. Des analyses bio-informatiques ont prédit 100 à 300 protéines cellulaires impliquées dans différents mécanismes cellulaires qui auraient la capacité d'interagir avec les DynLc8 (Radnai et al 2010; Rapali et al 2011b; Rapali et al 2011c). Ce motif n'est pas présent chez HBV de plus les capsides ont une spécificité pour LL1 et pas pour LL2. Il n'y a que 6 a.a. différents entre ces deux protéines ce qui suggère l'implication de ces a.a. dans l'interaction avec les capsides du VHB. La localisation de ces a.a. semble compatible avec une interaction DynLc8, DynLL1 et capside. Cinq des six a.a. qui diffèrent entre LL1 et LL2 sont localisés à la surface de la protéine (colorés en jaune sur la Figure 59).

D'après nos résultats on constate des différences d'interaction avec les changements d'acide aminée en position 29 et 41 (Figure 59). Ces deux a.a. semblent important pour l'interaction DynLL1/capside du VHB. Une collaboration avec le groupe de S Butcher (Helsinki, Finlande) a été mise en place pour mieux caractériser cette interaction capside DynLL1. Nous voudrions obtenir des images de ce complexe en cryoélectromicroscopie. La résolution de l'ordre de l'angstrom en cryoélectromicroscopie couplé a de la tomographie permettraient de mieux

comprendre les modalités d'interaction entre les capsides et DynLL1 et peut être au sein du complexe de la dynéine.

L'importance de l'a.a. semble acquise. Cependant, lors du control d'interaction des différents mutants de LL1 avec la DynIC, on constate que pour le mutant LL1 H41Y il n'y a pas de copréciation de la DynIC ce qui est un résultat attendu. En effet bien que DynLL2 (avec une tyrosine en position 41) soit retrouvée dans le complexe de la dynéine cette protéine est également retrouvée associé à la myosine 5a. Cette interaction a récemment été caractérisée structurellement (Bodor et al 2014). L'expression hétérologue (en cellule HEK) d'un mutant de LL1 H41Y redirige l'interaction vers la myosine Va. Il semble donc normal de ne pas pouvoir coimmunoprécipiter la DynIC avec ce mutant (Day et al 2004). Pour valider la conformation du dimère de LL1 H41Y il faudrait réaliser une coimmunoprécipitation de la myosine Va. Il est important ici de préciser que la myosine appartient au complexe moteur qui utilise les filaments d'actines.

C'est par différentes techniques qu'ont été montrées les interactions DynLC8 et protéine virale. L'interaction entre DynLc8 et protéine Vp35 de l'Ebolavirus a été montré en double hybride (Kubota et al 2009). L'interaction avec gag (foamy virus) permettant son adressage au centrosome par DynLc8 a été montré par des transfections et coimmunoprécipitations (Petit et al 2003). Un peptide inhibe spécifiquement l'interaction DynLL1 protéine virale de l'ASFV et retarde le cycle viral (Hernández et al 2010). Alternativement aux essais de transfert de gènes par des virus, de récents travaux utilisent la DynLc8 modifiée en tant que vecteur non viral de gène (Toledo et al 2012).

HBV capsides et dynéine

La copréciation du complexe DynIC 295 DynLL1 et capsides est en faveur d'une interaction des capsides du VHB avec la DynLL1 lorsque celle-ci est incluse dans le complexe de la dynéine. Cependant, nous ne pouvons pour le moment pas savoir si cette interaction est possible dans le contexte de la dynéine entière. La localisation centrale du dimère de DynLL1 et la présence à la surface des a.a. impliqués qui semblent accessibles permet cependant d'envisager sérieusement cette hypothèse (Figure 71).

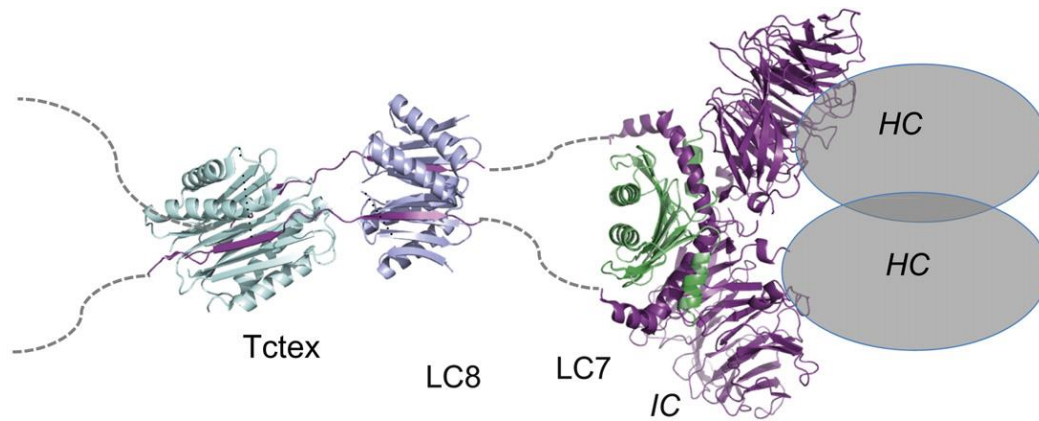


Figure 71 : Modèle présentant l'assemblage des structures de DynIC et des DynLC en complexe de la dynéine

Les structures des dimères de DynTctex, DynLc8 et DynRb sont respectivement représentées cyan, violet et vert. La DynIC est en magenta. Seul les domaines interagissant avec les DynLC sont structuralement connus. Le domaine C-ter de la DynIC adopterait une structure de type B propeller permettant l'interaction avec les DynHC (Adapté de King et al : Dynein : structure, biology, disease)

Pour pouvoir travailler sur ce type de question nous devons disposer du complexe de la dynéine entière. Plusieurs approches qui peuvent être complémentaires sont envisageables. En purifiant le complexe de la dynéine à partir de cellule ces protocoles ont été mis en place dans le début des années 80 à partir d'oursin puis de levure, et plus tardivement à partir de cerveau (Pratt et al 1984; Paschal et al 1991; Xiang et al 1995). Ces dynéines purifiées pourraient être utilisées *in vitro*. D'autres méthodes utilisant des crosslinking de cargo de la dynéine cytoplasmique et axonemal ont été mis en place récemment (Sakato 2009) et pourraient être utilisées pour tester des interactions *in cellulo*.

La dynéine cytoplasmique marquée avec la GFP peut être complètement purifiée *in vitro* en surexprimant les protéines dans des cellules puis par plusieurs étapes successives le complexe de la dynéine peut être complètement réassemblé. Ces complexes ont été observés en microscopie électronique et utilisés sur des Mt polymérisés *in vitro*. Cependant, la processivité de ces complexes est lente (Trokter et al 2012). De récents travaux indiquent que le complexe dynactine/cargo influence l'activation et donc *in fine* la mobilité de la dynéine sur les Mt (McKenney et al 2014).

Des études *in vitro* ont montré que la dynéine purifiée associée à la dynactine est capable de mouvement à la surface des Mt vers les deux extrémités (positive et négative) avec une préférence pour l'extrémité négative (Ross et al 2006). La dynéine transportant un cargo peut donc en cas d'obstacle (intersection de Mt) faire marche arrière (Ross et al 2008). Le pas (distance séparant les deux domaines d'interaction

avec les Mt des chaînes lourdes) est variable de 4 à 32 nm (Mallik et al 2004; Toba et al 2006; Reck-Peterson et al 2006; Gennerich et al 2007; Walter et al 2010). Très récemment le déplacement de la dynéine sur les Mt a été analysé en trois dimensions chez la levure. Le déplacement serait hélicoïdal sur les Mt (Can et al 2014).

Capside du VHB et transport cytoplasmique

Dans les expériences de colocalisation capsides et Mt polymérisés *in vitro*, j'ai montré que l'ajout de GSTLL1 en excès réduit partiellement les colocalisations des capsides avec les Mt. Dans cette expérience la GST LL1 agirait comme un compétiteur de la DynLL1 endogène qui permettrait l'interaction capsides Mt. Cette hypothèse a également été testée *in vivo* par comicroinjection des capsides vides avec un excès de GST LL1. J'ai observé une forte réduction du transport des capsides aux NPC. Ces résultats suggèrent que les DynLL1 seraient requises lors du transport cytosolique des capsides.

Les capsides ARN E.coli précipitent plus faiblement la GST LL1. Cette précipitation est augmentée lorsque du lysat cellulaire est ajouté. Un facteur cellulaire semble pouvoir augmenter l'attachement de DynLL1. Ces capsides ne sont pas transloquées aux NPC après microinjection dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Nous avons donc conclu que ces capsides pouvaient peut être former un hétérocomplexe qui ne permet pas le transport par les Mt. Les microinjections de ces capsides dans des U2OS ont clairement montré une accumulation de ces dernières au MTOC. Actuellement toutes les protéines associées au MTOC constitutivement ou transitoirement pourraient être des candidats expliquant cette observation.

Si on considère le rôle des microtubules et de la dynéine dans le transport des capsides jusqu'au NPC. Les résultats que nous avons obtenus ont montrées des localisations subcellulaires différentes fonction des capsides (Figure 72).

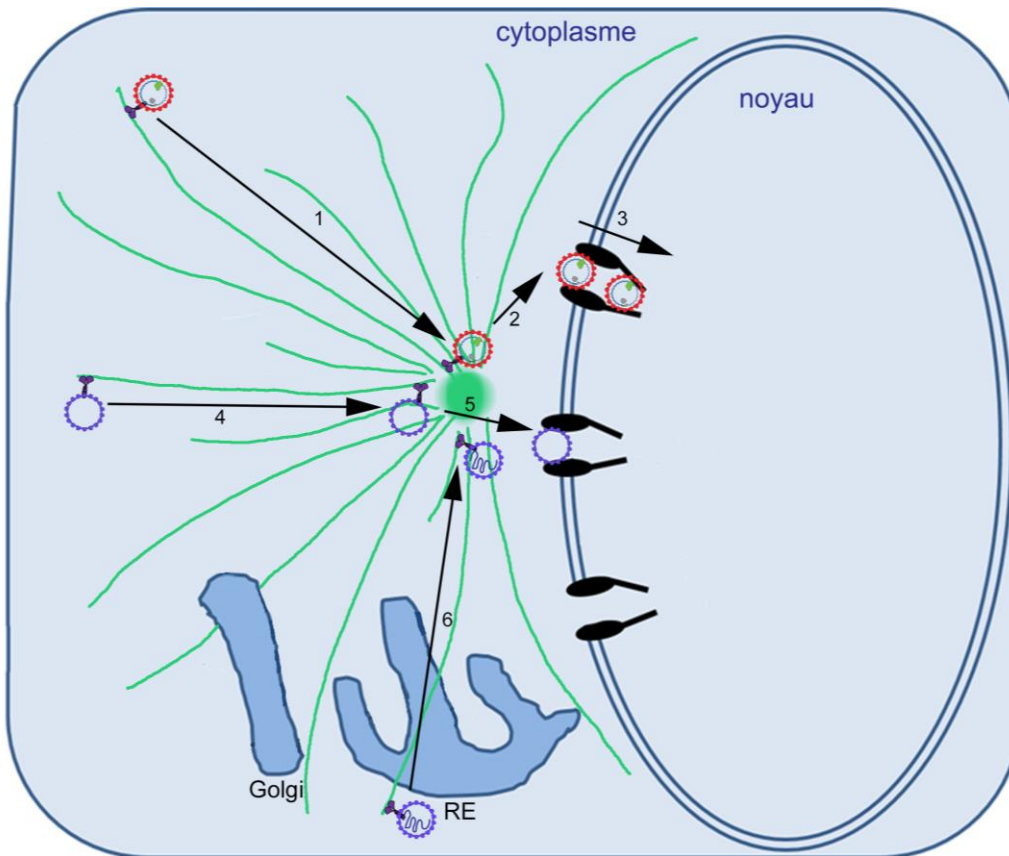


Figure 72 : Transport cytoplasmique des différents types de capsides.

Schéma représentatif des localisations subcellulaires observées avec les capsides du VHB (matures, vides et *E. coli*). Les différentes capsides sont représentées selon le code couleur suivant : en rouge les capsides matures, en violet les capsides vides et en violet contenant une molécule d'ARN les capsides *E. coli*.

Toutes les capsides : matures, vides et *E. coli* sont transportées *via* le réseau de microtubule jusqu'à la périphérie nucléaire (1, 4 et 6). Les capsides matures et les capsides vides se détachent des microtubules puisque celles-ci sont observées au NPC des ovocytes microinjectés (2 et 5). Comme l'ont montré les expériences de microinjection dans des cellules U2OS, les capsides *E. coli* s'accumulent au MTOC. Bien que biochimiquement similaire les capsides matures et les capsides vides sont différenciellement transportées à travers le NPC. Les capsides matures sont prise en charge par le complexe des importines ce qui assure une progression des capsides à travers le NPC (3) et permet ensuite les étapes suivantes du cycle de réplication. Les capsides vides semblent s'accumuler dans la partie cytoplasmique du NPC bien qu'elles soient prise en charge par les importines (non publiées Delaleau, Rabe *et al*). Ces données suggèrent que la localisation cellulaire des capsides serait dépendante de la nature biochimique des capsides et permet une orientation/tri des capsides dans les cellules. Cet état biochimique des capsides est corolaire au cycle

de réplication du virus. Tout comme l'état de phosphorylation des capsides qui a un rôle sur la maturation du génome, nous proposons un rôle important de l'état biochimique des capsides pour leurs transports cytoplasmiques.

Dissociation des Mt

Pour se détacher des Mt une fois arrivés à la périphérie nucléaire, les virus pourraient utiliser/stimuler les mécanismes de dissociation des MT du centrosome, de dissociation des dynéines par un désassemblage (complet ou partiel) relargage de la « plateforme » (DynlC/DynLc et/ou dynactine) qui transporte les cargos.

Quelques arguments en faveur d'un désassemblage :

Le désassemblage de la dynéine permettrait au dimère de DynLc8 de rester fixé aux capsides du VHB. D'autres DynLc8 (dynéine indépendant) pourraient également interagir avec la capside. Plusieurs études montrent des interactions entre DynLc8 et des protéines appartenant aux NPC. Des interactions entre DynLc8 et des Nups normales et oncogéniques (Sarma and Yaseen 2013). L'interaction Nup/DynLc8 chez la levure a été caractérisée et ce complexe a été analysé structurellement. Cette interaction fait intervenir DynLc8 (dyn2 chez la levure) avec NUP214 (Nup159 chez la levure). Plusieurs motifs d'interaction seraient présent sur les Nups (Stuchell-Brereton et al 2011; Romes et al 2012; Nyarko et al 2013). Ces quelques données pourraient suggérer un « docking » des cargos dans une région proche du NPC.

Le mécanisme de libération des cargos est également nécessaire pour le recyclage de la dynéine. Actuellement plusieurs modèles de transport de recyclage sont proposés: cependant ils ont tous été proposés en se basant sur le transport de vésicules ; sur lesquelles plusieurs complexes moteurs de différentes familles interagissent en même temps. Ce qui au regard de la taille de la majorité des particules virales, ceci semble peu probable et suggèrent l'existence d'autres mécanismes (désassemblage partiel ou complet des complexes moteurs, mécanisme de recyclage vésicules indépendant...)

Nous pouvons également envisager un mécanisme de compétition *via* les protéines impliquées dans les mécanismes suivants : dans le cas du VHB, il s'agit de l'import nucléaire des capsides.

Dans cette situation il pourrait y avoir prise en charge des capsides par les importines. Des résultats non publiés du laboratoire indiquent la présence d'un gradient d'importine α dans les cellules avec un pic d'importine α élevé à la périphérie nucléaire. (Delaleau résultats non publiés). Par compétition, les importines à la périphérie nucléaire provoqueraient un déplacement des capsides de la dynéine aux importines.

Les cellules énucléées : nouvel outil

Le protocole d'énucléation mis en place au laboratoire fonctionne sur différentes lignées cellulaires avec des taux d'énucléation très semblable. Les analyses par immunofluorescence indiquent que les cellules sans noyaux partagent de grandes similitudes avec les cellules qui ont conservées leur noyau. En effet le cytosquelette, les organites, et les protéines impliquées dans le transport cellulaire sont conservées et ont des localisations cellulaires similaires. Les infections de cellules U2OS énucléées par des adénovirus fonctionnent, ce qui implique que les cellules ont conservées des capacités d'endocytose. Les virus s'accumulent au MTOC comme l'ont déjà montré Bailey *et al.*

La microinjection de capside du VHB dans des cellules énucléées est compliquée dut au fait que les cellules s'aplatissent en absence de noyau. Je n'ai donc pas réussi à insérer l'aiguille dans le cytoplasme. Un système cellulaire infectieux permissif à l'infection par le VHB permettrait de s'affranchir des problèmes rencontrés lors de ces microinjections et ainsi de savoir si des facteurs nucléaires joueraient un rôle dans le détachement des capsides à la périphérie nucléaire.

Annexe

Expression of viral polymerase and phosphorylation of core protein determine core and capsid localization of the human hepatitis B virus

Aurélie Deroubaix,^{1,2,3} Quentin Osseman,^{1,2} Aurélie Cassany,^{1,2}
Dominique Bégu,^{1,2} Jessica Ragues,^{1,2} Somar Kassab,^{1,2}
Sébastien Lainé^{1,2,4†} and Michael Kann^{1,2,5†}

Correspondence
Sébastien Lainé
sebastien.laine@cpbs.cnrs.fr

¹Univ. de Bordeaux, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, Bordeaux, France

²CNRS, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, Bordeaux, France

³Hepatitis Virus Diversity Research Programme, University of the Witwatersrand, 7 York Road, Parktown, Johannesburg 2193, South Africa

⁴Université Montpellier 1, CPBS, UMR 5236 CNRS, Montpellier, France

⁵CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

Biopsies from patients show that hepadnaviral core proteins and capsids – collectively called core – are found in the nucleus and cytoplasm of infected hepatocytes. In the majority of studies, cytoplasmic core localization is related to low viraemia while nuclear core localization is associated with high viral loads. In order to better understand the molecular interactions leading to core localization, we analysed transfected hepatoma cells using immune fluorescence microscopy. We observed that expression of core protein in the absence of other viral proteins led to nuclear localization of core protein and capsids, while expression of core in the context of the other viral proteins resulted in a predominantly cytoplasmic localization. Analysis of which viral partner was responsible for cytoplasmic retention indicated that the HBx, surface proteins and HBeAg had no impact but that the viral polymerase was the major determinant. Further analysis revealed that ϵ , an RNA structure to which the viral polymerase binds, was essential for cytoplasmic retention. Furthermore, we showed that core protein phosphorylation at Ser 164 was essential for the cytoplasmic core localization phenotype, which is likely to explain differences observed between individual cells.

