

## Interaction et transport des virus à travers le pore nucléaire

Fabien Montel (fabien.montel@ens-lyon.fr)

Cendrine Moskalenko (cendrine.moskalenko@ens-lyon.fr)

Laboratoire de Physique, ENS de Lyon

Chaque famille de virus possède un mode de désassemblage et de libération du génome viral qui lui est propre. Pour certains virus cette étape ne peut avoir lieu qu'après l'entrée de la capsid virale dans le noyau cellulaire en passant à travers le pore nucléaire [1], un nanopore biologique qui régule les échanges entre le noyau et le cytoplasme. **L'objectif général de ce projet en collaboration entre deux équipes à l'interface physique-biologie est de caractériser quels sont les facteurs physiques (géométrie, mécanique) et biologiques (motif peptidique spécifique) qui contrôlent ce transport. Plus particulièrement nous nous attacherons à caractériser le paysage énergétique de l'entrée du virus dans le noyau.**

Ce projet se focalisera sur deux virus qui transitent par le pore nucléaire et que nous étudions actuellement dans l'équipe : un vecteur de thérapie génique (Adeno Associated Virus, AAV) et le virus de l'Hépatite B (HBV). AAV est un parvovirus non pathogène qui est actuellement utilisé comme vecteur de transfert de gènes dans les applications de thérapie génique [2]. Les vecteurs AAV sont composés d'un génome d'ADN simple brin encapsulé dans une capsid icosaédrique de 25 nm qui peut être dérivée d'au moins 10 variants naturels d'AAV. Plusieurs études indiquent que les propriétés biologiques peuvent être très différentes selon le variant AAV utilisé, et nous avons pu vérifier précédemment *in vitro* que le processus de libération du génome est quantitativement affecté [3]. HBV est un pathogène humain majeur. C'est un virus enveloppé de 42 nm de diamètre [4]. Son génome est une molécule d'ADN circulaire empaquetée dans une capsid icosaédrique qui atteint le noyau cellulaire grâce à un processus qui associe le désassemblage de la capsid et le transport du génome à travers le pore nucléaire.

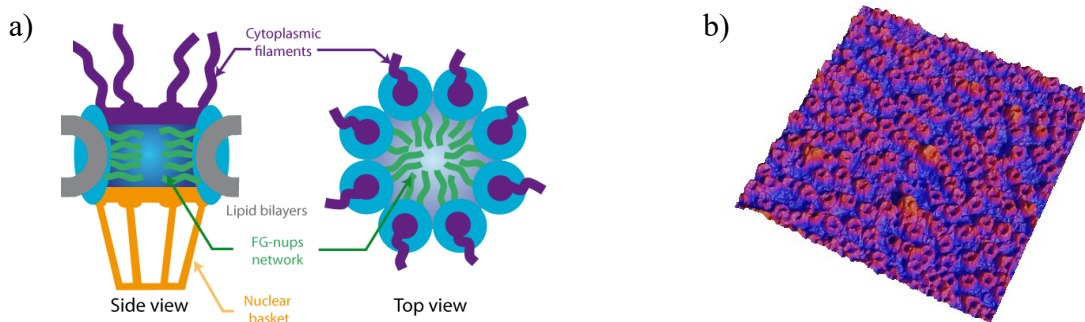


Figure 1 : (a) Schéma du pore nucléaire. (gauche) vue de côté (droite) vue de dessus. Le pore nucléaire est une structure de symétrie octogonale composée d'un canal central encombré par un réseau dynamique de FG-nups. Un réseau de filaments cytoplasmiques et le panier assurent l'association avec les molécules à transporter. (b) Image de topographie AFM d'une enveloppe nucléaire issue d'un ovocyte de *Xenopus* mis en présence de capsid viral d'AAV. Les pores nucléaires sont visibles sous la forme de cylindres (roses). Les virus sont visibles sous la forme de dômes (orange). Taille de l'image 2  $\mu\text{m}$  par 2  $\mu\text{m}$ .

Le pore nucléaire est un complexe moléculaire comportant plus de 30 protéines en multiples copies (8, 16, 24). De symétrie octogonale il forme un canal central de 60 nm dans lequel est présent un réseau dynamique de protéines hydrophobes (FG-nups, Figure 1a en vert). Cet enchevêtrement est à l'origine de sa sélectivité exceptionnelle [1]. Il a été montré que les espèces transportées sélectivement, comme par exemple AAV et HBV, comportaient un signal peptidique (NLS, nuclear localization signal) qui induisait une affinité plus importante pour un transporteur et in fine le réseau de FG-nups [1]. Nous avons également montré que ce pore possédait une plasticité lui permettant de s'adapter à l'état transcriptionnel de la cellule [5].

