

Physique du confinement de l'ADN dans la capsidie théorie et expériences

Dans les chapitres 9 et 10, on s'intéressera à l'étape d'éjection de l'ADN lors du processus d'éjection *in vitro* (troisième étape de la figure 5.1). La modélisation de cette étape d'éjection en terme de constante réactionnelle (k_e) utilisée dans le chapitre 8 a le mérite de la simplicité mais n'est pas réaliste.¹ La translocation d'ADN se fait paire de bases par paire de bases, à une vitesse finie ; la description par une unique étape réactionnelle n'est pas suffisante.

L'ADN de T5 est fortement compacté dans la capsidie. C'est cette compaction qui est le moteur de l'éjection passive de l'ADN *in vitro*. Le confinement de l'ADN dans les capsides de phages a fait l'objet de nombreuses études théoriques et expérimentales² qui sont présentées dans ce chapitre. Notre travail expérimental sera présenté dans le chapitre suivant.

Deux raisons expliquent le nombre important de travaux sur le confinement de l'ADN dans les capsides de phages. Comme rappelé en introduction, le transfert du génome est un processus remarquable compte tenu des barrières à franchir et de la longueur de la molécule d'ADN. Une étude de 1977 [37] a permis de montrer qu'une compaction insuffisante de l'ADN dans la capsidie inhibe quasi totalement l'infection par les phages. La pression résultant de la compaction de l'ADN a donc une grande importance biologique. Indépendamment, des travaux expérimentaux ont permis de caractériser la mécanique de condensats d'ADN, d'une structure très semblable à l'ADN confiné dans les capsides de phages.

En 2001, une expérience impressionnante de suivi d'encapsidation en virus unique ([118] et figure 9.6) a permis de créer un premier lien quantitatif entre ces deux domaines, la force exercée par la molécule d'ADN dans la capsidie pouvant être directement mesurée sur un système biologique.

1. Cette description était néanmoins suffisante dans la mesure où nous nous intéressons à des événements beaucoup plus longs que l'éjection.

2. La plupart des expériences n'ont pas été réalisées directement sur T5 mais les idées générales qui en découlent restent valables.

Dans ce chapitre, je présente l'état de l'art sur la structure de l'ADN confiné dans les capsides de phages. En m'inspirant d'un modèle théorique déjà publié, je dérive alors un modèle plus simple dans lequel la force exercée par l'ADN dans la capsid e dépend uniquement de la fraction volumique de l'ADN dans la capsid e et de la solution tampon utilisée, à travers le type et la concentration des ions en solution.

Enfin, notons que les forces mesurées et prédites théoriquement dans ce chapitre sont des forces exercées par l'ADN à l'équilibre. L'éjection de l'ADN mesurée dans le chapitre suivant est un phénomène dynamique, plus complexe que ce qui est discuté dans ce chapitre.

9.1 Positionnement physique du problème

Le génome des bactériophages à ADN double brin est très fortement confiné dans la capsid e. La longueur du génome de T5 est de 122 kilo paires de bases ($\approx 41\mu m$ longueur totale ; taille de la pelote en solution $\approx 1.5\mu m$) pour un rayon moyen de capsid e de 40nm [31]. L'ADN occupe la moitié du volume interne de la capsid e ($\rho = 0.5$, pour une concentration massique c d'environ $500g.L^{-1}$)³. Ce degré de compaction extrême, commun chez les bactériophages caudés à ADN double brin, constitue un record dans le vivant. A titre de comparaison, $\rho \approx 0.001$ pour l'ADN compacté dans un noyau de cellule humaine, $\rho = 0.04$ pour le virus de la variole et $\rho = 0.16$ pour l'herpesvirus, deux virus eucaryotes à ADN double brin [104]. Le tableau 9.1 récapitule les dimensions caractéristiques de certains phages, dont T5.

Les observations de diffraction aux rayons X [94, 27, 28, 29] puis de cryomicroscopie électronique (cryo-EM) révèlent ainsi que l'ADN des phages est dans une structure hexagonale ordonnée quasi cristalline à l'intérieur de la capsid e (cf figure 7.2 en annexe et la structure des phages T5 [31, 75], T7 [18], P22 [68], ϕ 29 [126], N4 [20], T3 [36]). A de tels degrés de compaction, on s'attend à ce que la répulsion électrostatique et les forces d'hydratation entre les brins d'ADN [109, 110], l'énergie de courbure de l'ADN ainsi que la réduction d'entropie liée à la quasi immobilité de l'ADN créent une énorme pression intra-capsid e, de l'ordre de plusieurs dizaines d'atmosphères. Cette pression est à l'origine du processus d'éjection passif du génome *in vitro*, qui est étudié ici.[113, 118, 35]

L'objectif du chapitre va être de présenter nos résultats de cinétiques d'éjection puis de les interpréter vis à vis d'un modèle théorique largement utilisé dans le domaine des phages. Nous commencerons par présenter le modèle ainsi que les expériences qui ont permis de le valider en partie : les expériences d'encapsidation (figure 9.6) et les expériences de suppression osmotique (figure 9.7).