Received 18 February 2014

Accepted 26 September 2014

INTRODUCTION

Hepatitis B is a major health problem responsible for 600 000 deaths per year (WHO, 2012). Infection is caused by the human hepatitis B virus (HBV) and leads to liver fibrosis, cirrhosis and primary liver cell carcinoma. Belonging to the pararetroviruses, HBV comprises a partially dsDNA genome, which is derived from reverse transcription of an RNA pregenome (PG) and incomplete second strand DNA synthesis (genome maturation). Transcription of the PG occurs in the nucleus of hepatocytes requiring transport of the DNA genome from the cell periphery into the nucleus. Similarly to other DNA viruses, the viral genome is transported within the viral capsid, which is composed of 240 copies of the core protein. Upon arrival on the nuclear side of the nuclear pore (Schmitz *et al.*, 2010), the capsid

dissociates to core protein dimers leading to release of the viral genome (Rabe *et al.*, 2003). As core proteins assemble in the absence of any other viral or cellular factor at increased concentrations (Seifer & Standing, 1995), the core dimers reassemble in the nucleus to form capsids (Rabe *et al.*, 2009).

After nuclear release, the genome is then repaired to a covalently closed circular form, which is the template for transcription of five mRNA sets. The shortest mRNA encodes HBx, which is a transactivator of multiple signalling cascades including protein kinases such as protein kinase C (Diao *et al.*, 2001). In immortalized hepatocytes, HBx is not essential for virus production (Blum *et al.*, 1992) but in highly differentiated hepatocytes, such as HepaRG cells, HBx is essential (Lucifora *et al.*, 2011).

Two further subgenomic mRNAs encode the three surface proteins (LHBs, MHBs and SHBs). The surface proteins share a common C-terminal section, termed S, but differ in their N-terminal domains, termed preS1 and preS2. The

†These authors contributed equally to this paper.

One supplementary figure and one supplementary table are available with the online Supplementary Material.

preS1/preS2 domains of LHBS have two possible localizations (Bruss *et al.*, 1994), in either the luminal side or cytosolic face of the endoplasmic reticulum (ER). The junction of preS1 and preS2 is essential for interaction with the viral capsid (Bruss, 2004). Interaction of the capsid with the surface proteins requires genome maturation (Gerelsaikhan *et al.*, 1996) and occurs at multi-vesicular bodies (MVB; Watanabe *et al.*, 2007). The surface proteins are overexpressed with regard to the quantity required for virion formation, and the excess forms spheres or filaments, which are secreted.

HBV also encodes two mRNAs of supergenomic length. Only the longer mRNA contains the AUG start codon for the e protein (HBeAg). The primary translation product of HBeAg comprises a signal peptide (preC), which directs the polypeptide to the secretory pathway (Garcia *et al.*, 1988) but a limited amount is also found in the cytosol (Duriez *et al.*, 2008).

The shorter of the supergenomic mRNAs is the PG and encodes the core protein (Beck & Nassal, 2007). Core proteins assemble into capsids even in the absence of other viral proteins. *In vivo*, the core proteins become phosphorylated at different serine residues (Gerlich *et al.*, 1982) by cellular protein kinases. Amongst these is PKC alpha, which was shown to be essential for genome maturation (Wittkop *et al.*, 2010). Core proteins expose a nuclear localization signal (NLS), which causes nuclear import by the nuclear transport receptors of the importin family (Rabe *et al.*, 2003). For assembled capsids at least, nuclear import requires phosphorylation (Kann *et al.*, 1999). While the nuclear transport capacity of core is well established, a recent publication also reported nuclear export of core protein, which was thought to be implicated in export of HBV specific transcripts by the TAP/Nxf1 pathway (Li *et al.*, 2010).

Either by leaky scanning or by internal initiation, the PG also encodes the viral polymerase (pol) from a start codon downstream of the core AUG (Hwang & Su, 1998; Fouillot *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1989). Pol requires interactions with different heat-shock proteins (at least hsp40, hsp70 and hsp90; Beck & Nassal, 2003; Hu *et al.*, 2004; Stahl *et al.*, 2007) for binding to ϵ . Subsequently the pol- ϵ complex becomes encapsidated into the assembling capsids but only if core is phosphorylated at Ser 162 (Gazina *et al.*, 2000). Conversion to DNA is facilitated by pol and occurs inside the capsid requiring phosphorylation of core at further sites (Gazina *et al.*, 2000).

Both pol and core protein are overexpressed during infection. Pol can be found throughout the entire cytoplasm in HuH-7 and HepG2 cells after transfection of supergenomic HBV DNA (Cao & Tavis, 2004). Excessive core is found in the nuclei of hepatocytes in infected patients (Chu & Liaw, 1987, 1997) in the form of assembled capsids (Gerlich *et al.*, 1982) and it is thought that these capsids are derived from nuclear import of unassembled core proteins (Guidotti *et al.*, 1994). Accordingly, nuclear capsids are devoid of the viral genome (Gerlich *et al.*, 1982).

The localization of core varies between different cells and expression systems but the reasons for the differing localization remain unclear. In HepaRG cells, which can be infected with HBV, core has been detected in the cytoplasm and occasionally in the nucleus (Gripon *et al.*, 2002). The localization of core in humans is also variable: Akiba *et al.* (1987) and Sharma *et al.* (2002) observed more frequent nuclear localization while others observed a mainly cytoplasmic core and/or capsid localization (Liu *et al.*, 2009; Michalak & Nowosłowski, 1982; Park *et al.*, 1999; Petit & Pillot, 1985). In terms of disease and viral load, the majority of studies associate cytoplasmic capsids with high hepatocellular injury (Chu *et al.*, 1995, 1997; Kim *et al.*, 2006; Naoumov *et al.*, 1990) and a low level viraemia (Liu *et al.*, 2009) while nuclear dominance is associated with high viral load and minor hepatitis activity (Chu *et al.*, 1997).

As core and capsid localization in different compartments is poorly understood, we analysed factors influencing core protein and capsid trafficking using two hepatoma cell lines.

RESULTS

Core localization in the context of other viral proteins

We first transfected a 1.1mer of the HBV genome (genotype A; pHBV_1.1mer) into HuH-7 and HepG2 cells, which represent hepatoma cells in different differentiation states (Su & Yee, 1992; Yaginuma *et al.*, 1987). HepG2 cells have been shown to produce infectious virions (Sells *et al.*, 1988). The transfected plasmid encodes all hepadnaviral proteins under the control of their physiological promoters. We monitored core and capsid localization using two antibodies: the monoclonal mouse antibody Fab3105, which detects core protein dimers, higher assembled forms and HBeAg (Belnap *et al.*, 2003; Watts *et al.*, 2010), and a polyclonal rabbit antibody (DAKO) reacting with core hexamers and with assembled capsids (Rabe *et al.*, 2009). As assembly of core monomers to dimers and from hexamers to entire capsids occurs rapidly (Zlotnick *et al.*, 1999), we concluded that the Fab3105 stain detects all apparent forms of core and HBeAg, while the DAKO antibody detects virtually only capsids.

Fig. 1(a) shows the merged results of five transfections demonstrating that in the vast majority of cells, capsids and core proteins localized predominantly in the cytoplasm. In HuH-7 cells stained with Fab3105, 92% of cells exhibited predominant cytoplasmic accumulation, 3% exhibited an equal distribution in the nucleus and cytoplasm and 5% showed a predominantly nuclear stain (for results of individual experiments, see Table 1).

Based on the multiplicity of the experiments performed with different plasmid preparations, we calculated an SD of 13% for the DAKO stain and 5% for the Fab3105 stain

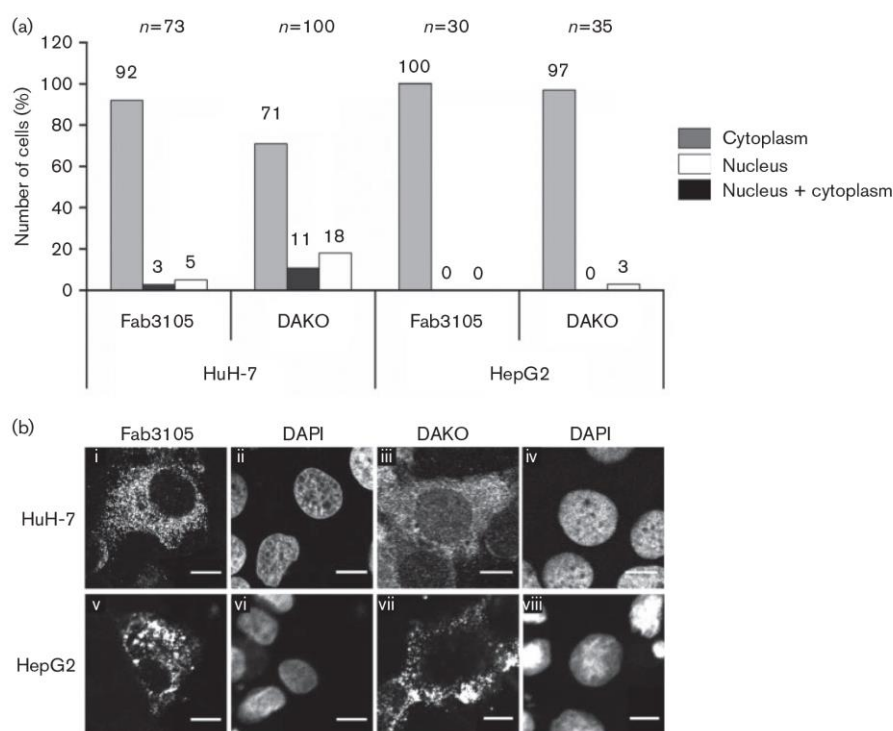


Fig. 1. Core localization in the context of other viral proteins. (a) Determination of core concentration depicted as quantitative results of three transfections for Fab3105 and five transfections for DAKO. HuH-7 and HepG2 cells were transfected with pHBV_1.1mer. Cells were immunostained with a mouse monoclonal anti-HBc antibody (Fab3105) or a polyclonal rabbit anti-HBc antibody (DAKO). The columns show the predominant localization of core. Accumulation of fluorescence in the cytoplasm or nucleus is shown in grey or white columns, respectively. Black columns indicate an equal distribution between the nucleus and cytoplasm. The numbers above each column show the percentage of core/capsid positive cells. (b) Localization of core in individual cells. i–iv: HuH-7; v–viii: HepG2; i, v: Fab3105; iii, vii: DAKO. Nuclei were visualized by DAPI staining (ii, iv, vi, viii). Bars, 10 μ m.

(Table 1). Thus, we considered that the difference between a value of 92% in HuH-7 cells with a dominant cytosolic capsid stain does not differ significantly from 100% in HepG2 cells for Fab3105, or 71% versus 97% for DAKO.

Intracellular core staining with both antibodies showed a granular appearance (Fig. 1b) and in cells with a significant amount of nuclear core, no stain was observed in nucleoli.

Further experiments revealed that neither the serum concentration, the genotype (A, D), nor cell density had a significant impact on core localization (data not shown), indicating that distribution in the cytoplasm and nucleus is a stable phenomenon under various conditions.

Core protein and capsid localization in the absence of other viral proteins

Cytoplasmic core localization could have been caused by cellular factors resulting in a non-functional NLS, e.g. by

phosphorylation or dephosphorylation of the core proteins. Alternatively, viral proteins could have interfered with nuclear translocation by binding core to a larger cellular structure such as an organelle, or by sterically interfering with the NLS-bearing C terminus of core. In order to discriminate between these options, we transfected HuH-7 and HepG2 cells with a plasmid which expresses only core under the control of the CMV promoter, and investigated core and capsid localization. To exclude artefacts, which may be caused by overexpression of core protein under CMV promoter control, we determined the mean core fluorescence in individual cells showing 29 ± 15 (arbitrary units) in the context of other viral proteins with the BCP promoter, and 26 ± 15 (arbitrary units) upon expression under control of the CMV promoter (data not shown). Fig. 2(a) shows that in contrast to the localization in the context of other viral proteins, core and capsids localized predominantly in the nucleus in the majority of cells. Little difference occurred between HepG2

Table 1. Individual experimental results for transfection of pHBV_1.1mer in HuH-7 cells

Details of experiments presented in Fig. 1. HuH-7 cells were transfected with the pHBV_1.1mer. Cells were immunostained with a monoclonal mouse anti-HBc antibody (Fab3105) in three different experiments or a polyclonal rabbit anti-HBc antibody (DAKO) in five different experiments. The percentage of cells with an accumulation of fluorescence in the cytoplasm, in the nucleus or with an equal distribution between nucleus and cytoplasm are shown.

	Experiment number	Cells with an accumulation of fluorescence in the cytoplasm (%)	Cells with an equal distribution between nucleus and cytoplasm (%)	Cells with an accumulation of fluorescence in the nucleus (%)
pHBV_1.1mer; Fab3105	1	95	0	5
	2	85	4	12
	3	96	4	0
pHBV_1.1mer; DAKO	1	76	6	18
	2	81	10	8
	3	39	30	30
	4	83	5	12
	5	75	3	22

and Huh7 cells; the first showing a slightly increased proportion of nuclear core positive cells (HepG2: Fab3105, 92%; DAKO, 85%; Huh-7: Fab3105, 84%, DAKO, 77%).

Considering the variability between different transfections, we assumed that this difference was not significant. As shown in Fig. 2(b), we observed a granular stain which

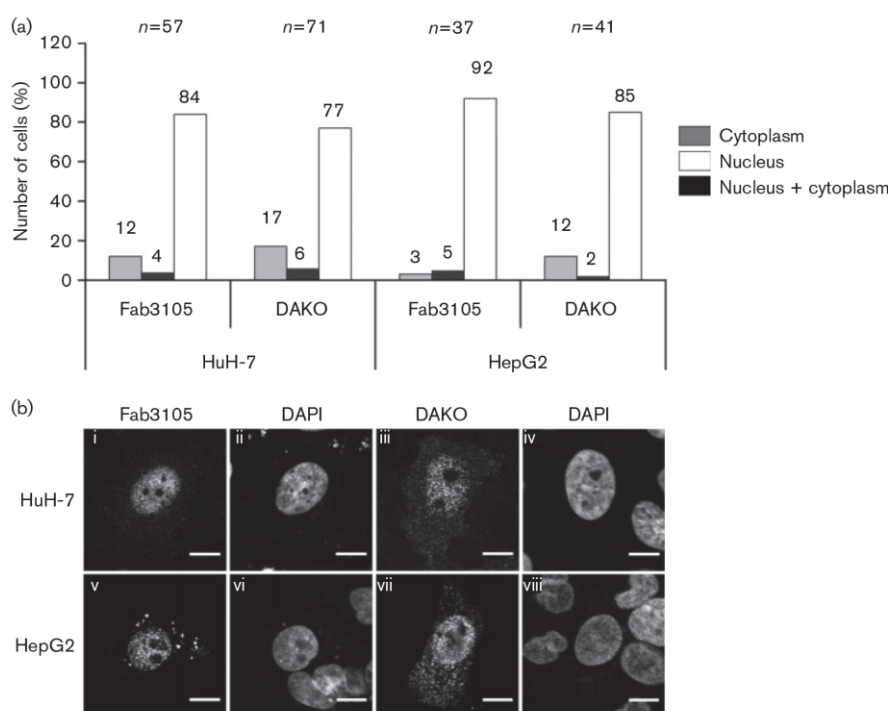


Fig. 2. Core protein and capsid localization in the absence of other viral proteins. (a) Determination of core concentration depicted as quantitative results of three transfections for Fab3105 and four transfections for DAKO. HuH-7 and HepG2 cells were transfected with the plasmid pcep21. Cells were immunostained using either the Fab3105 or DAKO antibodies. The columns show the predominant localization of core using the same colour code as in Fig. 1(a). The numbers on top of each column show the percentage of core positive cells. (b) Localization of core in individual cells. i-iv: HuH-7; v-viii: HepG2; i, v: Fab3105; iii, vii: DAKO. Nuclei were visualized by DAPI staining (ii, iv, vi, viii). Bars, 10 µm.

appeared finer than we observed for core protein and capsids expressed in the context of other viral proteins.

Nuclear entry of core depends upon active nuclear import

In hepatocytes, core proteins enter the nucleus by active nuclear import only, as cell division occurs rarely. Such transport requires nuclear transport receptors of the importin family (Kann *et al.*, 1999; Rabe *et al.*, 2003). In cell culture wherein cells divide rapidly, nuclear entry can also occur by passive trapping of core or capsids upon reconstitution of the nuclear envelope during cell division. In order to verify active nuclear import in our transfection experiments, we transfected the core gene mutant devoid of its C terminus into HuH-7 cells. Fig. 3(a) demonstrates that core remained cytoplasmic when devoid of the C terminus and identical results were obtained using Fab3105 and DAKO antibodies (Fig. 3a). Cytoplasmic localization of core protein and capsids showed fine granular staining as observed upon WT core protein expression (Fig. 3b) arguing against a fixation of core at an organelle.

Collectively, these data suggest that cytosolic retention of core is caused by a viral factor, and not by a difference between hepatoma cell lines or hepatocyte differentiation status.

Impact of viral proteins on core and capsid localization

In order to identify the viral protein affecting core localization, we transfected a 1.1mer of the HBV genome in which expression of different ORFs were suppressed either by the introduction of stop codons or by mutating the ATG start codon. We first introduced a stop codon at codon 26 of X ORF, which does not affect the amino acid sequence of the overlapping pol ORF (pHBV_X-). Fig. 4(a) shows the merge of three experiments, demonstrating that the presence of the X protein had no impact on the number of cells exhibiting a predominant cytoplasmic core or capsid stain (Fab3105, 92%; DAKO, 70%). Further, the intracytoplasmic staining pattern remained unchanged compared to the WT (Fig. 4b i, iii).