Dans ce projet nous mettrons en œuvre une caractérisation physique des processus de translocation nucléaire dans des systèmes contrôlés, afin d'étudier et de modéliser l'impact des propriétés nano-mécaniques des particules virales dans ce phénomène. Pour ce faire, nous utiliserons la Microscopie à Force Atomique (AFM). Elle permet à la fois de sonder à une très haute résolution spatiale la morphologie des objets biologiques (capsides, pore nucléaire) mais aussi d'exercer des contraintes mécaniques sur ces objets afin de mesurer leur réponse élastique [6]. Nous utiliserons également les outils de la nanofluidique pour mesurer le transport des particules virales à travers le pore nucléaire.

Dans un premier temps, dans le cadre d'un système simplifié et contrôlé, nous mesurerons par AFM en milieu liquide, la topographie et la nano-mécanique d'enveloppes nucléaires de *Xenope*, une membrane qui contient de nombreux pores nucléaires [7]. Après avoir analysé la contribution mécanique de chacune des parties du pore nucléaire, les enveloppes seront mises en présence de virus (AAV et HBV). La localisation des virus par rapport au pore nucléaire et leur contribution à la nano-mécanique du pore seront alors déterminées.

Dans un deuxième temps nous mesurerons les propriétés de transport des virus à travers ces mêmes enveloppes nucléaires grâce à un système de champ proche optique développé dans l'équipe (zero mode wave guide for nanopores [8]). Cette méthodologie nous permettra de quantifier à l'échelle du virus unique et en temps réel le paysage énergétique de translocation.

Enfin, nous utiliserons de petites molécules qui affectent l'assemblage et la structure de la capsid, appelées modulateurs allostériques de la protéine *core* du HBV (*Core Allosteric Modulators* ou CAM). Ces CAM peuvent inhiber la réplication virale, probablement en empêchant la translocation nucléaire de la capsid. Nous étudierons les effets de défauts topologiques générés par ces protéines sur les propriétés physiques (taille/rigidité/stabilité thermique) des capsides du HBV et sur leur interaction avec les pores nucléaires et leurs propriétés de transports.

Ce projet de thèse bénéficiera de la collaboration interdisciplinaire avec l'équipe d'Anna Salvetti (INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon), spécialiste de la biologie et du développement des vecteurs des virus AAV et HBV. Les travaux de recherche se dérouleront au sein du Laboratoire de Physique, en étroite collaboration avec Martin Castelnovo pour la modélisation physique [9].

## References

- [1] S.R. Wentz & M.P. Rout, The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**.
- [2] F. Mingozzi & K.A., High Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 341.
- [3] J. Bernaud, A Rossi, A Fis, L Gardette, L Aillot, H Büning, M Castelnovo A. Salvetti & C. Faivre-Moskalenko, Characterization of AAV vector particle stability at the single-capsid level, *J. Biol. Phys.* **2018**, *44* (2), 181-194
- [4] C. Seeger and W.S. Mason, Molecular biology of hepatitis B virus infection, *Virology* **2015**, *479-480*, 672–686
- [5] J. Sellés, M. Penrad-Mobayed, C. Guillaume, A. Fuger, L. Auvray, O. Faklaris & F. Montel, Nuclear pore complex plasticity during developmental process as revealed by super-resolution microscopy, *Scientific Reports* **2017**, 14732
- [6] W.H. Roos, R. Bruinsma & G.J.L. Wuite; Physical virology, *Nature Physics* **2010**, *6*, 633.
- [7] G.J. Stanley, A. Fassati & B.W. Hoogenboom, Atomic force microscopy reveals structural variability amongst nuclear pore complexes. *Life Sci. Alliance* **1** **2018**, e201800142
- [8] T. Auger, J. Mathé, V. Viasnoff, G. Charron, J.-M. Di Meglio, L. Auvray & F. Montel, Zero-mode waveguide detection of flow-driven DNA translocation through nanopores, *Phys Rev Lett.* **2014**, *113*, 028302.
- [9] M. Castelnovo, Viral self-assembly pathway and mechanical stress relaxation, *Phys. Rev. E* **2017**, *95*, 052405