9.2 Structure de l'ADN confiné dans la capsid e

Ce paragraphe décrit l'état des connaissances actuelles sur la structure de l'ADN dans la capsid e de T5.

3. Nous choisirons de manière arbitraire une section de rayon 1nm pour l'ADN double brin. Dans ce cas $c(g.L^{-1}) = 1027\rho$, où ρ est la fraction volumique de l'ADN dans la capsid e.

Table 9.1 – Tableau récapitulatif des caractéristiques physiques de certains phages. R_{cap} est le rayon moyen externe des capsides en nanomètres. G_{size} est la taille du génome en kilo paires de bases et en μm , calculée pour une longueur par paire de bases de 0.336nm [26]. ρ_{the} est la fraction volumique d'ADN dans la capsid, calculée à partir du rayon moyen et de la longueur d'ADN, en supposant que la section d'une paire de bases est de $\pi * 1 * 1nm^2$. d_i est la distance interbrin d'ADN en nanomètres mesurée, soit par diffraction aux rayons X, soit par cryo EM. ρ_{d_i} est cette même fraction volumique calculée à partir des mesures de la distance interbrin d_i en suivant la relation 9.1. Les références correspondant aux valeurs sont indiquées dans le tableau. On note une forte variation dans l'estimation de la fraction volumique de l'ADN suivant les publications et le type de calcul.

Phage	R_{cap} nm	G_{size} kbp	G_{size} μm	ρ_{the}	d_i (X)	d_i (cryo EM)	ρ_{d_i}
T5st(0)	39 [31]	114	38.3	0.484	2.82[31]	2.64[74, 75]	0.456
	38.2[75]			0.515	2.77[74]		0.473
							0.521
λ wt	29[104]	48.5	16.3	0.501	2.73[28]	-	0.487
λ b221	29	37.9	12.7	0.391	2.98[28]	-	0.409
ϕ 29	21x27[118]	19.3	6.49		-	2.66 [126]	0.513
						2.77 [22]	0.473
					2.75[123]		0.480
SPP1wt	-	45.1	15.1		2.68[116]		0.505

9.2.1 Capsid pleine $\rho \approx 0.5$

L'ADN occupe approximativement 50% du volume totale de la capsid. A ce degré de compaction, l'ADN s'arrange localement en un réseau hexagonal compact de brins d'ADN parallèles.⁴ Cette observation a été réalisée très tôt par des expériences de diffraction aux rayons X sur le phage lambda [27, 28, 29], et cette propriété est généralisable aux phages de fraction volumique identique. A titre de confirmation, il est possible de voir que la surface de la maille élémentaire du réseau, multipliée par la longueur totale de l'ADN est égale au volume de la capsid. La distance entre les brins d'ADN vérifie une loi en $1/\sqrt{L}$, où L est la longueur totale d'ADN encapsidée, conformément aux contraintes géométriques imposées par le volume fixe de la capsid.

L'avènement de la cryomicroscopie électronique a permis de préciser l'arrangement de l'ADN de manière plus globale. La qualité des images obtenues sur le phage T7 [18] a permis de proposer un arrangement de l'ADN en "pelote de laine" perpendiculairement à la queue du phage. Les résultats obtenus avec d'autres phages ont montré, a posteriori, que cet arrangement est une particularité de T7 liée à l'existence d'un cylindre protéique (correspondant au connecteur) empiétant largement l'espace capsidique. Ce cylindre servirait de guide conduisant à un arrangement en pelote. Pour les autres phages, l'arrangement semble plus complexe. Il reste localement hexagonal mais le cristal présente de nombreuses torsions ainsi que des défauts. Pour T5, des données récentes (figures 9.2 (i) et (a) issue de [75]) montrent que l'ADN est organisé sous forme de nanodomains hexagonaux séparés par des plans concentrant les déformations et les défauts de la maille (dislocation / changement de courbure / torsion).