We next transfected a 1.1mer (pHBV_preS1-, preS2-, S-) into HuH-7 cells in which the start codons of preS1, preS2

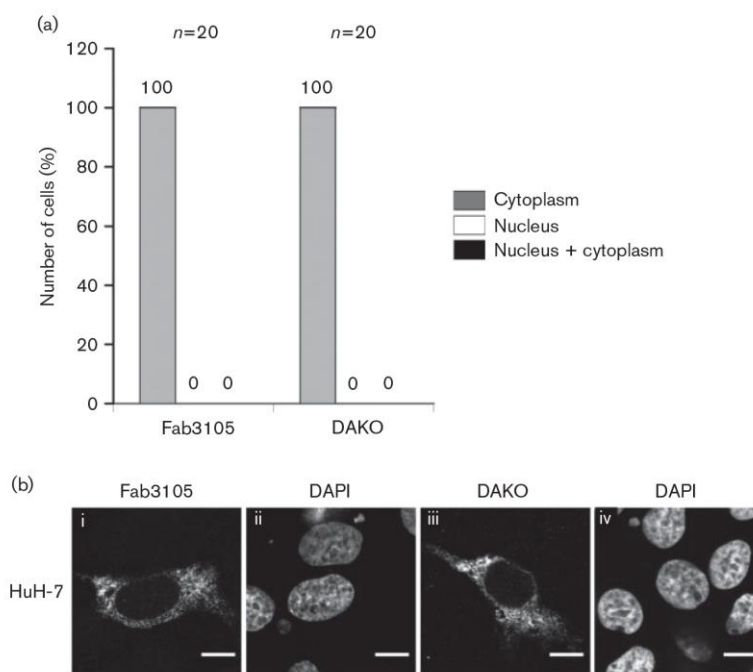


Fig. 3. Intracellular localization of core and capsids devoid of the core protein C terminus. (a) Determination of core concentration depicted as quantitative results of one transfection for Fab3105 and DAKO. HuH-7 cells were transfected with a fragment of core devoid of C terminus. Cells were immunostained either with the Fab3105 or DAKO antibodies. The columns show the predominant localization of core using the same colour code as in Fig. 1(a). The percentage of cells with a predominantly cytoplasmic localization is shown in grey. The numbers on top of each column show the percentage of core/capsid positive cells. (b) Core/capsid localization in individual HuH-7 cells. i: Fab3105; iii: DAKO. Nuclei were visualized by DAPI staining (ii, iv). Bars, 10 μ m.

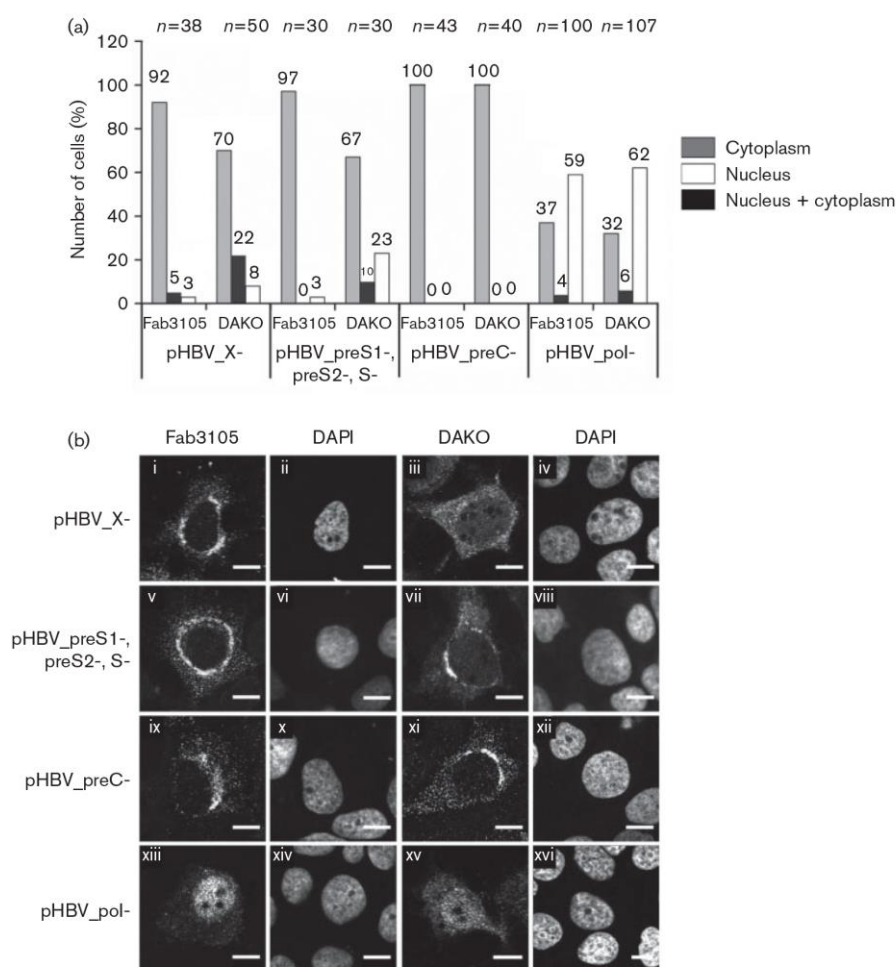


Fig. 4. The viral polymerase is essential for cytoplasmic core localization in HuH-7 cells. (a) Determination of core concentration depicted as quantitative results of two transfections for pHBV_X-, one transfection for pHBV_preS1-, preS2-, S- and pHBV_preC-, and four transfections for pHBV_pol-. Cells were immunostained with either Fab3105 or DAKO antibody. The columns show the predominant localization of core using the same colour code as in Fig. 1(a). The numbers on top of each column show the percentage of core/capsid positive cells. (b) Localization of core/capsids in individual HuH-7 cells. i, v, ix, xiii: Fab3105; iii, vii, xi, xv: DAKO. Nuclei were visualized by DAPI staining (ii, iv, vi, viii, x, xii, xiv, xvi). Bars, 10 μ m.

and S were inactivated by replacing the codons with ACG. Again, no significant change in the proportion of cells with a predominantly cytoplasmic core protein or capsid stain was observed (Fab3105, 97%; DAKO, 67%; Fig. 4a) and no change of intracytoplasmic core protein or capsid staining pattern was observable (Fig. 4b v, vii). Mutating the preC start codon to ACG also showed dominant cytoplasmic core localization (Fab3105, 100%; DAKO, 100%; Fig. 4a) and the staining pattern remained unchanged (Fig. 4b ix, xi).

In contrast, mutation of the pol AUG to ACG which does not affect the overlapping core ORF caused a major change

of core and capsid localization with the majority of cells exhibiting a predominantly nuclear localization (Fab3105, 59%; DAKO, 62%; Fig. 4a). Intracellular core staining revealed that the nucleoli remained excluded (Fig. 4b xiii, xv), thus showing the same pattern as nuclear staining upon expression from the WT genome or from core expression without other viral proteins.

To confirm that pol prevents core translocation into the nucleus, we next trans-complemented HuH-7 cells transfected with the pol-negative plasmid with a plasmid expressing the viral polymerase. In order to detect pol-expressing cells despite the limited specificity of available

anti-pol-antibodies, we used a vector expressing pol fused to the C terminus of eGFP. Analysing core protein and capsid localization in GFP positive cells showed that both the Fab3105 and DAKO stains were found predominantly in the cytoplasm in most cells (Fig. 5a; Fab3105, 92%; DAKO, 70%) as it was found in WT HBV. eGFP-pol remained cytoplasmic irrespectively of the presence of core, but appeared to be more diffuse than the core stain (Fig. 5b).

The NLS of core is exposed on unassembled core proteins and on mature capsids but mature capsids leave the cell rapidly via virus secretion (Rabe *et al.*, 2003). However, assembly depends upon core protein concentration (Seifer & Standring, 1995) and high expression levels could subsequently lead to rapid cytoplasmic assembly resulting in a dominant cytoplasmic capsid stain. We verified the intensity and the total signal derived from both antibodies in individual cells with cytoplasmic and nuclear phenotypes

after expression of core in the absence of other viral proteins or in the genomic context. As shown in Fig. S1 (available in the online Supplementary Material), the cells showed cytoplasmic (Fig. S1a) or nuclear accumulation (Fig. S1b) with high variation observed in fluorescence intensity. Thus there appears to be no correlation between the amount of capsid/core protein and the dominant localization, irrespectively of the presence of viral proteins. This observation is supported by a kinetic analysis performed in HuH-7 cells transfected with WT HBV 1.1mer, in which we did not observe a significant change in the predominant core localization using Fab3105 between days 1, 3 and 5 (data not shown). However, we observed a slight increase in cytoplasmic capsid using DAKO (cytosolic Fab3105 stain: day 1 92 %, day 2 88 %, day 5 100%; cytosolic DAKO stain: day 1 60 %, day 2 75 %, day 5 87 %). Such accumulation was expected for capsids, as their half-life (>24 h) in hepatoma

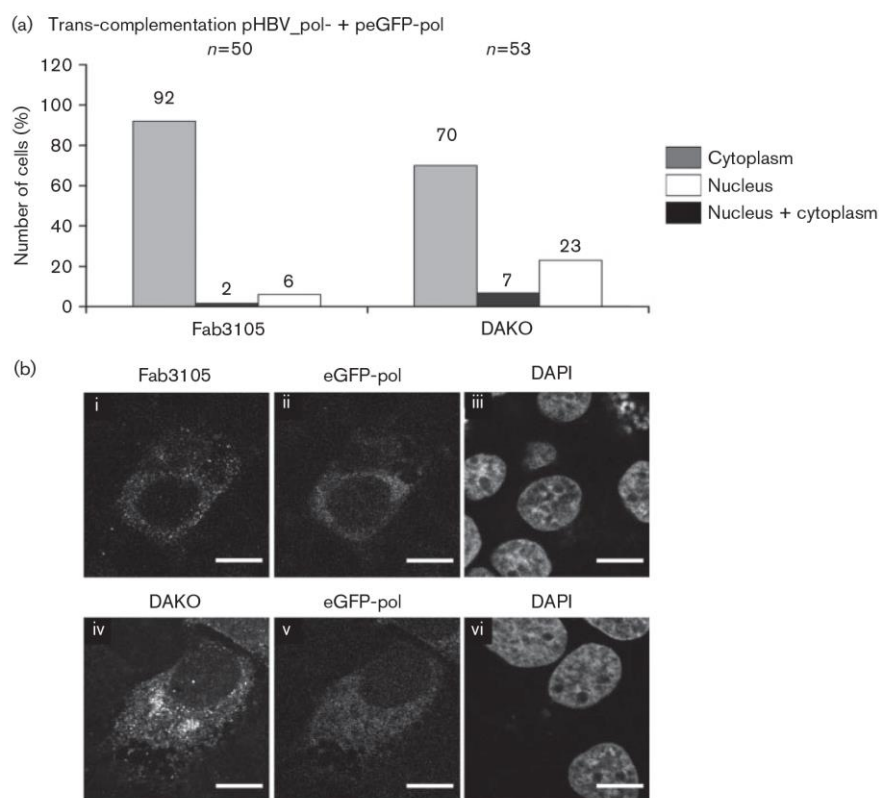


Fig. 5. Core localization after expression from a polymerase-negative HBV genome upon eGFP-pol trans-complementation. (a) Determination of core concentration depicted as quantitative results of two transfections for Fab3105 and for DAKO. HuH-7 cells were co-transfected by pHBV_{pol-} (mutated HBV genome which lacks the expression of polymerase) and peGFP-pol. Cells were immunostained with either the Fab3105 or DAKO antibodies. The columns show the predominant localization of core/capsids using the same colour code as in Fig. 1(a). The numbers on top of each column show the percentage of core positive cells. (b) Localization of core in individual HuH-7 cells co-transfected with pHBV_{pol-} and peGFP-pol. i: Fab3105; iv: DAKO. Nuclei were visualized by DAPI staining (iii, vi). Polymerase was visualized by its eGFP domain (ii, v). Bars, 10 μm.

cells is longer than that of monomeric core protein (Deres *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2010).

Cytoplasmic core localization requires pol and ϵ

In vivo, the pol–core protein interaction occurs upon envelopment of the viral PG, which in turn requires interaction of pol with ϵ (Bartenschlager & Schaller, 1992; Jones *et al.*, 2012). To investigate the impact of ϵ , which was present in the trans-complementation experiments (Fig. 5), we expressed core under the control of the CMV promoter and eGFP-pol, resulting in expression from mRNA devoid of ϵ . Fig. 6(a) shows that in the vast majority of cells, core localized predominantly in the nucleus (Fab3105, 94%; DAKO, 73%) similarly to the expression of core in the absence of other viral proteins. Aside from providing evidence that pol by itself is not sufficient for cytoplasmic core arrest, the observation further demonstrates that GFP – as part of the fusion protein – had no impact on core localization.

To further search for the missing partner causing cytoplasmic core retention by pol, we next co-transfected eGFP-pol with core; the latter was expressed from a pol/preC negative vector comprising ϵ (plasmid ppreC-/C). We observed that the cytoplasmic core distribution was restored (Fab3105, 69%; DAKO, 72%; Fig. 6b) and that the intracytosolic distribution of core showed the same granular stain upon WT HBV expression (Fig. 6d). Recent studies have shown that mutation of the lower bulge of the ϵ structure (1858–1863) prevents the pol– ϵ interaction (Abraham & Loeb, 2006; Oropeza & McLachlan, 2006). We co-transfected eGFP-pol and core with a vector expressing ϵ mutated in this fashion (ppreC-/C ϵ mutant) and found that core localized in the nucleus (Fig. 6c). Taken together, these results support a major role of ϵ in cytoplasmic core distribution.

Impact of Ser 164 on core localization

As shown by others, encapsidation of the viral PG depends upon phosphorylation of the core protein at Ser 164,

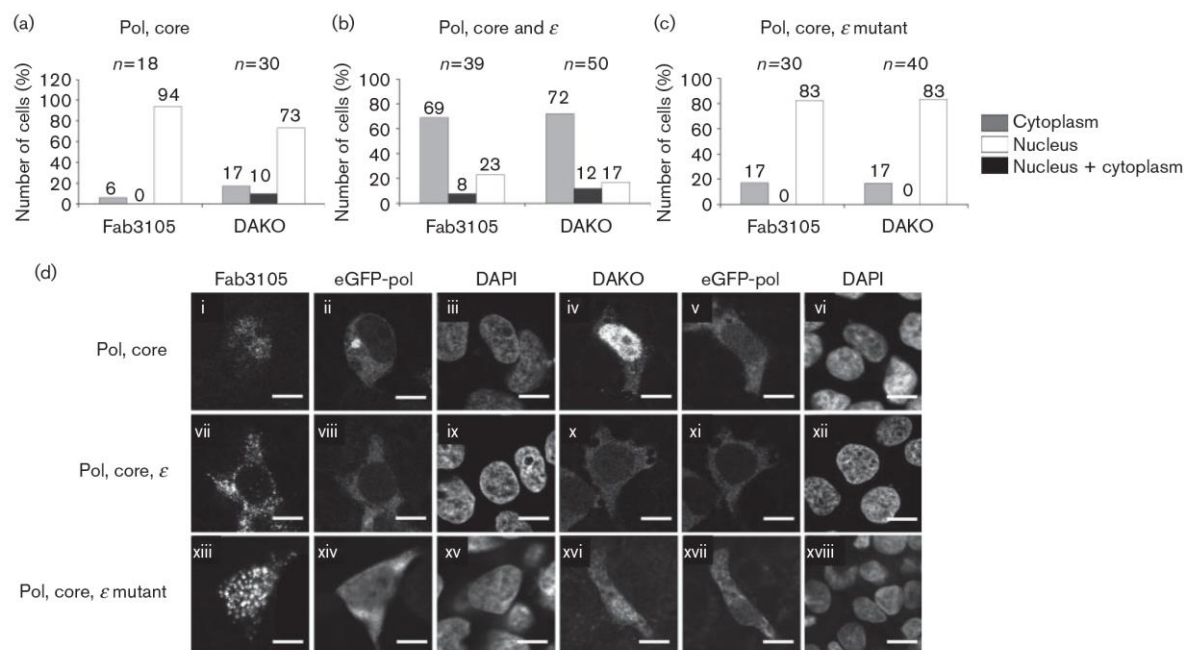


Fig. 6. Cytoplasmic core localization requires pol and ϵ . (a, b, c) Determination of core concentrations depicted as quantitative results of two transfections for Fab3105 and DAKO. HuH-7 cells were co-transfected with plasmid pcep21 containing the core gene genotype D, without ϵ , expressed under control of the CMV promoter, and peGFP-pol (a: pol, core) or ppreC-/C and peGFP-pol (b: pol, core and ϵ) or ppreC-/C ϵ mutant and peGFP-pol (c: pol, core and ϵ mutant). Cells were immunostained with either Fab3105 or DAKO. The columns show the predominant localization of core/capsids using the same colour code as in Fig. 1(a). The numbers on top of each column show the percentage of core/capsid positive cells. (d) Localization of core/capsids in individual cells co-transfected with pcep21 and peGFP-pol (pol, core; i–vi) or ppreC-/C and peGFP-pol (pol, core, ϵ ; vii–xii) or ppreC-/C ϵ mutant and peGFP-pol (pol, core and ϵ mutant; xiii–xviii). i, vii, xiii: Fab3105; iv, x, xvi: DAKO. Nuclei were visualized by DAPI staining (iii, vi, ix, xii, xv, xviii). Polymerase was visualized by eGFP fluorescence (ii, v, viii, xi, xiv, xvii). Bars, 10 μ m.

implying that the pol–core interaction requires core phosphorylation at this residue (Gazina *et al.*, 2000). We thus expressed the preC/core ORFs comprising ϵ , in which Ser 164 has been mutated to Ala in HuH-7 cells. In a further experiment, we co-transfected eGFP-pol and determined core localization by using the DAKO antibody. Fig. 7 shows that mutated core exhibited a predominantly cytoplasmic localization (81 %) and that co-transfection of pol did not significantly change the capsid accumulation (71 %). These findings do not allow conclusions to be drawn about the importance of Ser 164 for the pol–core interaction, but provide evidence that this phosphorylation site affects nuclear import of core proteins *in vivo*.

