

Thèse financée pour 3 ans par l'ANRS --- ANRS-funded PhD project (3 years)

Etude structurale à haute résolution spatio-temporelle des effets des modulateurs d'assemblage de capsid du virus de l'hépatite B (H/F)

Structural studies at high spatio-temporal resolution of the effects of hepatitis B virus capsid assembly modulators

Le virus de l'hépatite B (Hepatitis B Virus, HBV) est l'un des plus sérieux pathogènes humains : >250 millions d'individus souffrent d'hépatite B chronique et plusieurs centaines de milliers en meurent chaque année. HBV est un virus enveloppé avec une nucléocapside icosaédrique renfermant un ADN partiellement double brin (RC-DNA). Le constituant élémentaire de la capsid est un dimère d'une protéine (Core) de 183 résidus (ou 185 selon les génotypes) : les 149 résidus N terminaux (Cp149) comprennent le domaine d'assemblage qui peut s'auto-assembler *in vivo* et *in vitro* en capsides icosaédriques avec principalement une triangulation $T = 4$ (120 dimères). Les 34 (ou 36) acides aminés restants, riches en arginine, constituent le domaine C terminal (C Terminal Domain, CTD) qui est essentiel pour l'encapsidation de l'ARN viral pré-génomique (pgRNA) par Core.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous proposons d'étudier par des méthodes structurales de pointe, et notamment par diffusion des rayons X aux petits angles résolue en temps (Time-Resolved Small-Angle X-Ray Scattering, TR-SAXS), diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) et cryomicroscopie électronique (cryo-EM), les voies d'assemblage de la capsid de HBV, et par quels mécanismes d'action les modulateurs d'assemblage (capsid assembly modulators, CpAM) interfèrent avec ces processus. A partir de protéines recombinantes, d'ARN synthétisé *in vitro* et de CpAM commercialement disponibles, nous voulons

1. Identifier les chemins et les intermédiaires d'assemblage de la protéine de capsid (Core) en présence ou non de l'ARN pré-génomique;
2. Produire les premières données structurales directes sur la façon dont ces processus hors équilibre sont affectés par les CpAM.

Hepatitis B virus (HBV) is one of the most serious human pathogens: >250 million people suffer from chronic HBV infection and hundreds of thousands die from it annually. HBV is an enveloped virus with an icosahedral nucleocapsid packaging a partially double-stranded DNA (RC-DNA). The basic building block of the capsid is a dimer of a 183- (or 185- depending on the genotype) residue protein (Core): the N-terminal 149 residues (Cp149) comprise the assembly domain that self-assembles *in vivo* and *in vitro* into icosahedral capsids with mainly $T = 4$ (120 dimers) icosahedral symmetry. The 34 (or 36) remaining arginine-rich amino acids form the C-terminal domain (CTD) which is essential for the packaging of pregenomic RNA (pgRNA) by Core.

In this project, the graduate student will apply state of the art structural methods, particularly time-resolved small-angle X-ray scattering (TR-SAXS), small-angle neutron scattering (SANS) and cryo-electron microscopy (cryo-EM), to clarify the kinetics of assembly of the HBV capsid and how capsid assembly modulators (CpAM) interfere with these processes. Using recombinant proteins, *in vitro*-transcribed RNA and commercially available CpAM, the grad student will

1. Identify the pathways and intermediates in the assembly of the HBV capsid protein (Core) with or without pre-genomic RNA;
2. Produce the first direct structural data on the ways these out of equilibrium processes are derailed by CpAM.

===

La thèse aura lieu à l'Université Paris-Saclay dans les deux équipes partenaires à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC, Gif-sur-Yvette) et au laboratoire de Physique des Solides (LPS, Orsay), sous la co-direction de Stéphane Bressanelli (I2BC) et Guillaume Tresset (LPS). Elle aura pour objectifs

- (i) de produire et purifier les capsides recombinantes et l'ARN (I2BC)
- (ii) de désassembler les capsides recombinantes et purifier les dimères dissociés (I2BC)
- (iii) de mettre au point les expériences de mélange rapide permettant de déclencher l'assemblage des capsides avec et sans CpAMs et/ou ARN (LPS, I2BC)
- (iv) de participer aux expériences de TR-SAXS sur synchrotron pour y acquérir les données structurales résolues en temps (synchrotrons SOLEIL (Saint-Aubin) et ESRF (Grenoble)), ainsi qu'aux mesures par SANS (ILL, Grenoble) et à la cryo-EM (I2BC, LPS).
- (v) de participer à la construction des modèles physiques et structuraux permettant de caractériser à haute résolution spatio-temporelle à partir des données précédentes les chemins cinétiques d'assemblage et de désassemblage et l'influence des CpAMs (LPS).

The PhD work will take place at Paris-Saclay University, in two groups at Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC, Gif-sur-Yvette) and at the Laboratory for solid-state Physics (LPS, Orsay). The graduate student will be co-supervised by Stéphane Bressanelli (I2BC) and Guillaume Tresset (LPS) and will

- (i) produce and purify recombinant capsid proteins and RNA (I2BC)
- (ii) disassemble recombinant capsids to purify the dissociated dimers
- (iii) prepare the rapid mixing experiments to find best conditions to trigger capsid assembly with and without CpAM and/or RNA (LPS, I2BC)
- (iv) take part in the TR-SAXS experiments to acquire time-resolved high-resolution data at synchrotrons (SOLEIL (Saint-Aubin), ESRF (Grenoble)), in the SANS experiment at neutron sources (ILL (Grenoble)) and in the cryo-EM experiments (I2BC, LPS)
- (v) take part in the generation of physical and structural models from the data to characterize the kinetic pathways of capsid assembly and disassembly and the effects of CpAM.

Contacts : stephane.bressanelli@i2bc.paris-saclay.fr ; guillaume.tresset@universite-paris-saclay.fr