4. L'alignement des ADNs parallèlement à la surface de la capsid ajoute un ordre à plus grande distance, visible par une modulation sur le pic de diffraction.

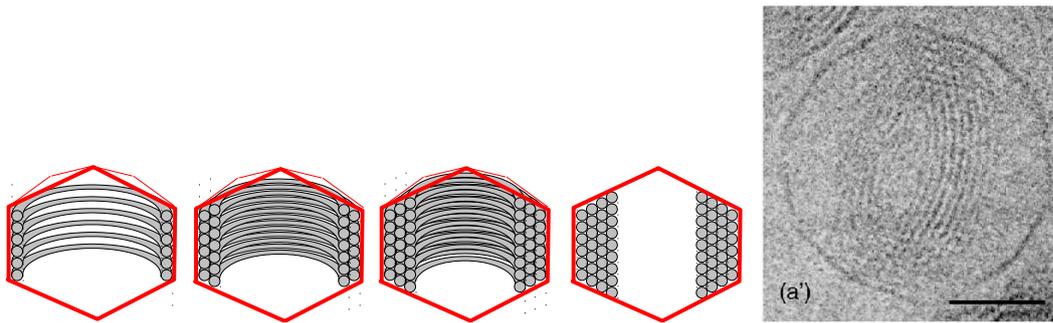


Figure 9.1 – Remplissage “inverse spool”, en bobine inverse. Photo droite : capsid partiellement remplie par un tore d'ADN condensé par la spermine, micrographie reproduite depuis Leforestier et coll [75].

9.2.2 Capsid partiellement remplie $0 < \rho < 0.5$

Initialement, les observations de la structure en bobine de l'ADN de T7 ont conduit à l'élaboration d'un modèle de remplissage de la capsid dit en “bobine inverse”. Selon ce modèle, la rigidité de l'ADN lui impose de venir s'enrouler sur la surface externe de la capsid, minimisant ainsi son énergie de courbure. La longueur de persistance de l'ADN, typiquement de 50nm, est en effet du même ordre que la taille des capsids de phages. L'ADN remplirait ainsi la capsid en commençant par l'extérieur puis formerait des cercles de plus en plus petits au fur et à mesure du remplissage. Ce modèle suggère l'existence d'une zone déplétée d'ADN au centre de la capsid, se réduisant peu à peu, comme sur la figure 9.1.

Les études de cryo EM récentes ont permis de préciser la validité de cet argument. En contradiction avec le modèle de bobine inverse, les observations des phages phi29 [22] T3 [36] et T5 [75] ont révélé qu'aux stades intermédiaires de remplissage de capsid, l'ADN occupe de manière homogène tout l'espace de la capsid, comme sur la figure 9.2 (f,g,h).

En réalité, les deux cas de figures (remplissage homogène ou remplissage ordonné en bobine) peuvent se présenter selon la solution ionique utilisée :

- Lorsque la solution ionique est constituée de contre-ions monovalents ou divalents (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ou Ca^{2+}), l'interaction entre brins d'ADN est répulsive, et la minimisation de l'énergie de courbure ne permet pas de compenser la perte d'entropie qui serait liée à son arrangement ordonné. L'ADN occupe alors de manière homogène tout l'espace de la capsid.
- Il est toutefois possible d'observer des anneaux toriques d'ADN de type bobine inverse, mais uniquement en présence d'agents condensants créant des interactions attractives entre brins d'ADN (voir la figure 9.1).⁵

Transitions de phases intracapsid ([75] et figure 9.2) En présence d'interactions répulsives entre brins d'ADN, un travail récent de Leforestier et coll a permis de préciser la structure de l'ADN dans la capsid à des états intermédiaires de remplissage de l'ADN (c'est-à-dire pour $0 < \rho < 0.5$). De manière similaire à ce qui se produit en solution, lorsque la concentration

5. Par exemple en présence de cations comme la spermine ou la spermidine dont la valence est supérieure ou égale à 3.

en ADN augmente dans la capsid, une série de transitions de phases s'enchaînent depuis une phase isotrope pour les faibles concentrations à une phase hexagonale 3D ordonnée lorsque la capsid est pleine. L'ADN passe ainsi d'un état isotrope sans orientation préférentielle des brins d'ADN, à une phase ayant une orientation préférentielle, c'est-à-dire nématique et chirale (cholestérique).⁶ Enfin, les brins alignés s'arrangent de manière hexagonale (phase hexagonale 2D) avant, probablement, de s'ordonner longitudinalement (phase hexagonale 3D).⁷ Notons d'une part que l'arrangement final n'est pas identique de phage à phage et d'autre part que la structure de type hexagonale n'est pas monocristalline mais présente de multiples plans de défauts séparant des nanodomains hexagonaux (voir figure 9.2), qui permettent à la structure de l'ADN de s'accommoder de la géométrie de la capsid.