DISCUSSION

The cellular and viral factors determining core localization are not known despite its correlation to viral load and disease progression. In an attempt to understand the molecular interactions linked to core localization, we analysed the impact of hepadnaviral factors.

Our observation of a predominantly cytoplasmic core phenotype in hepatoma cells after expression in the context of other viral proteins corresponds to histological data derived from HBV infected patients with low viral loads (Liu *et al.*, 2009). The similarity between hepatoma cell lines and *in vivo* infection indicates that the level of cell differentiation has no major impact on core localization, and we conclude that viral factors are decisive. In agreement with the similarity to this histological pattern, we showed that nuclear localization was linked with active nuclear import. This active nuclear transport must also be concluded for hepatocytes *in vivo*, as cell division allowing passive entry rarely occurs (lifespan 4.8–284 days; Whalley

et al., 2001). Our observation that core localization was independent of time after transfection and of genotype further confirms the robustness of the results.

In all cells with a detectable cytoplasmic core stain, we observed granular staining but no characteristic pattern in relation to MVB or the ER. This indicates that the proportion of capsids interacting with the viral surface proteins is low, which is in agreement with the over-expression of core relative to the amount needed for virion formation. This finding further indicates that the number of capsids with a mature genome, which could attach to preS1, is limited and also suggests that nuclear import of capsids with a mature genome, as was shown *in vitro* in permeabilized cells (Rabe *et al.*, 2003), cannot account for a significant nuclear stain. This idea is further supported by the absence of a rim-like stain at the nuclear envelope, where capsids with an immature DNA maturation accumulate.

Despite a dominant phenotype, we observed individual cells with different core localization, and most cells showed some staining in both compartments. These differences between individual cells indicate inter-individual differences, but similar observations were made *in vivo* (Chu *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2006). Mechanistically, such differences could be caused by factors such as phosphorylation (Liao & Ou, 1995; Kann *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2006) or the expression of intracellular transport factors needed for core translocation to the nucleus. However, nuclear import factor expression variations are only described in embryogenesis and in breast cancer, making phosphorylation a more likely candidate. Accordingly, we observed that mutating the phosphorylation site 164 from Ser to Ala prevented nuclear import of core in the absence of other viral proteins. This finding is in agreement that

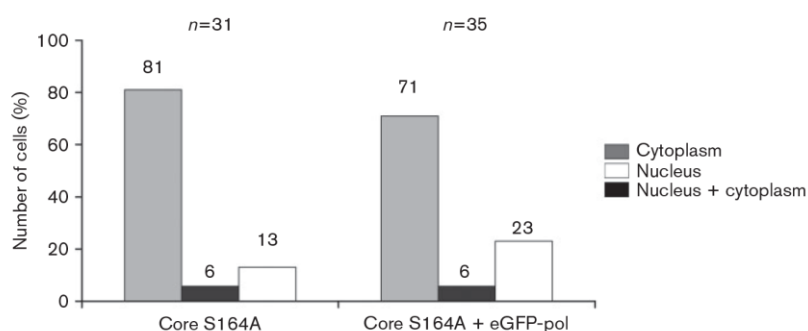


Fig. 7. Influence of Ser 164 on capsid localization. Determination of capsid concentration depicted as quantitative results of one transfection for DAKO. HuH-7 cells were transfected with DNA fragments allowing the expression of core alone (core S164A) - transfection of pUC991_S164A where Ser 164 has been mutated into Ala, digested in order to have only core region and its promoter. The second experiment shows the result of co-transfection of DNA fragments allowing the expression of core with the S164A mutation and peGFP-pol (core S164A+eGFP-pol). The columns show the predominant localization of core/capsids using the same colour code as in Fig. 1(a). The numbers on top of each column show the percentage of core/capsid positive cells.

phosphorylation is essential for interaction of at least the capsid with importin α and β (Kann *et al.*, 1999) but shows that phosphorylation is also crucial *in vivo* and in unassembled core proteins. The finding that not all core stain was cytoplasmic in transfections with the S164A mutant further implies that the non-mutated phosphorylation sites could play a minor role.

In aiming to identify the viral protein which had a dominant impact on core and capsid localization, we observed that neither preC/HBeAg nor the surface proteins affected core/capsid localization significantly. The first finding is in agreement with a missing impact of HBeAg, which could eventually cause staining, in our fluorescence results. The latter observation is consistent with an absence of capsid accumulation at MVB. In contrast, suppression of the pol start codon changed capsid localization significantly, becoming predominantly nuclear in the majority of cells. However, the nuclear pattern was not so pronounced as upon expression of the core ORF alone.

In keeping with our observation that pol is the major determinant of core and capsid localization, trans-complementation by eGFP-pol restored core and capsid localization but only in those cells showing eGFP fluorescence. However, trans-complementation did not fully restore core retention. This finding is in agreement with observations of others showing that expression of core and pol from different RNAs is less efficient regarding PG packaging than translation of pol and core from the same RNA (Von Weizsäcker *et al.*, 2002). Although we do not have evidence for polymerase activity of the fusion protein after encapsidation into capsids, the fusion protein localized like WT pol, as was shown recently (Cao & Tavis, 2004).

In summary, our data indicate that core and capsid localization are based on at least four partners: core protein, a protein kinase phosphorylating core, pol and ϵ . This conclusion explains several observations of others who have analysed different aspects of the viral life cycle, as follows. (1) The encapsidation of PG mediated by pol requires ϵ on the PG (Bartenschlager & Schaller, 1992). (2) This finding supports that the hypothesis that the pol-core interaction requires ϵ binding by pol, and is in agreement with a pol-dependent cytoplasmic core retention. It further suggests that ϵ binding changes the structure of pol aside from the already documented changes caused by pol-hsp70 and 90 interaction (Stahl *et al.*, 2007). (3) The observation that pol becomes activated by binding to its RNA (Tavis & Ganem, 1996) supports the hypothesis that the supposed structural change of pol is essential for the viral life cycle. (4) The observation that in the absence of core, HBV pol is only poorly active, allowing priming and synthesis of a few nucleotides of the minus DNA strand (Chen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2013) is also in agreement with the requirement of ϵ -induced structural pol changes allowing core interactions. (5) The observation of Gazina *et al.* (2000) showing that core protein phosphorylation is required for PG packaging can also be explained by our findings that

phosphorylation is the main requirement for the pol-core interaction.

As in patients' liver biopsies, we did not observe homogeneous localization of core and capsids in all cells. Based on our results, there are two major pathways to explain these intercellular differences, as follows. (1) Phosphorylation can differ between individual cells thus altering core-pol interactions and also nuclear import capacity. (2) Our data further suggest that core localization could also depend upon the stoichiometry of core and pol. An altered balance appears possible, as the translation of core and pol may follow different pathways (such as leaky scanning or reinitiation). In fact, reinitiation depends upon factors such as the eukaryotic translation elongation factor 2 (eEF2; Skabkin *et al.*, 2013), which is regulated by phosphorylation and dephosphorylation (Kaul *et al.*, 2011).

The consequences of a modified equilibrium between pol and phosphorylated core could lead to two scenarios, which require further investigation. If pol is overexpressed with regard to phosphorylated core, core is retained in the cytoplasm. This assumption is in agreement with the observation that the phosphorylation site is closed to the NLS thus suggesting competition between pol and import receptors. An excess of pol would further interfere with capsid formation as each mature capsid/virion contains just one pol molecule (Bartenschlager & Schaller, 1992). Even if this assumption is still controversial (Zhang & Tavis, 2006), it is consistent with the observation that transfected cell lines produce fewer viruses than infected hepatocytes *in vivo*, and is in agreement with data from patient biopsies showing that cytoplasmic capsids are correlated with low viraemia (Liu *et al.*, 2009).

METHODS

Plasmids. Plasmid pcep21 contains the core gene genotype D expressed under control of the CMV promoter. pHBV_1.1mer harbours the genotype A HBV genome 1.1mer (nt 1580–1984). Using the primers listed in Table S1 in PCR-based site-directed mutagenesis (*Pfu*-Turbo DNA polymerase; Agilent Technologies), this plasmid was the template for generating the plasmids in which the different HBV ORFs were inactivated. After treatment of the PCR product by *DpnI*, nucleotide substitutions were introduced. All mutations were confirmed by DNA sequencing. In pHBV_X- a stop codon has been introduced at codon 26 of X ORF (G1443T). pHBV_preS1-, preS2-, S- contains mutations of the preS1, preS2 and S start codons to ACG (T2854C, T3211C and T155C, respectively). In pHBV_preC- the precore start codon was mutated to ACG (T1814C) and in pHBV_pol- the polymerase start codon was changed to ACG (T2307C). As pHBV contains the 1.1mer genome, a second stop codon was introduced in the 3' copy of core (T1918G) and precore (T1815C). ppreC-/C plasmid was obtained by amplification of the HBV core and precore ORFs by PCR using *Apal* site containing primers followed by insertion of the *Apal*-cleaved PCR product in pGemT-easy. The precore ATG was then mutated to ACG by mutagenesis as described before. Plasmid ppreC-/C ϵ mutant, which consists in a deletion of the UGUUCA sequence (Δ 1858–1863) in the lower bulge of the ϵ structure. The plasmid for expression of eGFP-pol construct comprises the enhanced GFP gene (eGFP) fused at the N terminal to the HBV polymerase ORF using Gateway technology.

In brief, the polymerase gene was amplified by PCR from plasmid pSM2, which contains a head-to-tail HBV genome dimer of genotype D linearized by *EcoRI*. Using the primers specified in Table S1 the fragment was amplified and inserted into the entry vector, pDONR221. LR Clonase then catalysed recombination between the entry- and destination vectors (pBS_L30_eGFP_RFC) to generate pEGFP-pol. In this vector, eGFP-pol expression is controlled by the mouse ribosomal protein L30 promoter. pUC991_Ser164Pro contains the genotype D HBV genome linearized by *EcoRI*, in which the codon Ser 164 of core was mutated to Pro.

Cell culture and transfections. All experiments for immunostaining were performed in HuH-7 cells and repeated in HepG2 cells. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% (v/v) FCS, penicillin (100 U ml⁻¹) – streptomycin (100 µg ml⁻¹) (complete medium) unless otherwise indicated. One day before transfection, 1.5 × 10⁵ HuH-7 cells were propagated on coverslips in 12-well dishes, in complete medium. Cells were incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO₂. Cells were then transiently transfected with 800 ng DNA in Opti-MEM, using 1.5 µl Lipofectamine 2000. One day post-transfection, cells were washed with 1 × PBS and incubated in starved serum medium (DMEM 1% (v/v) serum, 1% (v/v) penicillin, 1% (v/v) streptomycin) for 3 days at 37 °C, 5% CO₂. For immunostaining, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in 1 × PBS for 30 min at room temperature.

Immunofluorescence analysis. Cells were washed in 1 × PBS, permeabilized for 10 min using 0.2% (v/v) Triton X-100/1 × PBS for 10 min and washed with 1 × PBS. Then, cells were blocked for 5 min in blocking buffer (PBS, 10% FCS, 0.1% (v/v) saponin). The rabbit polyclonal (DAKO) and the mouse monoclonal Fab3105 (Institute of Immunology) antibodies were diluted 1:1000 and 1:500, respectively, in blocking buffer for 1.5 h at 37 °C. After three washes with 1 × PBS, blocking buffer was added for 5 min at room temperature. Anti-rabbit (1:1000) and/or anti-mouse antibodies (1:500) Alexa 488- or Alexa 543 labelled donkey secondary antibodies (Invitrogen) were added for 90 min at 37 °C in 1:1000 dilution. DNA was stained with DAPI (1 mg ml⁻¹, 1:1000, Sigma) for 10 min. Cells were mounted using fluorescence mounting medium (DAKO). Microscopy was performed using a Leica SP5 confocal microscope, equipped with a 63 × objective and Leica image analysis software. Images were taken in 12 bits, with a sequential bidirectional acquisition, averaged on three images. Quantification of fluorescence was performed using ImageJ software. We determined the mean of fluorescence in the nucleus and in the cytoplasm of each transfected cell, which reflects the concentration. The mean values of fluorescence for nuclei and cytoplasm of the non-transfected cells were obtained by subtracting the background signal. The fluorescence ratio was determined using the mean values in the nucleus and in the cytoplasm. The cells were classified as a function of their ratio of fluorescence. If the nuclear/cytoplasmic ratio was below 1, there was an accumulation of fluorescence in the cytoplasm. If the ratio was above 1, there was an accumulation of fluorescence in the nucleus. The cells were then classified in a graph showing the percentage of cells with accumulation in the cytoplasm (grey columns), in the nucleus (white columns) and with an equal distribution between nucleus and cytoplasm (black columns) for *n* cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants for the Franco-German collaboration. We thank Professor J. M. Rossignol for the pcep21 plasmid, Dr H. Wodrich and Dr P. Laquel for their comments. This work was supported by the Structure fédérative de Recherche (SFR) 'TransbioMed' and by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ 20110421299, FRM) to M. K.

REFERENCES

- Abraham, T. M. & Loeb, D. D. (2006). Base pairing between the 5' half of ϵ and a cis-acting sequence, ϕ , makes a contribution to the synthesis of minus-strand DNA for human hepatitis B virus. *J Virol* **80**, 4380–4387.
- Akiba, T., Nakayama, H., Miyazaki, Y., Kanno, A., Ishii, M. & Ohori, H. (1987). Relationship between the replication of hepatitis B virus and the localization of virus nucleocapsid antigen (HBcAg) in hepatocytes. *J Gen Virol* **68**, 871–877.
- 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.
- Beck, J. & Nassal, M. (2003). Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *J Biol Chem* **278**, 36128–36138.
- Beck, J. & Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* **13**, 48–64.
- Belnap, D. M., Watts, N. R., Conway, J. F., Cheng, N., Stahl, S. J., Wingfield, P. T. & Steven, A. C. (2003). Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10884–10889.
- Blum, H. E., Zhang, Z. S., Galun, E., von Weizsäcker, F., Garner, B., Liang, T. J. & Wands, J. R. (1992). Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J Virol* **66**, 1223–1227.
- Bruss, V. (2004). Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* **106**, 199–209.
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R. & Gerlich, W. H. (1994). Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* **13**, 2273–2279.
- Cao, F. & Tavis, J. E. (2004). Detection and characterization of cytoplasmic hepatitis B virus reverse transcriptase. *J Gen Virol* **85**, 3353–3360.
- Chang, L. J., Pryciak, P., Ganem, D. & Varmus, H. E. (1989). Biosynthesis of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses involves de novo translational initiation not ribosomal frameshifting. *Nature* **337**, 364–368.
- Chen, S. Y., Kao, C. F., Chen, C. M., Shih, C. M., Hsu, M. J., Chao, C. H., Wang, S. H., You, L. R. & Lee, Y. H. (2003). Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* **278**, 591–607.
- Chu, C. M. & Liaw, Y. F. (1987). Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection. Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* **92**, 220–225.
- Chu, C. M. & Liaw, Y. F. (1997). Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* **12**, S218–S222.
- Chu, C. M., Yeh, C. T., Sheen, I. S. & Liaw, Y. F. (1995). Subcellular localization of hepatitis B core antigen in relation to hepatocyte regeneration in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **109**, 1926–1932.
- Chu, C. M., Yeh, C. T., Chien, R. N., Sheen, I. S. & Liaw, Y. F. (1997). The degrees of hepatocyte nuclear but not cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen reflect the level of viral replication in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* **35**, 102–105.
- Deres, K., Schröder, C. H., Paessens, A., Goldmann, S., Hacker, H. J., Weber, O., Krämer, T., Niewöhner, U., Pleiss, U. & other authors (2003). Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science* **299**, 893–896.

- Diao, J., Garces, R. & Richardson, C. D. (2001). X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 189–205.
- Duriez, M., Rossignol, J.-M. & Sitterlin, D. (2008). The hepatitis B virus precore protein is retrotransported from endoplasmic reticulum (ER) to cytosol through the ER-associated degradation pathway. *J Biol Chem* **283**, 32352–32360.
- Fouillot, N., Tlouzeau, S., Rossignol, J. M. & Jean-Jean, O. (1993). Translation of the hepatitis B virus P gene by ribosomal scanning as an alternative to internal initiation. *J Virol* **67**, 4886–4895.
- Garcia, P. D., Ou, J. H., Rutter, W. J. & Walter, P. (1988). Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* **106**, 1093–1104.
- Gazina, E. V., Fielding, J. E., Lin, B. & Anderson, D. A. (2000). Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J Virol* **74**, 4721–4728.
- Gerelsaikhan, T., Tavis, J. E. & Bruss, V. (1996). Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* **70**, 4269–4274.
- Gerlich, W. H., Goldmann, U., Müller, R., Stibbe, W. & Wolff, W. (1982). Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *J Virol* **42**, 761–766.
- Gripone, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. & Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15655–15660.
- Guidotti, L. G., Martinez, V., Loh, Y. T., Rogler, C. E. & Chisari, F. V. (1994). Hepatitis B virus nucleocapsid particles do not cross the hepatocyte nuclear membrane in transgenic mice. *J Virol* **68**, 5469–5475.
- Hu, J., Flores, D., Toft, D., Wang, X. & Nguyen, D. (2004). Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function. *J Virol* **78**, 13122–13131.
- Hwang, W. L. & Su, T. S. (1998). Translational regulation of hepatitis B virus polymerase gene by termination-reinitiation of an upstream minicistron in a length-dependent manner. *J Gen Virol* **79**, 2181–2189.
- Jean-Jean, O., Weimer, T., de Recondo, A. M., Will, H. & Rossignol, J. M. (1989). Internal entry of ribosomes and ribosomal scanning involved in hepatitis B virus P gene expression. *J Virol* **63**, 5451–5454.
- Jones, S. A., Boregowda, R., Spratt, T. E. & Hu, J. (2012). In vitro epsilon RNA-dependent protein priming activity of human hepatitis B virus polymerase. *J Virol* **86**, 5134–5150.
- Kang, H. Y., Lee, S., Park, S. G., Yu, J., Kim, Y. & Jung, G. (2006). Phosphorylation of hepatitis B virus Cp at Ser87 facilitates core assembly. *Biochem J* **398**, 311–317.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H. & Helenius, A. (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **145**, 45–55.
- Kaul, G., Pattan, G. & Rafeequi, T. (2011). Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct* **29**, 227–234.
- Kim, T. H., Cho, E. Y., Oh, H. J., Choi, C. S., Kim, J. W., Moon, H. B. & Kim, H. C. (2006). The degrees of hepatocyte cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen correlate with histologic activity of liver disease in the young patients with chronic hepatitis B infection. *J Korean Med Sci* **21**, 279–283.
- Li, H. C., Huang, E. Y., Su, P. Y., Wu, S. Y., Yang, C. C., Lin, Y. S., Chang, W. C. & Shih, C. (2010). Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog* **6**, e1001162.
- Liao, W. & Ou, J. H. (1995). Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J Virol* **69**, 1025–1029.
- Liu, C.-J., Jeng, Y.-M., Chen, C.-L., Cheng, H.-R., Chen, P.-J., Chen, T.-C., Liu, C.-H., Lai, M.-Y., Chen, D.-S. & Kao, J.-H. (2009). Hepatitis B virus basal core promoter mutation and DNA load correlate with expression of hepatitis B core antigen in patients with chronic hepatitis B. *J Infect Dis* **199**, 742–749.
- Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O. & Protzer, U. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* **55**, 996–1003.
- Michalak, T. & Nowoslowski, A. (1982). Crystalline aggregates of hepatitis B core particles in cytoplasm of hepatocytes. *Intervirology* **17**, 247–252.
- Naoumov, N. V., Portmann, B. C., Tedder, R. S., Ferns, B., Eddleston, A. L., Alexander, G. J. & Williams, R. (1990). Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* **99**, 1248–1253.
- Oropoza, C. E. & McLachlan, A. (2007). Complementarity between epsilon and phi sequences in pregenomic RNA influences hepatitis B virus replication efficiency. *Virology* **359**, 371–381.
- Park, Y. N., Han, K. H., Kim, K. S., Chung, J. P., Kim, S. & Park, C. (1999). Cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B virus infection: role of precore stop mutants. *Liver* **19**, 199–205.
- Petit, M. A. & Pillot, J. (1985). HBe and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. *J Virol* **53**, 543–551.
- Rabe, B., Vlachou, A., Panté, 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.
- Rabe, B., Delaleau, M., Bischof, A., Foss, M., Sominskaya, I., Pumpens, P., Cazenave, C., Castroviejo, M. & Kann, M. (2009). Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog* **5**, e1000563.
- Schmitz, A., Schwarz, A., Foss, M., Zhou, L., Rabe, B., Hoellenriegel, J., Stoeber, M., Panté, N. & Kann, M. (2010). Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog* **6**, e1000741–e1000741.
- Seifer, M. & Standing, D. N. (1995). Assembly and antigenicity of hepatitis B virus core particles. *Intervirology* **38**, 47–62.
- Sells, M. A., Zelent, A. Z., Shvartsman, M. & Acs, G. (1988). Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol* **62**, 2836–2844.
- Sharma, R. R., Dhiman, R. K., Chawla, Y. & Vasistha, R. K. (2002). Immunohistochemistry for core and surface antigens in chronic hepatitis. *Trop Gastroenterol* **23**, 16–19.
- Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. (2013). Reinitiation and other unconventional posttermination events during eukaryotic translation. *Mol Cell* **51**, 249–264.
- Stahl, M., Beck, J. & Nassal, M. (2007). Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C-proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding. *J Virol* **81**, 13354–13364.

- Su, H. & Yee, J. K. (1992).** Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2708–2712.
- Tavis, J. E. & Ganem, D. (1996).** Evidence for activation of the hepatitis B virus polymerase by binding of its RNA template. *J Virol* **70**, 5741–5750.
- Tavis, J. E., Massey, B. & Gong, Y. (1998).** The duck hepatitis B virus polymerase is activated by its RNA packaging signal, epsilon. *J Virol* **72**, 5789–5796.
- von Weizsäcker, F., Köck, J., Wieland, S., Beck, J., Nassal, M. & Blum, H. E. (2002).** Cis-preferential recruitment of duck hepatitis B virus core protein to the RNA/polymerase preassembly complex. *Hepatology* **35**, 209–216.
- Wang, Z., Wu, L., Cheng, X., Liu, S., Li, B., Li, H., Kang, F., Wang, J., Xia, H. & other authors (2013).** Replication-competent infectious hepatitis B virus vectors carrying substantially sized transgenes by redesigned viral polymerase translation. *PLoS ONE* **8**, e60306.
- Watanabe, T., Sorensen, E. M., Naito, A., Schott, M., Kim, S. & Ahlquist, P. (2007).** Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10205–10210.
- Watts, N. R., Vethanayagam, J. G., Ferns, R. B., Tedder, R. S., Harris, A., Stahl, S. J., Steven, A. C. & Wingfield, P. T. (2010).** Molecular basis for the high degree of antigenic cross reactivity between hepatitis B virus capsids (HBcAg) and subunits: insights into the enigmatic nature of e-antigen. *J Mol Biol* **398**, 530–541.
- Whalley, S. A., Murray, J. M., Brown, D., Webster, G. J., Emery, V. C., Dusheiko, G. M. & Perelson, A. S. (2001).** Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* **193**, 847–854.
- Wittkop, L., Schwarz, A., Cassany, A., Grün-Bernhard, S., Delaleau, M., Rabe, B., Cazenave, C., Gerlich, W., Glebe, D. & Kann, M. (2010).** Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation. *Cell Microbiol* **12**, 962–975.
- Xu, C., Guo, H., Pan, X.-B., Mao, R., Yu, W., Xu, X., Wei, L., Chang, J., Block, T. M. & Guo, J.-T. (2010).** Interferons accelerate decay of replication-competent nucleocapsids of hepatitis B virus. *J Virol* **84**, 9332–9340.
- Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M. & Koike, K. (1987).** Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2678–2682.
- Zhang, Z. & Tavis, J. E. (2006).** The duck hepatitis B virus reverse transcriptase functions as a full-length monomer. *J Biol Chem* **281**, 35794–35801.
- Zlotnick, A., Johnson, J. M., Wingfield, P. W., Stahl, S. J. & Endres, D. (1999).** A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry* **38**, 14644–14652.
- Zoulim, F., Saputelli, J. & Seeger, C. (1994).** Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* **68**, 2026–2030.

Appendice

Présentations Orales:

- 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Shanghai Chine
- 2012 The 2nd Leading Graduate Schools International Conference and the **6th Tsukuba Medical Science Research Meeting**, Tsukuba university, Japan
- 2012 Réseau Hôte pathogènes SFR transbiomed, université Bordeaux Ségalen, France

Présentations Posters:

- 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, USA **Prix du meilleur poster**
- 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oxford, England
- 2012 11th workshop on the “Cell biology of viral infections 2012”, Deidesheim, Germany
- 2011 The **2nd Leading Graduate Schools International Conference** and the 6th Tsukuba Medical Science Research Meeting, Tsukuba university, Japan
- Journée école doctorale science de la vie santé, Arcachon, France
- Journée Jeune chercheur SFR transbiomed, Bordeaux, France

Formation pendant la thèse :

2012 Enseignement par l'enseignement : module proposé par l'école doctorale biologie santé. Trois demi-journées de conférence pédagogique sous forme d'atelier théorique et pratique.

Participation aux enseignements de TP et de TD de virologie Master 1 spécialité microbiologie / immunologie effectués par:

Fabienne Rayne : 2012 et 2013 : 40 heures TD, 60 heures TP

Sébastien Lainé 2011 : 20 heures TD, 40 heures TP

2012 Valorisation de la recherche.

La valorisation de résultats scientifiques : aspects juridiques, aspects financiers, dépôt de brevet, business plan... Organisateur/Intervenants : Aquitaine Valo (SATT Aquitaine), Jean-Luc Chagnaud, Jacky Chartier, Isabelle Rey, Elodie Duru, Justine Lebail.

Encadrement étudiants en Master :

2013 : Master 1 2 mois, caractérisation des cellules énuclées

2012 : Master 1 2 mois, essais d'interaction GST dynéine DynIC

2011 : Master 2, 6 mois production et purification de protéines recombinantes

Associatif :

2009-2014 TBM doc's (ex doc66) : soirée d'informations sur les carrières scientifiques privées et publiques : recrutement CNRS, INSERM, MCU, rechercher un post doc, préparer son retour en France...

2010-2014 : TBM doc's, Organisation journée jeune chercheur destiné aux étudiants, doctorants et post doctorants de la SFR transbiomed, communications orale et posters. Invitation de membre d'éditorial board de journaux scientifiques, directeurs d'entreprise et cellule de transfert, président comité AERES ...

2014 organisations festival Pint Of Science Bordeaux

2012 et 2014 : réunion d'information sur les parcours de Master auprès des étudiants en Licence

Références bibliographiques

- Adams SR, Campbell RE, Gross LA, et al (2002) New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling in Vitro and in Vivo: Synthesis and Biological Applications. *J Am Chem Soc* 124:6063–6076. doi: 10.1021/ja017687n
- Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, et al (2007) The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450:695–701. doi: 10.1038/nature06405
- Alonso C, Miskin J, Hernaez B, et al (2001) African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol* 75:9819–9827.
- Amos LA, Amos WB (1991) The bending of sliding microtubules imaged by confocal light microscopy and negative stain electron microscopy. *J Cell Sci Suppl* 14:95–101.
- Andrieux A, Salin PA, Job D (2004) [A role for microtubules in mental diseases?]. *Pathol Biol (Paris)* 52:89–92. doi: 10.1016/j.patbio.2003.04.007
- Archer J, Solomon F (1994) Deconstructing the microtubule-organizing center. *Cell* 76:589–591. doi: 10.1016/0092-8674(94)90496-0
- Asante D, Stevenson NL, Stephens DJ (2014) Subunit composition of the human cytoplasmic dynein-2 complex. *J Cell Sci*. doi: 10.1242/jcs.159038
- Ayoub AT, Craddock TJA, Klobukowski M, Tuszyński J (2014) Analysis of the strength of interfacial hydrogen bonds between tubulin dimers using quantum theory of atoms in molecules. *Biophys J* 107:740–50. doi: 10.1016/j.bpj.2014.05.047
- Bailey CJ, Crystal RG, Philip L, Leopold PL (2003) Association of Adenovirus with the Microtubule Organizing Center Association of Adenovirus with the Microtubule Organizing Center. doi: 10.1128/JVI.77.24.13275
- Barbar E, Nyarko A (2014) NMR Characterization of Self-Association Domains Promoted by Interactions with LC8 Hub Protein. *Comput Struct Biotechnol J* 9:e201402003. doi: 10.5936/csbj.201402003
- Barten DM, Fanara P, Andorfer C, et al (2012) Hyperdynamic microtubules, cognitive deficits, and pathology are improved in tau transgenic mice with low doses of the microtubule-stabilizing agent BMS-241027. *J Neurosci* 32:7137–45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0188-12.2012
- Basagoudanavar SH, Perlman DH, Hu J (2007) Regulation of hepadnavirus reverse transcription by dynamic nucleocapsid phosphorylation. *J Virol* 81:1641–1649.
- Bauch A, Campbell KS, Reth M (1998) Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase I δ . *Eur J Immunol* 28:2167–77.
- Beck J, Nassal M (2007) Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 13:48–64.
- Benison G, Barbar E (2009) NMR analysis of dynein light chain dimerization and interactions with diverse ligands. *Methods Enzymol* 455:237–58. doi: 10.1016/S0076-6879(08)04209-2
- Berezuk MA, Schroer TA (2007) Dynactin enhances the processivity of kinesin-2. *Traffic* 8:124–9. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00517.x
- Bicek AD, Tüzel E, Demtchouk A, et al (2009) Anterograde microtubule transport drives microtubule bending in LLC-PK1 epithelial cells. *Mol Biol Cell* 20:2943–53. doi: 10.1091/mbc.E08-09-0909

- Birnbaum F, Nassal M (1990) Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core. *J. Virol.* 64:
- Black MM, Baas PW (1989) The basis of polarity in neurons. *Trends Neurosci* 12:211–4.
- Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, et al (1967) A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 66:924–931.
- Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C (1999) Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* 29:1236–47. doi: 10.1002/hep.510290426
- Bodor A, Radnai L, Hetényi C, et al (2014) DYNLL2 dynein light chain binds to an extended linear motif of myosin 5a tail that has structural plasticity. *Biochemistry.* doi: 10.1021/bi500574z
- Böhm KJ, Vater W, Fenske H, Unger E (1984) Effect of microtubule-associated proteins on the protofilament number of microtubules assembled in vitro. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 800:119–126. doi: 10.1016/0304-4165(84)90049-7
- Boscht C, Cronk JD, Pirolet F, et al (1996) Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2125–30.
- Bottcher B, Wynne SA, Crowther RA (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386:88–91.
- Bray D, Thomas C (1975) The actin content of fibroblasts. *Biochem J* 147:221–8.
- Brinkley BR, Cartwright J (1975) COLD-LABILE AND COLD-STABLE MICROTUBULES IN THE MITOTIC SPINDLE OF MAMMALIAN CELLS. *Ann N Y Acad Sci* 253:428–439. doi: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb19218.x
- Brown AK, Hunt SD, Stephens DJ (2014) Opposing microtubule motors control motility, morphology and cargo segregation during ER-to-Golgi transport. *Biol Open* 3:307–13. doi: 10.1242/bio.20147633
- Brown CL, Maier KC, Stauber T, et al (2005) Kinesin-2 is a motor for late endosomes and lysosomes. *Traffic* 6:1114–24. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00347.x
- 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* 71:9350–9357.
- Bruss V (2004) Processing of hepatitis B virus surface proteins. *Methods Mol Med* 95:189–98. doi: 10.1385/1-59259-669-X:189
- Bruss V, Ganem D (1991) The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1059–1063.
- Buckwold VE, Chen M, Ou JH (1997) Interaction of transcription factors RFX1 and MIBP1 with the gamma motif of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter. *Virology* 227:515–8. doi: 10.1006/viro.1996.8360
- Budkowska A, Bedossa P, Groh F, 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* 69:840–848.

- Buée L, Bussière T, Buée-Scherrer V, et al (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders¹¹These authors contributed equally to this work. *Brain Res Rev* 33:95–130. doi: 10.1016/S0165-0173(00)00019-9
- Burns RG (1991) Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil Cytoskeleton* 20:181–9. doi: 10.1002/cm.970200302
- Burrell CJ, Mackay P, Greenaway PJ, et al (1979) Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322. *Nature* 279:43–7.
- Can S, Dewitt MA, Yildiz A (2014) Bidirectional helical motility of cytoplasmic dynein around microtubules. *Elife* 3:e03205. doi: 10.7554/eLife.03205
- Cao F, Tavis JE (2004) Detection and characterization of cytoplasmic hepatitis B virus reverse transcriptase. *J Gen Virol* 85:3353–60. doi: 10.1099/vir.0.80297-0
- Cattaneo R, Will H, Schaller H (1984) Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *Embo J* 3:2191–2196.
- Ceres P, Zlotnick A (2002) Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry* 41:11525–11531. doi: 10.1021/bi0261645
- Chang P, Giddings TH, Winey M, Stearns T (2003) Epsilon-tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nat Cell Biol* 5:71–6. doi: 10.1038/ncb900
- Chang SF, Netter HJ, Hildt E, et al (2001) Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame. *J Virol* 75:161–170.
- Chen C, Wang JC-Y, Zlotnick A (2011) A kinase chaperones hepatitis B virus capsid assembly and captures capsid dynamics in vitro. *PLoS Pathog* 7:e1002388. doi: 10.1371/journal.ppat.1002388
- Chen Y-M, Gerwin C, Sheng Z-H (2009) Dynein light chain LC8 regulates syntaphilin-mediated mitochondrial docking in axons. *J Neurosci* 29:9429–38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1472-09.2009
- Chen Z-Y, Cheng A-C, Wang M-S, et al (2007) Antiviral effects of PNA in duck hepatitis B virus infection model. *Acta Pharmacol Sin* 28:1652–8. doi: 10.1111/j.1745-7254.2007.00641.x
- Choi J-W, Lee J-H, Kim Y-S (2012) Expression of β -tubulin isotypes in classical Hodgkin's lymphoma. *Pathol Int* 62:287–90. doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02785.x
- Chook YM, Blobel G (2001) Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11:703–715.
- Chrétien D, Fuller SD, Karsenti E, et al (1995) Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol* 129:1311–28.
- Chu CM, Liaw YF (1997) Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 12:S218–22.
- Chuang J-Z, Yeh T-Y, Bollati F, et al (2005) The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Dev Cell* 9:75–86. doi: 10.1016/j.devcel.2005.04.003
- Cleary FB, Dewitt MA, Bilyard T, et al (2014) Tension on the linker gates the ATP-dependent release of dynein from microtubules. *Nat Commun* 5:4587. doi: 10.1038/ncomms5587
- Cohen BJ, Richmond JE (1982) Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*. *Nature* 296:677–679.