Une simulation numérique récente [99] a permis de confirmer l'existence de certaines de ces transitions. La simulation permet d'observer un accord qualitatif avec les transitions prévues, c'est-à-dire le passage pour l'ADN d'un état isotrope à l'alignement des brins d'ADN (phase nématique), puis à son empilement hexagonal partiel. Les simulations n'ont pas été faites sur T5, mais le schéma reste probablement identique. Quantitativement, les concentrations frontières entre les états sont relativement étalées et décalées par rapport aux mesures en solution.⁸ Cela semble logique étant donné la petite taille des capsides et la frustration de l'ADN qui en découle. Le rayon de la capsid de T5 étant deux fois plus grand que le rayon de phi29 sur laquelle a été réalisée cette simulation, il est possible que les transitions soient mieux marquées pour T5. Enfin, il faut rester prudent sur l'interprétation de la simulation numérique aux plus hautes fractions volumique en ADN.⁹

La conformation de l'ADN de T5 subit, lorsque la concentration d'ADN augmente, la série de transitions de phases suivante :

isotrope -> cholestérique -> hexagonal 2D -> hexagonal 3D

La conformation finale de l'ADN dans la capsid pleine est une mosaïque de nanodomains hexagonaux séparés par des plans de défauts.

9.3 Calcul de l'énergie libre de l'ADN dans les capsides

Afin de réaliser une comparaison entre la théorie et nos expériences, notre objectif est à présent de modéliser les propriétés thermodynamiques associées au confinement de l'ADN dans la capsid.

Le comportement mécanique de l'ADN en tant que polymère semi rigide "dilué" est relativement bien compris (à faible force, $f < 60 \text{ pN}$). Les expériences de pinces optiques et magnétiques réalisées sur des molécules uniques ont permis de valider un modèle où la molécule

6. avec possibilité d'une transition de phase intra chaîne coexistence potentielle de 2 phases lors de cette transition

7. Il existe en solution [26] une phase d'ADN encore plus concentrée dont la maille est orthorhombique pour des concentrations supérieures à 670 g.L^{-1} , qui n'est pas atteinte dans les capsides de phages.

8. D'après [75] les concentrations frontières chez T5 sont les mêmes que celles mesurées en solution.

9. Il n'est pas clair que les deux régimes répulsifs électrostatiques, d'hydratation et de Debye-Hückel, aient été pris en compte. Les corrélations entre brins d'ADN adjacents sont ignorées. Ces corrélations sont nécessaires pour expliquer transition hexagonale 2D -> hexagonale 3D.