- Cohen S, Au S, Panté N (2009) Microinjection of *Xenopus laevis* oocytes. *J Vis Exp* e1106–e1106. doi: 10.3791/1106
- Cohen S, Marr AK, Garcin P, Pante N (2011) Nuclear envelope disruption involving host caspases plays a role in the parvovirus replication cycle. *J Virol* 85:4863–4874. doi: 10.1128/JVI.01999-10
- Cohen S, Pante N (2005) Pushing the envelope: microinjection of Minute virus of mice into *Xenopus* oocytes causes damage to the nuclear envelope. *J Gen Virol* 86:3243–3252.
- Cole NB, Lippincott-Schwartz J (1995) Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr Opin Cell Biol* 7:55–64.
- Conde C, Cáceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319–32. doi: 10.1038/nrn2631
- Condeelis J (2001) How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol* 11:288–293. doi: 10.1016/S0962-8924(01)02008-6
- Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, et al (1997) Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature* 386:91–4. doi: 10.1038/386091a0
- Cooper A, Shaul Y (2006) Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. *J Biol Chem*
- Cramer LP (1997) Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force. *J Cell Biol* 136:1287–1305. doi: 10.1083/jcb.136.6.1287
- Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, et al (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 158:915–927. doi: 10.1083/jcb.200206106
- Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, et al (1994) Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77:943–950.
- D'Angelo MA, Hetzer MW (2008) Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* 18:456–66. doi: 10.1016/j.tcb.2008.07.009
- Dallai R, Lupetti P, Mencarelli C (2006) Unusual axonemes of hexapod spermatozoa. *Int Rev Cytol* 254:45–99. doi: 10.1016/S0074-7696(06)54002-1
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1:695–698.
- Daub H, Blencke S, Habenberger P, et al (2002) Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 76:8124–37.
- David R (2010) Cytoskeleton: baculoviruses “ride” actin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:606. doi: 10.1038/nrm2961
- Davison F, Alexander GJM, Trowbridge R, et al (1987) Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. *J Hepatol* 4:37–44. doi: 10.1016/S0168-8278(87)80007-7
- Day CL, Puthalakath H, Skea G, et al (2004) Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *605:597–605*.
- De Forges H, Bouissou A, Perez F (2012) Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol* 44:266–74. doi: 10.1016/j.biocel.2011.11.009

- De Forges H, Pilon A, Poüs C, Perez. F (2013) Imaging GTP-bound tubulin: from cellular to in vitro assembled microtubules. *Methods Cell Biol* 115:139–53. doi: 10.1016/B978-0-12-407757-7.00010-4
- De Wit NJW, Verschuure P, Kappé G, et al (2004) Testis-specific human small heat shock protein HSPB9 is a cancer/testis antigen, and potentially interacts with the dynein subunit TCTEL1. *Eur J Cell Biol* 83:337–45. doi: 10.1078/0171-9335-00396
- Deacon SW, Serpinskaya AS, Vaughan PS, et al (2003) Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol* 160:297–301. doi: 10.1083/jcb.200210066
- Dehesa-Violante M, Nuñez-Nateras R (2007) Epidemiology of hepatitis virus B and C. *Arch Med Res* 38:606–11. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.03.001
- Des Georges A, Katsuki M, Drummond DR, et al (2008) Mal3, the *Schizosaccharomyces pombe* homolog of EB1, changes the microtubule lattice. *Nat Struct Mol Biol* 15:1102–8. doi: 10.1038/nsmb.1482
- Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:83–117. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.83
- Desfarges S, Salin B, Calmels C, et al (2009) HIV-1 integrase trafficking in *S. cerevisiae*: a useful model to dissect the microtubule network involvement of viral protein nuclear import. *Yeast* 26:39–54. doi: 10.1002/yea.1651
- DeWitt M, Schenkel T, Yildiz A (2014) Fluorescence tracking of motor proteins in vitro. *EXS* 105:211–34. doi: 10.1007/978-3-0348-0856-9_10
- Dicthenberg JB, Zimmerman W, Sparks CA, et al (1998) Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol* 141:163–74.
- Diefenbach RJ, Mackay JP, Armati PJ, Cunningham AL (1998) The C-terminal region of the stalk domain of ubiquitous human kinesin heavy chain contains the binding site for kinesin light chain. *Biochemistry* 37:16663–70. doi: 10.1021/bi981163r
- Dillman JF, Pfister KK (1994) Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles. *J Cell Biol* 127:1671–81.
- Dimitrov A, Quesnoit M, Moutel S, et al (2008) Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* 322:1353–6. doi: 10.1126/science.1165401
- Dodding MP, Way M (2011) Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *EMBO J* 30:3527–39. doi: 10.1038/emboj.2011.283
- Döhner K, Wolfstein A, Prank U, et al (2002) Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* 13:2795–809. doi: 10.1091/mbc.01-07-0348
- Dominguez R, Holmes KC (2011) Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 40:169–86. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359
- Donello JE, Beeche AA, Smith GJ rd, et al (1996) The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements. *J Virol* 70:4345–4351.
- Dorsett M, Schedl T (2009) A role for dynein in the inhibition of germ cell proliferative fate. *Mol Cell Biol* 29:6128–39. doi: 10.1128/MCB.00815-09

- Douglas MW, Diefenbach RJ, Homa FL, et al (2004) Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem* 279:28522–30. doi: 10.1074/jbc.M311671200
- Doxsey SJ, Stein P, Evans L, et al (1994) Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* 76:639–650. doi: 10.1016/0092-8674(94)90504-5
- Eriksson JE, Dechat T, Grin B, et al (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 119:1763–71. doi: 10.1172/JCI38339
- Ewing RM, Chu P, Elisma F, et al (2007) Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3:89. doi: 10.1038/msb4100134
- Faller EM, Villeneuve TS, Brown DL (2009) MAP1a associated light chain 3 increases microtubule stability by suppressing microtubule dynamics. *Mol Cell Neurosci* 41:85–93. doi: 10.1016/j.mcn.2009.02.001
- Fallows DA, Goff SP (1995) Mutations in the epsilon sequences of human hepatitis B virus affect both RNA encapsidation and reverse transcription. *J Virol* 69:3067–3073.
- Fan J-S (1998) Protein Inhibitor of Neuronal Nitric-oxide Synthase, PIN, Binds to a 17-Amino Acid Residue Fragment of the Enzyme. *J Biol Chem* 273:33472–33481. doi: 10.1074/jbc.273.50.33472
- Fejtova A, Davydova D, Bischof F, et al (2009) Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon. *J Cell Biol* 185:341–55. doi: 10.1083/jcb.200807155
- Ferrando-May E, Cordes V, Biller-Ckovic I, 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* 8:495–505. doi: 10.1038/sj.cdd.4400837
- Flodell S, Schleucher J, Cromsigt J, et al (2002) The apical stem-loop of the hepatitis B virus encapsidation signal folds into a stable tri-loop with two underlying pyrimidine bulges. *Nucleic Acids Res* 30:4803–4811.
- Florin L, Becker KA, Lambert C, et al (2006) Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein I2. *J Virol* 80:6691–6. doi: 10.1128/JVI.00057-06
- Freivalds J, Dislers A, Ose V, et al (2011) Highly efficient production of phosphorylated hepatitis B core particles in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 75:218–24. doi: 10.1016/j.pep.2010.09.010
- Fridolfsson HN, Ly N, Meyerzon M, Starr DA (2010) UNC-83 coordinates kinesin-1 and dynein activities at the nuclear envelope during nuclear migration. *Dev Biol* 338:237–50. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.12.004
- Füchtbauer A, Herrmann M, Mandelkow EM, Jockusch BM (1985) Disruption of microtubules in living cells and cell models by high affinity antibodies to beta-tubulin. *EMBO J* 4:2807–14.
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, et al (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281:646–650.
- Galigniana MD, Harrell JM, O'Hagen HM, et al (2004) Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. *J Biol Chem* 279:22483–9. doi: 10.1074/jbc.M402223200

- Gallego P, Velazquez-Campoy A, Regué L, et al (2013) Structural analysis of the regulation of the DYNLL/LC8 binding to Nek9 by phosphorylation. *J Biol Chem* 288:12283–94. doi: 10.1074/jbc.M113.459149
- García-Mayoral MF, Martínez-Moreno M, Albar JP, et al (2010) Structural basis for the interaction between dynein light chain 1 and the glutamate channel homolog GRINL1A. *FEBS J* 277:2340–50. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07649.x
- Garreau de Loubresse N, Ruiz F, Beisson J, et al (2001) Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of Paramecium basal bodies. *BMC Cell Biol* 2:4. doi: 10.1186/1471-2121-2-4
- Gazina E V, 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* 74:4721–8.
- Gelfand VI, Bershadsky AD (1991) Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu Rev Cell Biol* 7:93–116. doi: 10.1146/annurev.cb.07.110191.000521
- Gennerich A, Carter AP, Reck-Peterson SL, Vale RD (2007) Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein. *Cell* 131:952–65. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.016
- Gerelsaikhan T, Tavis JE, Bruss V (1996) Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* 70:4269–4274.
- Gindhart JG (2006) Towards an understanding of kinesin-1 dependent transport pathways through the study of protein-protein interactions. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5:74–86. doi: 10.1093/bfgp/ell002
- Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J (1993) Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* 120:923–34.
- Glebe D, Urban S (2007) Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13:22–38.
- Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, et al (2005) A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* 34:1329–39. doi: 10.1093/ije/dyi206
- Granger E, McNee G, Allan V, Woodman P (2014) The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Semin Cell Dev Biol* 31:20–9. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.011
- Grego S, Cantillana V, Salmon ED (2001) Microtubule treadmilling in vitro investigated by fluorescence speckle and confocal microscopy. *Biophys J* 81:66–78. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75680-9
- Gripon P, Diot C, Theze N, et al (1988) Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* 62:4136–4143.
- Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, et al (1995) Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 213:292–299. doi: 10.1006/viro.1995.0002
- Gripon P, Rumin S, Urban S, et al (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15655–15660.
- Haga T, Abe T, Kurokawa M (1974) Polymerization and depolymerization of microtubules in vitro as studied by flow birefringence. *FEBS Lett* 39:291–295. doi: 10.1016/0014-5793(74)80133-X

- Hall J, Hall A, Pursifull N, Barbar E (2008) Differences in dynamic structure of LC8 monomer, dimer, and dimer-peptide complexes. *Biochemistry* 47:11940–52. doi: 10.1021/bi801093k
- Hall J, Karplus PA, Barbar E (2009) Multivalency in the assembly of intrinsically disordered Dynein intermediate chain. *J Biol Chem* 284:33115–21. doi: 10.1074/jbc.M109.048587
- Hanz S, Fainzilber M (2006) Retrograde signaling in injured nerve--the axon reaction revisited. *J Neurochem* 99:13–9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04089.x
- Hanz S, Perlson E, Willis D, et al (2003) Axoplasmic Importins Enable Retrograde Injury Signaling in Lesioned Nerve. *Neuron* 40:1095–1104. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00770-0
- Hernández B, Tarragó T, Giralt E, et al (2010) Small peptide inhibitors disrupt a high-affinity interaction between cytoplasmic dynein and a viral cargo protein. *J Virol* 84:10792–801. doi: 10.1128/JVI.01168-10
- Herzig RP, Andersson U, Scarpulla RC (2000) Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and drosophila. *J Cell Sci* 113 Pt 23:4263–73.
- Hetzer MW, Walther TC, Mattaj IW (2005) Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:347–380. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151152
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68:610–38. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.039
- Hirokawa N, Noda Y (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88:1089–1118. doi: 10.1152/physrev.00023.2007
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:682–96. doi: 10.1038/nrm2774
- Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:201–14. doi: 10.1038/nrn1624
- Hódi Z, Németh AL, Radnai L, et al (2006) Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry* 45:12582–95. doi: 10.1021/bi060991e
- Horgan CP, Hanscom SR, McCaffrey MW (2011) Dynein LIC1 localizes to the mitotic spindle and midbody and LIC2 localizes to spindle poles during cell division. *Cell Biol Int* 35:171–8. doi: 10.1042/CBI20100284
- Howard J, Hyman AA (2009) Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:569–74. doi: 10.1038/nrm2713
- Hu J, Toft DO, Seeger C (1997) Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO-J* 16:59–68.
- Huang ZM, Yen TS (1995) Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol* 15:3864–3869.
- Huovila AP, Eder AM, Fuller SD (1992) Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 118:1305–1320.

- Hutchins JRA, Toyoda Y, Hegemann B, et al (2010) Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science* 328:593–9. doi: 10.1126/science.1181348
- Hwang YK, Kim NK, Park JM, et al (2002) HLA-A2 1 restricted peptides from the HBx antigen induce specific CTL responses in vitro and in vivo. *Vaccine* 20:3770–7.
- Inclán YF, Nogales E (2001) Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin. *J Cell Sci* 114:413–22.
- Jacob Y, Badrane H, Ceccaldi P-EE, Tordo N (2000) Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol* 74:10217–10222. doi: 10.1128/JVI.74.21.10217-10222.2000
- Jékely G, Arendt D (2006) Evolution of intraflagellar transport from coated vesicles and autogenous origin of the eukaryotic cilium. *Bioessays* 28:191–8. doi: 10.1002/bies.20369
- Jiang J, Yu L, Huang X, et al (2001) Identification of two novel human dynein light chain genes, DNLC2A and DNLC2B, and their expression changes in hepatocellular carcinoma tissues from 68 Chinese patients. *Gene* 281:103–113. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00787-9
- Job D, Valiron O, Oakley B (2003) Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol* 15:111–117. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00003-0
- Johnson KA, Borisy GG (1977) Kinetic analysis of microtubule self-assembly in vitro. *J Mol Biol* 117:1–31. doi: 10.1016/0022-2836(77)90020-1
- Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4:253–65. doi: 10.1038/nrc1317
- Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, et al (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347:37–44. doi: 10.1038/347037a0
- Kaiser FJ (2003) Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor suppresses the transcriptional repression activity of TRPS1. *Hum Mol Genet* 12:1349–1358. doi: 10.1093/hmg/ddg145
- Kalcheva N, Albala J, O'Guin K, et al (1995) Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10894–8.
- Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311:33–38.
- Kanai Y, Okada Y, Tanaka Y, et al (2000) KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J Neurosci* 20:6374–84.
- Kann M, Bischof A, Gerlich WH (1997) In vitro Model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* 71:
- 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.
- Kann M, Lu X, Gerlich WH (1995) Recent studies on replication of hepatitis B virus. *J Hepatol* 22:9–13.
- Kann M, Schmitz A, Rabe B (2007) Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 13:39–47.

- Kann M, Sodeik B, Vlachou A, et al (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 145:45–55.
- Kardon JR, Vale RD (2009) Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:854–65. doi: 10.1038/nrm2804
- Karki S, Holzbaur EL (1999) Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol* 11:45–53. doi: 10.1016/S0955-0674(99)80006-4
- Kau JH, Ting LP (1998) Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* 72:3796–3803.
- Keasler V V, Hodgson AJ, Madden CR, Slagle BL (2007) Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *J Virol* 81:2656–62. doi: 10.1128/JVI.02020-06
- Keminer O, Siebrasse JP, Zerf K, Peters R (1999) Optical recording of signal-mediated protein transport through single nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11842–7.
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH (2002) Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 83:1267–80.
- Kikkawa M, Ishikawa T, Nakata T, et al (1994) Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 127:1965–71.
- Kim H, Binder LI, Rosenbaum JL (1979) The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. *J Cell Biol* 80:266–76.
- Kim J, Wu J (2014) A theoretical study of SRPK interaction with the flexible domains of hepatitis B capsids. *Biophys J* 107:1453–61. doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.032
- Kim KH, Shin H-J, Kim K, et al (2007) Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma. *Gastroenterology* 132:1955–67. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.039
- King SJ, Bonilla M, Rodgers ME, Schroer TA (2002) Subunit organization in cytoplasmic dynein subcomplexes. *Protein Sci* 11:1239–1250. doi: 10.1110/ps.2520102.large
- King SJ, Brown CL, Maier KC, et al (2003) Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. *Mol Biol Cell* 14:5089–97. doi: 10.1091/mbc.E03-01-0025
- King SJ, Schroer TA (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* 2:20–24.
- Kirkpatrick JB, Hyams L, Thomas VL, Howley PM (1970) Purification of intact microtubules from brain. *J Cell Biol* 47:384–94.
- Knaus T, Nassal M (1993) The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function. *Nucleic Acids Res* 21:3967–3975.
- Komarova YA, Akhmanova AS, Kojima S-I, et al (2002) Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J Cell Biol* 159:589–99. doi: 10.1083/jcb.200208058
- Kondo S, Sato-Yoshitake R, Noda Y, et al (1994) KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon. *J Cell Biol* 125:1095–107.
- Königer C, Wingert I, Marsmann M, et al (2014) Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E4244–53. doi: 10.1073/pnas.1409986111

- Korten T, Nitzsche B, Gell C, et al (2011) Fluorescence imaging of single Kinesin motors on immobilized microtubules. *Methods Mol Biol* 783:121–37. doi: 10.1007/978-1-61779-282-3_7
- Kosovskiy MJ, Huan B, Siddiqui A (1996) Purification and properties of rat liver nuclear proteins that interact with the hepatitis B virus enhancer 1. *J Biol Chem* 271:21859–21869.
- Kramvis A, Kew M, François G (2005) Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23:2409–23. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.10.045
- Kramvis A, Kew MC (1999) The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 6:415–27.
- Kramvis A, Kew MC (1998) Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae. *J Viral Hepat* 5:357–367.
- Kubota T, Matsuoka M, Chang T-H, et al (2009) Ebolavirus VP35 interacts with the cytoplasmic dynein light chain 8. *J Virol* 83:6952–6. doi: 10.1128/JVI.00480-09
- Lai C-L, Yuen M-F (2007) The natural history of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 14 Suppl 1:6–10. doi: 10.1111/j.1365-2893.2007.00909.x
- Lajoix A-D, Gross R, Aknin C, et al (2004) Cellulose membrane supported peptide arrays for deciphering protein-protein interaction sites: the case of PIN, a protein with multiple natural partners. *Mol Divers* 8:281–90.
- Lambert C, Doring T, 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 YT, Li J, Liao W, Ou J (1999) Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology* 259:342–348.
- Laure F, Zagury D, Saimot AG, et al (1985) Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS and AIDS-related complex. *Science* (80-) 229:561–563.
- Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, et al (2004) A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 167:19–22. doi: 10.1083/jcb.200408113
- Le Pogam S, Chua PK, Newman M, Shih C (2005) Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173). *J Virol* 79:1871–1887.
- Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, et al (1998) Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol* 72:5573–8.
- Lebray P, Vallet-Pichard A, Michel M-L, et al (2003) Immunomodulatory drugs and therapeutic vaccine in chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 39 Suppl 1:S151–9.
- Lee J, Shin M-K, Lee H-J, et al (2004) Three novel cis-acting elements required for efficient plus-strand DNA synthesis of the hepatitis B virus genome. *J Virol* 78:7455–64. doi: 10.1128/JVI.78.14.7455-7464.2004
- Lee JE, Yang Y-M, Yuan H, Sehgal PB (2012) Definitive evidence using enucleated cytoplasts for a nongenomic basis for the cystic change in endoplasmic reticulum structure caused by STAT5a/b siRNAs. *Am J Physiol Cell Physiol*. doi: 10.1152/ajpcell.00311.2012
- Lee KW, Tan WS (2008) Recombinant hepatitis B virus core particles: association, dissociation and encapsidation of green fluorescent protein. *J Virol Methods* 151:172–80. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.05.025

- Lempp FA, Urban S (2014) Inhibitors of hepatitis B virus attachment and entry. *Intervirology* 57:151–7. doi: 10.1159/000360948
- Leopold PL, Kreitzer G, Miyazawa N, et al (2000) Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther* 11:151–165.
- Lessman CA, Wang T, Gard DL, Woods CW (1997) Microinjection of anti-alpha-tubulin antibody (DM1A) inhibits progesterone-induced meiotic maturation and deranges the microtubule array in follicle-enclosed oocytes of the frog, *Rana pipiens*. *Zygote* 5:83–95.
- Leterrier JF, Liem RK, Shelanski ML (1982) Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging. *J Cell Biol* 95:982–6.
- Levy JR, Holzbaur ELF (2008) Dynein drives nuclear rotation during forward progression of motile fibroblasts. *J Cell Sci* 121:3187–95. doi: 10.1242/jcs.033878
- Li H-C, Huang E-Y, Su P-Y, et al (2010) Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog* 6:e1001162. doi: 10.1371/journal.ppat.1001162
- Li Z-X, Hong G-Q, Hu B, et al (2007) Suitability of yeast- and *Escherichia coli*-expressed hepatitis B virus core antigen derivatives for detection of anti-HBc antibodies in human sera. *Protein Expr Purif* 56:293–300. doi: 10.1016/j.pep.2007.08.004
- Lightcap CM, Kari G, Arias-Romero LE, et al (2009) Interaction with LC8 is required for Pak1 nuclear import and is indispensable for zebrafish development. *PLoS One* 4:e6025. doi: 10.1371/journal.pone.0006025
- Lightcap CM, Sun S, Lear JD, et al (2008) Biochemical and structural characterization of the Pak1-LC8 interaction. *J Biol Chem* 283:27314–24. doi: 10.1074/jbc.M800758200
- Liou W, Sung YJ, Tao MH, Lo SJ (2008) Morphogenesis of the hepatitis B virion and subviral particles in the liver of transgenic mice. *J Biomed Sci* 15:311–316.
- Little M, Seehaus T (1988) Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp Biochem Physiol B* 90:655–70.
- Liu Y, Sturgis CD, Grzybicki DM, et al (2001) Microtubule-associated protein-2: a new sensitive and specific marker for pulmonary carcinoid tumor and small cell carcinoma. *Mod Pathol* 14:880–5. doi: 10.1038/modpathol.3880406
- Lo KW, Naisbitt S, Fan JS, et al (2001) The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif. *J Biol Chem* 276:14059–66. doi: 10.1074/jbc.M010320200
- Lo KW-H, Kan H-M, Chan L-N, et al (2005) The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation. *J Biol Chem* 280:8172–9. doi: 10.1074/jbc.M411408200
- Lo KW-H, Kogoy JM, Rasoul BA, et al (2007) Interaction of the DYNLT (TCTEX1/RP3) light chains and the intermediate chains reveals novel intersubunit regulation during assembly of the dynein complex. *J Biol Chem* 282:36871–8. doi: 10.1074/jbc.M705991200
- Lodish H (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th edition.
- Lopez de Heredia M, Jansen R-PP, López de Heredia M (2004) mRNA localization and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 16:80–85. doi: 10.1016/j.ceb.2003.11.002

- Löschberger A, Franke C, Krohne G, et al (2014) Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy of the nuclear pore complex with molecular resolution. *J Cell Sci* jcs.156620–. doi: 10.1242/jcs.156620
- Löwe J, Li H, Downing KH, Nogales E (2001) Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 313:1045–57. doi: 10.1006/jmbi.2001.5077
- Luby-Phelps K (1994) Physical properties of cytoplasm. *Curent Opin cell Biol* 6:3–9.
- Luby-Phelps K (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol* 192:189–221.
- Luby-Phelps K (2013) The physical chemistry of cytoplasm and its influence on cell function: an update. *Mol Biol Cell* 24:2593–6. doi: 10.1091/mbc.E12-08-0617
- Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, et al (2011) Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 55:996–1003. doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.015
- Lucifora J, Durantel D, Belloni L, et al (2008) Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector. *J Gen Virol* 89:1819–1828.
- Ludgate L, Adams C, Hu J (2011) Phosphorylation state-dependent interactions of hepadnavirus core protein with host factors. *PLoS One* 6:e29566. doi: 10.1371/journal.pone.0029566
- Ludgate L, Ning X, Nguyen DH, et al (2012) Cyclin-dependent kinase 2 phosphorylates s/t-p sites in the hepadnavirus core protein C-terminal domain and is incorporated into viral capsids. *J Virol* 86:12237–50. doi: 10.1128/JVI.01218-12
- Lukashok SA, Tarassishin L, Li Y, Horwitz MS (2000) An adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis complexes with dynein and a small GTPase. *J Virol* 74:4705–9.
- Machado RD, Rudarakanchana N, Atkinson C, et al (2003) Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of Dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 12:3277–86. doi: 10.1093/hmg/ddg365
- Macovei A, Radulescu C, Lazar C, et al (2010) Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J Virol* 84:243–253.
- Mallik R, Carter BC, Lex SA, et al (2004) Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* 427:649–52. doi: 10.1038/nature02293
- Malmassari S, Lone YC, Zhang M, et al (2005) In vivo hierarchy of immunodominant and subdominant HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of HBx antigen of hepatitis B virus. *Microbes Infect* 7:626–34. doi: 10.1016/j.micinf.2004.12.022
- Mandelkow E, Mandelkow E-M (2002) Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol* 12:585–91.
- Mandelkow EM (1995) Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7:72–81.
- Mangold CM, Streeck RE (1993) Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* 67:4588–4597.
- Marcellin P, Asselah T, Boyer N (2005) Treatment of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 12:333–45. doi: 10.1111/j.1365-2893.2005.00599.x
- Margolis RL (1981) Role of GTP hydrolysis in microtubule treadmilling and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:1586–90.

- Margolis RL, Wilson L (1981) Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature* 293:705–11.
- Martínez-Moreno M, Navarro-Lérida I, Roncal F, et al (2003) Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS Lett* 544:262–267. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00516-7
- Mason AL, Wick M, White HM, et al (1993) Increased hepatocyte expression of hepatitis B virus transcription in patients with features of fibrosing cholestatic hepatitis. *Gastroenterology* 105:237–244.
- Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, et al (1976) Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet* 1:1367–70.
- McBeath E, Fujiwara K (1990) Microtubule detachment from the microtubule-organizing center as a key event in the complete turnover of microtubules in cells. *Eur J Cell Biol* 52:1–16.
- McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, et al (2002) Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159:441–52. doi: 10.1083/jcb.200203150
- McIntosh JR, Mophew MK, Grissom PM, et al (2009) Lattice structure of cytoplasmic microtubules in a cultured Mammalian cell. *J Mol Biol* 394:177–82. doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.033
- McIntosh JR, Porter KR (1967) Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. *J Cell Biol* 35:153–73.
- McKenney RJ, Huynh W, Tanenbaum ME, et al (2014) Activation of cytoplasmic dynein motility by dynactin-cargo adapter complexes. *Science* (80-) 345:337–341. doi: 10.1126/science.1254198
- Meads T, Schroer TA (1995) Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 32:273–88. doi: 10.1002/cm.970320404
- Megiorni F, Mora B, Indovina P, Mazzilli MC (2005) Expression of neuronal markers during NTera2/cloneD1 differentiation by cell aggregation method. *Neurosci Lett* 373:105–9. doi: 10.1016/j.neulet.2004.09.070
- Melegari M, Bruss V, Gerlich WH (1991) The arginine-rich carboxyterminal domain is necessary for RNA packaging by hepatitis B core protein. *Viral Hepat Liver Dis* 164–168.
- Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ (2005) Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 79:9810–20. doi: 10.1128/JVI.79.15.9810-9820.2005
- Merino-Gracia J, García-Mayoral MF, Rodríguez-Crespo I (2011) The association of viral proteins with host cell dynein components during virus infection. *FEBS J* 278:2997–3011. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08252.x
- Messageot F, Salhi S, Eon P, Rossignol J-M (2003) Proteolytic processing of the hepatitis B virus e antigen precursor. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* 278:891–5. doi: 10.1074/jbc.M207634200
- Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G (1997) The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J* 16:3587–98. doi: 10.1093/emboj/16.12.3587

- Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N (2001) All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7004–11. doi: 10.1073/pnas.111145398
- Miller RH, Tran CT, Robinson WS (1984) Hepatitis B virus particles of plasma and liver contain viral DNA-RNA hybrid molecules. *Virology* 139:53–63.
- Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S (2000) The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol* 10:865–868. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00600-X
- Mitchell DR (2007) The evolution of eukaryotic cilia and flagella as motile and sensory organelles. *Adv Exp Med Biol* 607:130–40. doi: 10.1007/978-0-387-74021-8_11
- Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237–42.
- Mogensen MM, Mackie JB, Doxsey SJ, et al (1997) Centrosomal deployment of gamma-tubulin and pericentrin: evidence for a microtubule-nucleating domain and a minus-end docking domain in certain mouse epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 36:276–90. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1997)36:3<276::AID-CM8>3.0.CO;2-5
- Mok YK, Lo KW, Zhang M (2001) Structure of Tctex-1 and its interaction with cytoplasmic dynein intermediate chain. *J Biol Chem* 276:14067–74. doi: 10.1074/jbc.M011358200
- Mollinedo F, Gajate C (2003) Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8:413–50.
- Mueller S, Cao X, Welker R, Wimmer E (2002) Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *J Biol Chem* 277:7897–904. doi: 10.1074/jbc.M111937200
- Mühlhäusser P, Müller EC, Otto A, Kutay U (2001) Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep* 2:690–6. doi: 10.1093/embo-reports/kve168
- Myers KR, Lo KW-H, Lye RJ, et al (2007) Intermediate chain subunit as a probe for cytoplasmic dynein function: biochemical analyses and live cell imaging in PC12 cells. *J Neurosci Res* 85:2640–7. doi: 10.1002/jnr.21213
- Nadano D, Nakayama J, Matsuzawa S-I, et al (2002) Human tastin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton. *Biochem J* 364:669–77. doi: 10.1042/BJ20011836
- Nagano F, Orita S, Sasaki T, et al (1998) Interaction of Doc2 with tctex-1, a light chain of cytoplasmic dynein. Implication in dynein-dependent vesicle transport. *J Biol Chem* 273:30065–8.
- Navarro-Lérida I, Martínez Moreno M, Roncal F, et al (2004) Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8. *Proteomics* 4:339–46. doi: 10.1002/pmic.200300528
- Neurath AR, Strick N (1994) The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology* 204:475–477.
- Niclas J, Allan VJ, Vale RD (1996) Cell cycle regulation of dynein association with membranes modulates microtubule-based organelle transport. *J Cell Biol* 133:585–93.
- Niepmann M, Petersen A, Meyer K, Beck E (1997) Functional involvement of polypyrimidine tract-binding protein in translation initiation complexes with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 71:8330–9.

- Nikulina K, Patel-King RS, Takebe S, et al (2004) The Roadblock light chains are ubiquitous components of cytoplasmic dynein that form homo- and heterodimers. *Cell Motil Cytoskeleton* 57:233–45. doi: 10.1002/cm.10172
- Ning X, Nguyen D, Mentzer L, et al (2011) Secretion of genome-free hepatitis B virus--single strand blocking model for virion morphogenesis of para-retrovirus. *PLoS Pathog* 7:e1002255. doi: 10.1371/journal.ppat.1002255
- Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH (1999) High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell* 96:79–88. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80961-7
- Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391:199–203. doi: 10.1038/34465
- Nomura M, Inaba K, Morisawa M (2000) Cyclic AMP- and calmodulin-dependent phosphorylation of 21 and 26 kDa proteins in axoneme is a prerequisite for SAAF-induced motile activation in ascidian spermatozoa. *Dev Growth Differ* 42:129–138. doi: 10.1046/j.1440-169x.2000.00489.x
- Nyarko A, Barbar E (2011) Light chain-dependent self-association of dynein intermediate chain. *J Biol Chem* 286:1556–66. doi: 10.1074/jbc.M110.171686
- Nyarko A, Cochrun L, Norwood S, et al (2005) Ionization of His 55 at the dimer interface of dynein light-chain LC8 is coupled to dimer dissociation. *Biochemistry* 44:14248–55. doi: 10.1021/bi0512694
- Nyarko A, Hare M, Hays TS, Barbar E (2004) The intermediate chain of cytoplasmic dynein is partially disordered and gains structure upon binding to light-chain LC8. *Biochemistry* 43:15595–603. doi: 10.1021/bi048451+
- Nyarko A, Song Y, Nováček J, et al (2013) Multiple recognition motifs in nucleoporin nup159 provide a stable and rigid nup159-dyn2 assembly. *J Biol Chem* 288:2614–22. doi: 10.1074/jbc.M112.432831
- Ohkawa T, Volkman LE, Welch MD (2010) Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J Cell Biol* 190:187–95. doi: 10.1083/jcb.201001162
- Oiwa K, Sakakibara H (2005) Recent progress in dynein structure and mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 17:98–103. doi: 10.1016/j.ceb.2004.12.006
- Oka MT, Arai T, Hamaguchi Y (1990) Microinjection of the monoclonal anti-tubulin antibody YL1/2 inhibits cleavage of sand dollar eggs. *Cell Struct Funct* 15:373–8.
- Okamura SM, Oki-Idouchi CE, Lorenzo PS (2006) The exchange factor and diacylglycerol receptor RasGRP3 interacts with dynein light chain 1 through its C-terminal domain. *J Biol Chem* 281:36132–9. doi: 10.1074/jbc.M605093200
- Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST (2012) Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 30:2212–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.116
- Palmer KJ, Hughes H, Stephens DJ (2009) Specificity of cytoplasmic dynein subunits in discrete membrane-trafficking steps. *Mol Biol Cell* 20:2885–99. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1160
- Panda D, Miller HP, Banerjee A, et al (1994) Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11358–62.

- Panigrahi AK, Zhang N, Otta SK, Pati D (2012) A cohesin-RAD21 interactome. *Biochem J* 442:661–70. doi: 10.1042/BJ20111745
- Panté N (2006) Use of intact *Xenopus* oocytes in nucleocytoplasmic transport studies. *Methods Mol Biol Xenopus Protoc Cell Biol Signal Transduction* 322:301–314.
- Pante N, Kann M (2002) Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm. *Mol Biol Cell* 13:425–34.
- Paschal BM, Shpetner HS, Vallee RB (1991) Purification of brain cytoplasmic dynein and characterization of its in vitro properties. *Methods Enzymol* 196:181–91.
- Patel SS, Belmont BJ, Sante JM, Rexach MF (2007) Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex. *Cell* 129:83–96. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.044
- Patel-King RS, Gilberti RM, Hom EFY, King SM (2013) WD60/FAP163 is a dynein intermediate chain required for retrograde intraflagellar transport in cilia. *Mol Biol Cell* 24:2668–77. doi: 10.1091/mbc.E13-05-0266
- Patient R, Hourieux C, Roingeard P (2009) Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol* 11:1561–70. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01363.x
- Patient R, Hourieux C, Sizaret PY, et al (2007) Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* 81:3842–3851.
- Pazour GJ, Dickert BL, Witman GB (1999) The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol* 144:473–81.
- Pedrotti B, Islam K (1994) Purified native microtubule associated protein MAP1A: kinetics of microtubule assembly and MAP1A/tubulin stoichiometry. *Biochemistry* 33:12463–70.
- Perez F, Diamantopoulos GS, Stalder R, Kreis TE (1999) CLIP-170 Highlights Growing Microtubule Ends In Vivo. *Cell* 96:517–527. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80656-X
- Perrone CA, Tritschler D, Taulman P, et al (2003) A novel dynein light intermediate chain colocalizes with the retrograde motor for intraflagellar transport at sites of axoneme assembly in *Chlamydomonas* and Mammalian cells. *Mol Biol Cell* 14:2041–56. doi: 10.1091/mbc.E02-10-0682
- Peterson DL (1981) Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen. *J Biol Chem* 256:6975–6983.
- Petit C, Giron M-L, Tobaly-Tapiero J, et al (2003) Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci* 116:3433–42. doi: 10.1242/jcs.00613
- Pfister KK, Fisher EMC, Gibbons IR, et al (2005) Cytoplasmic dynein nomenclature. *J Cell Biol* 171:411–413. doi: 10.1083/jcb.200508078
- Pfister KK, Shah PR, Hummerich H, et al (2006) Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genet* 2:e1.
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1985) Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: a cellular cybernetic probe? *Cell Motil* 5:175–93.
- Porwal M, Cohen S, Snoussi K, et al (2013) Parvoviruses cause nuclear envelope breakdown by activating key enzymes of mitosis. *PLoS Pathog* 9:e1003671. doi: 10.1371/journal.ppat.1003671

- Prange R, Streeck RE (1995) Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *Embo J* 14:247–256.
- Pratt MM, Hisanaga S, Begg DA (1984) An improved purification method for cytoplasmic dynein. *J Cell Biochem* 26:19–33. doi: 10.1002/jcb.240260103
- Purohit A, Tynan SH, Vallee R, Doxsey SJ (1999) Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organization. *J Cell Biol* 147:481–92.
- Puthalakath H, Huang DC., O'Reilly LA, et al (1999) The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Mol Cell* 3:287–296. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80456-6
- Rabe B, Delaleau M, Bischof A, 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. doi: 10.1371/journal.ppat.1000563
- Rabe B, Glebe D, Kann M (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* 80:5465–73. doi: 10.1128/JVI.02303-05
- Rabe B, Vlachou A, Pante N, et al (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9849–9854.
- Radnai L, Rapali P, Hódi Z, et al (2010) Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J Biol Chem* 285:38649–57. doi: 10.1074/jbc.M110.165894
- Radziwill G, Tucker W, Schaller H (1990) Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 64:613–620.
- Rall LB, Standring DN, Laub O, Rutter WJ (1983) Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 3:1766–1773.
- Rapali P, García-Mayoral MF, Martínez-Moreno M, et al (2011a) LC8 dynein light chain (DYNLL1) binds to the C-terminal domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its subcellular localization. *Biochem Biophys Res Commun* 414:493–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.093
- Rapali P, Radnai L, Süveges D, et al (2011b) Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome. *PLoS One* 6:e18818. doi: 10.1371/journal.pone.0018818
- Rapali P, Szenes Á, Radnai L, et al (2011c) DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J* 278:2980–96. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08254.x
- Raux H, Flamand A, Blondel D (2000) Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *J Virol* 74:10212–10216.
- Reck-Peterson SL, Yildiz A, Carter AP, et al (2006) Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* 126:335–48. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.046
- Redwine WB, Hernández-López R, Zou S, et al (2012) Structural basis for microtubule binding and release by dynein. *Science* 337:1532–6. doi: 10.1126/science.1224151

- Regué L, Sdelci S, Bertran MT, et al (2011) DYNLL/LC8 protein controls signal transduction through the Nek9/Nek6 signaling module by regulating Nek6 binding to Nek9. *J Biol Chem* 286:18118–29. doi: 10.1074/jbc.M110.209080
- Rodionov VI (1997) Microtubule Treadmilling in Vivo. *Science* (80-) 275:215–218. doi: 10.1126/science.275.5297.215
- Rodriguez-Crespo I, Yelamos B, Roncal F, et al (2001) Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Lett* 503:135–141.
- Rolland D, Gauthier M, Dugua JM, et al (2001) Purification of recombinant HBc antigen expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*: comparison of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 753:51–65.
- Romes EM, Tripathy A, Slep KC (2012) Structure of a yeast Dyn2-Nup159 complex and molecular basis for dynein light chain-nuclear pore interaction. *J Biol Chem* 287:15862–73. doi: 10.1074/jbc.M111.336172
- Ross I, Clarissa C, Giddings TH, Winey M (2013) ϵ -tubulin is essential in *Tetrahymena thermophila* for the assembly and stability of basal bodies. *J Cell Sci* 126:3441–51. doi: 10.1242/jcs.128694
- Ross JL, Shuman H, Holzbaur ELF, Goldman YE (2008) Kinesin and dynein-dynactin at intersecting microtubules: motor density affects dynein function. *Biophys J* 94:3115–25. doi: 10.1529/biophysj.107.120014
- Ross JL, Wallace K, Shuman H, et al (2006) Processive bidirectional motion of dynein-dynactin complexes in vitro. *Nat Cell Biol* 8:562–70. doi: 10.1038/ncb1421
- Roy D, Bhanja Chowdhury J, Ghosh S (2013) Polypyrimidine tract binding protein (PTB) associates with intronic and exonic domains to squelch nuclear export of unspliced RNA. *FEBS Lett* 587:3802–7. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.005
- Rual J-F, Venkatesan K, Hao T, et al (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437:1173–8. doi: 10.1038/nature04209
- Ruiz F, Krzywicka A, Klotz C, et al (2000) The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, η -tubulin. *Curr Biol* 10:1451–1454. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00804-6
- Ruzsics Z, Wagner M, Osterlehner A, et al (2006) Transposon-assisted cloning and traceless mutagenesis of adenoviruses: Development of a novel vector based on species D. *J Virol* 80:8100–8113.
- Saadat I, Higashi H, Obuse C, et al (2007) *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447:330–3. doi: 10.1038/nature05765
- Sachdev P, Menon S, Kastner DB, et al (2007) G protein beta gamma subunit interaction with the dynein light-chain component Tctex-1 regulates neurite outgrowth. *EMBO J* 26:2621–32. doi: 10.1038/sj.emboj.7601716
- Sakato M (2009) Crosslinking methods purification and analysis of crosslinked dynein products. *Methods Cell Biol* 91:161–71. doi: 10.1016/S0091-679X(08)91010-4
- Sarma NJ, Yaseen NR (2013) Dynein Light Chain 1 (DYNLT1) Interacts with Normal and Oncogenic Nucleoporins. *PLoS One* 8:e67032. doi: 10.1371/journal.pone.0067032

- Schek N, Bartenschlager R, Kuhn C, Schaller H (1991) Phosphorylation and rapid turnover of hepatitis B virus X-protein expressed in HepG2 cells from a recombinant vaccinia virus. *Oncogene* 6:1735–1744.
- Scherer J, Vallee RB (2011) Adenovirus recruits dynein by an evolutionary novel mechanism involving direct binding to pH-primed hexon. *Viruses* 3:1417–31. doi: 10.3390/v3081417
- Schmitt H, Littauer UZ (1974) Affinity chromatography of tubulin. *Methods Enzymol* 34:623–7.
- Schmitz A, Schwarz A, Foss M, et al (2010) Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog* 6:e1000741. doi: 10.1371/journal.ppat.1000741
- Schneider M a, Spoden GA, Florin L, Lambert C (2011) Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cell Microbiol* 13:32–46. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01515.x
- Schroer TA (2004) Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:759–779.
- Schulze E, Kirschner M (1987) Dynamic and stable populations of microtubules in cells. *J Cell Biol* 104:277–88.
- Schwalbe M, Ohlenschläger O, Marchanka A, et al (2008) Solution structure of stem-loop alpha of the hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element. *Nucleic Acids Res* 36:1681–1689.
- Schwartz EA, Leonard ML, Bizios R, Bowser SS (1997) Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am J Physiol* 272:F132–8.
- Schwarzer C, Barnikol-Watanabe S, Thinner FP, Hilschmann N (2002) Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1059–70.
- Seifer M, Hamatake R, Bifano M, Standring DN (1998) Generation of replication-competent hepatitis B virus nucleocapsids in insect cells. *J Virol* 72:2765–76.
- 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.
- Seifer M, Zhou S, Standring DN (1993) Recombinant human hepatitis B virus reverse transcriptase is active in the absence of the nucleocapsid or the viral replication origin, DR1. *J Virol* 67:249–257.
- Seiler S, Kirchner J, Horn C, et al (2000) Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nat Cell Biol* 2:333–8. doi: 10.1038/35014022
- Seisenberger G, Ried MU, Endress T, et al (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* (80-) 294:1929–1932.
- Seitz S, Urban S, Antoni C, Bottcher B (2007) Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *Embo J* 26:4160–4167.
- Sells MA, Chen ML, Acs G (1987) Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1005–1009.
- Selzer L, Katen SP, Zlotnick A (2014) The hepatitis B virus core protein intradimer interface modulates capsid assembly and stability. *Biochemistry* 53:5496–504. doi: 10.1021/bi500732b
- Shepard CW, Simard EP, Finelli L, et al (2006) Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 28:112–25. doi: 10.1093/epirev/mxj009

- Shim HY, Quan X, Yi YS, Jung G (2011) Heat shock protein 90 facilitates formation of the HBV capsid via interacting with the HBV core protein dimers. *Virology* 410:161–169.
- Shin Y-C, Park S, Ryu W-S (2011) A conserved arginine residue in the terminal protein domain of hepatitis B virus polymerase is critical for RNA pre-genome encapsidation. *J Gen Virol* 92:1809–16. doi: 10.1099/vir.0.031914-0
- Siomi H, Dreyfuss G (1995) A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* 129:551–560.
- Smith GJ, Donello JE, Luck R, 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* 26:4818–4827.
- Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136:1007–1021.
- Song J, Tyler RC, Lee MS, et al (2005) Solution structure of isoform 1 of Roadblock/LC7, a light chain in the dynein complex. *J Mol Biol* 354:1043–51. doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.017
- Song YH, Mandelkow E (1993) Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1671–5.
- Sorokin SP (1968) Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci* 3:207–30.
- Stahl S, MacKay P, Magazin M, et al (1982) Hepatitis B virus core antigen: synthesis in *Escherichia coli* and application in diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:1606–1610.
- Strandberg DN, Ou JH, Masiarz FR, Rutter WJ (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* 85:8405–8409.
- Stannard LM, Moodie J, Keen GA, Kipps A (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* 26:209–16.
- Stauber T, Simpson JC, Pepperkok R, Vernos I (2006) A role for kinesin-2 in COPI-dependent recycling between the ER and the Golgi complex. *Curr Biol* 16:2245–51. doi: 10.1016/j.cub.2006.09.060
- Stelter P, Kunze R, Flemming D, et al (2007) Molecular basis for the functional interaction of dynein light chain with the nuclear-pore complex. *Nat Cell Biol* 9:788–96. doi: 10.1038/ncb1604
- Stieler JT, Prange R (2014) Involvement of ESCRT-II in hepatitis B virus morphogenesis. *PLoS One* 9:
- Straight AF, Field CM (2000) Microtubules, membranes and cytokinesis. *Curr Biol* 10:R760–R770. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00746-6
- Stray SJ, Johnson JM, Kopeck BG, Zlotnick A (2006) An in vitro fluorescence screen to identify antivirals that disrupt hepatitis B virus capsid assembly. *Nat Biotechnol* 24:358–62. doi: 10.1038/nbt1187
- Stuchell-Brereton MD, Siglin A, Li J, et al (2011) Functional interaction between dynein light chain and intermediate chain is required for mitotic spindle positioning. *Mol Biol Cell* 22:2690–701. doi: 10.1091/mbc.E11-01-0075

- Sui H, Downing KH (2010) Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure* 18:1022–31. doi: 10.1016/j.str.2010.05.010
- Suikkanen S, Aaltonen T, Nevalainen M, et al (2003) Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol* 77:10270–10279. doi: 10.1128/JVI.77.19.10270-10279.2003
- Sun S, Butterworth AH, Paramasivam S, et al (2011) Resonance Assignments and Secondary Structure Analysis of Dynein Light Chain 8 by Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy. *Can J Chem* 89:909–918. doi: 10.1139/v11-030
- Sun S, Yan J, Xia C, et al (2013) Visualizing hepatitis B virus with biarsenical labelling in living cells. *Liver Int.* doi: 10.1111/liv.12419
- Suomalainen M, Nakano MY, Keller S, et al (1999) Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol* 144:657–72.
- Sureau C, Salisse J (2013) A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* 57:985–994.
- Susalka SJ, Nikulina K, Salata MW, et al (2002) The roadblock light chain binds a novel region of the cytoplasmic Dynein intermediate chain. *J Biol Chem* 277:32939–46. doi: 10.1074/jbc.M205510200
- Susalka SJ, Pfister KK Cytoplasmic dynein subunit heterogeneity: implications for axonal transport. *J Neurocytol* 29:819–29.
- Tai a W, Chuang JZ, Sung CH (2001) Cytoplasmic dynein regulation by subunit heterogeneity and its role in apical transport. *J Cell Biol* 153:1499–509.
- Tai AW, Chuang J-Z, Sung C-H (1998) Localization of Tctex-1, a Cytoplasmic Dynein Light Chain, to the Golgi Apparatus and Evidence for Dynein Complex Heterogeneity. *J Biol Chem* 273:19639–19649. doi: 10.1074/jbc.273.31.19639
- Takizawa N, Smith TC, Nebl T, et al (2006) Supervillin modulation of focal adhesions involving TRIP6/ZRP-1. *J Cell Biol* 174:447–58. doi: 10.1083/jcb.200512051
- Tilney LG, DeRosier DJ, Tilney MS (1992) How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement. *J Cell Biol* 118:71–81.
- Tischfield MA, Cederquist GY, Gupta ML, Engle EC (2011) Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr Opin Genet Dev* 21:286–94. doi: 10.1016/j.gde.2011.01.003
- Toba S, Watanabe TM, Yamaguchi-Okimoto L, et al (2006) Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5741–5. doi: 10.1073/pnas.0508511103
- Toledo MAS, Janissen R, Favaro MTP, et al (2012) Development of a recombinant fusion protein based on the dynein light chain LC8 for non-viral gene delivery. *J Control Release* 159:222–31. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.011

- Towns WL, Tauhata SBF, Vaughan PS, Vaughan KT (2009) Transfection-induced defects in dynein-driven transport: evidence that ICs mediate cargo-binding. *Cell Motil Cytoskeleton* 66:80–9. doi: 10.1002/cm.20327
- Troker M, Mücke N, Surrey T (2012) Reconstitution of the human cytoplasmic dynein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:20895–900. doi: 10.1073/pnas.1210573110
- Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD, et al (1988) The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology* 167:630–633.
- Tynan SH, Gee MA, Vallee RB (2000a) Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding. *J Biol Chem* 275:32769–74. doi: 10.1074/jbc.M001537200
- Tynan SH, Purohit A, Doxsey SJ, Vallee RB (2000b) Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin. *J Biol Chem* 275:32763–8. doi: 10.1074/jbc.M001536200
- Urban S, Kruse C, Multhaup G (1999) A soluble form of the avian hepatitis B virus receptor. Biochemical characterization and functional analysis of the receptor ligand complex. *J Biol Chem* 274:5707–5715.
- Uren AG, Wong L, Pakusch M, et al (2000) Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* 10:1319–1328. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00769-7
- Vadlamudi RK, Barnes CJ, Rayala S, et al (2005) p21-Activated Kinase 1 Regulates Microtubule Dynamics by Phosphorylating Tubulin Cofactor B. *25:3726–3736*. doi: 10.1128/MCB.25.9.3726
- Vaillant AR, Muller R, Langkopf A, Brown DL (1998) Characterization of the Microtubule-binding Domain of Microtubule-associated Protein 1A and Its Effects on Microtubule Dynamics. *J Biol Chem* 273:13973–13981. doi: 10.1074/jbc.273.22.13973
- Vale RD (2003a) The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. *Cell* 112:467–480. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00111-9
- Vale RD (2003b) for Intracellular Transport Eukaryotic cells create internal order by using protein. *112:467–480*.
- Vallee RB, Seale GE, Tsai J-W (2009) Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. *Trends Cell Biol* 19:347–55. doi: 10.1016/j.tcb.2009.03.009
- Van Loo ND, Fortunati E, Ehlert E, et al (2001) Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J Virol* 75:961–970.
- Varma D, Dawn A, Ghosh-Roy A, et al (2010) Development and application of in vivo molecular traps reveals that dynein light chain occupancy differentially affects dynein-mediated processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3493–8. doi: 10.1073/pnas.0908959107
- Vaughan S, Attwood T, Navarro M, et al (2000) New tubulins in protozoal parasites. *Curr Biol* 10:R258–R259. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00414-0

- Vlach J, Lipov J, Rumlová M, et al (2008) D-retrovirus morphogenetic switch driven by the targeting signal accessibility to Tctex-1 of dynein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10565–70. doi: 10.1073/pnas.0801765105
- Walter WJ, Brenner B, Steffen W (2010) Cytoplasmic dynein is not a conventional processive motor. *J Struct Biol* 170:266–9. doi: 10.1016/j.jsb.2009.11.011
- Wang GH, Seeger C (1992) The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71:663–670.
- Wang JC-Y, Dhason MS, Zlotnick A (2012) Structural organization of pregenomic RNA and the carboxy-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus. *PLoS Pathog* 8:e1002919. doi: 10.1371/journal.ppat.1002919
- Wang J-Z, Gao X, Wang Z-H (2014) The physiology and pathology of microtubule-associated protein tau. *Essays Biochem* 56:111–23. doi: 10.1042/bse0560111
- Wanka F, Van Zoelen EJJ (2003) Cellular organelle transport and positioning by plasma streaming. *Cell Mol Biol Lett* 8:1035–45.
- Warner FD, Satir P (1973) The substructure of ciliary microtubules. *J Cell Sci* 12:313–26.
- Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, et al (2007) Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10205–10210.
- Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T (2014) NTCP and Beyond: Opening the Door to Unveil Hepatitis B Virus Entry. *Int J Mol Sci* 15:2892–905. doi: 10.3390/ijms15022892
- Watelet B, Quibriac M, Rolland D, et al (2002) Characterization and diagnostic potential of hepatitis B virus nucleocapsid expressed in *E. coli* and *P. pastoris*. *J Virol Methods* 99:99–114. doi: 10.1016/S0166-0934(01)00385-8
- Williams JC, Xie H, Hendrickson WA (2005) Crystal structure of dynein light chain TcTex-1. *J Biol Chem* 280:21981–6. doi: 10.1074/jbc.M414643200
- Wilson MJ, Salata MW, Susalka SJ, Pfister KK (2001) Light chains of mammalian cytoplasmic dynein: identification and characterization of a family of LC8 light chains. *Cell Motil Cytoskeleton* 49:229–40. doi: 10.1002/cm.1036
- Wingfield PT, Stahl SJ, Williams RW, Steven AC (1995) Hepatitis Core Antigen Produced in *Escherichia coli*: Subunit Composition, Conformation Analysis, and in Vitro Capsid Assembly. *Biochemistry* 34:4919–4932. doi: 10.1021/bi00015a003
- Wittkop L, Schwarz A, Cassany A, et al (2010) Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation. *Cell Microbiol* 12:962–75. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01444.x
- Wu H, Maciejewski MW, Takebe S, King SM (2005) Solution structure of the Tctex1 dimer reveals a mechanism for dynein-cargo interactions. *Structure* 13:213–23. doi: 10.1016/j.str.2004.11.013
- Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG (1999) The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* 3:771–780.
- Xiang X, Roghi C, Morris NR (1995) Characterization and localization of the cytoplasmic dynein heavy chain in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9890–4.

- Yamamoto D, Coimbra VC, Okuda K, Rabinovitch M (2006) Enucleated L929 mouse fibroblasts support invasion and multiplication of *Shigella flexneri* 5a. *Braz J Med Biol Res* 39:749–58. doi: /S0100-879X2006000600007
- Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, Hirokawa N (1995) KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J Cell Biol* 130:1387–99.
- Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, Hirokawa N (1996) Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8443–8.
- Yan H, Zhong G, Xu G, et al (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1:1–28. doi: 10.7554/eLife.00049
- Ye GJ, Vaughan KT, Vallee RB, Roizman B (2000) The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol* 74:1355–1363.
- Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH (1993) Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6459–6463.
- Yoshimura M, Sakurai I, Shimoda T, et al (1981) Detection of HBsAg in the pancreas. *Acta Pathol Jpn* 31:711–717.
- Yu X, Jin L, Jih J, et al (2013) 3.5Å cryoEM structure of hepatitis B virus core assembled from full-length core protein. *PLoS One* 8:e69729. doi: 10.1371/journal.pone.0069729
- Yvon AM, Wadsworth P (1997) Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells. *J Cell Sci* 110 (Pt 1:2391–401.
- Zhai Y, Kronebusch PJ, Simon PM, Borisy GG (1996) Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J Cell Biol* 135:201–14.
- Zhang W, Cheng GZ, Gong J, et al (2008) RACK1 and CIS mediate the degradation of BimEL in cancer cells. *J Biol Chem* 283:16416–26. doi: 10.1074/jbc.M802360200
- Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378:578–83. doi: 10.1038/378578a0
- Zhou S, Standing DN (1992) Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10046–10050.
- Zlotnick A, Cheng N, Stahl SJ, 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.
- Zoulim F (2011) Hepatitis: Treatment failure in chronic hepatitis B. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8:366–7. doi: 10.1038/nrgastro.2011.104