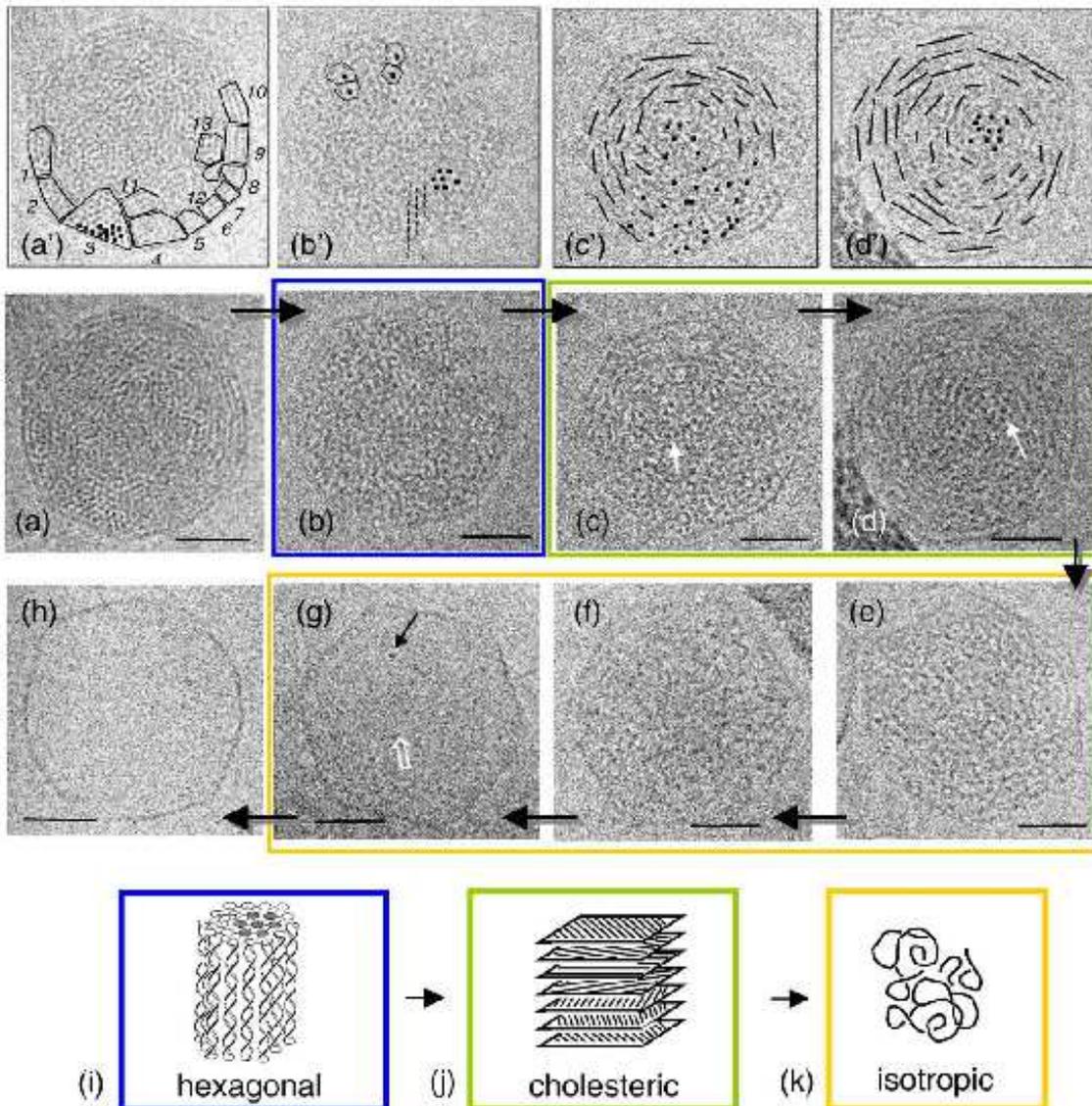


Figure 9.2 – Variation de l'organisation de l'ADN à différents niveaux de remplissage de la capsid. Les images sont rangées par fraction volumique décroissante. La capsid pleine en (a) et vide en (h) encadre les états intermédiaires. Dans la capsid pleine, l'ADN est rangé de manière hexagonale, et une mosaïque de motifs d'orientations variées de l'ADN est visible, surlignés en (a'). Les auteurs reconnaissent successivement un état hexagonal moins ordonné en b et en b', puis un état localement hexagonal auquel s'ajoute une organisation cholestérique à longue portée (c, c', d, d'), et une série d'états isotropes (e', g). La barre d'échelle est de 25nm. Une représentation schématique des états isotropes, cholestériques et hexagonaux est dessinée en (i), (j) et (k) respectivement. Cette figure est intégralement reproduite du travail de Leforestier et Livolant [75].

d'ADN est modélisée via deux paramètres, l'un étant la rigidité de courbure, l'autre la rigidité de torsion de la molécule. Les modèles type worm-like-chain (rigidité de courbure seulement), ou rod-like-chain (courbure et torsion) permettent de comprendre relativement bien le comportement mécanique de l'ADN sous sa forme "diluée".

L'étude des phases condensées de l'ADN, qui nous intéressent ici, diffère essentiellement du problème de l'ADN dilué par la prise en compte des interactions entre brins d'ADN. Un domaine physique d'importance, ici, est celui des cristaux liquides. En effet, dans une première approximation, l'ADN est une molécule rigide à l'échelle de 50 nanomètres. Lorsqu'il est introduit dans la capsid, cet ADN peut être vu comme une "soupe" de bâtonnets de 50nm de longs et de 1nm de rayon. Le rapport d'aspect de ces bâtonnets étant grand, il existe une concentration seuil au dessus de laquelle va se produire une transition ordre / désordre : les bâtonnets (donc l'ADN) vont s'aligner parallèlement les uns aux autres afin de "gagner de l'espace". La perte d'entropie liée à l'alignement des molécules est inférieure au gain d'entropie translationnel qui en résulte. C'est la transition isotrope -> cholestérique notée plus haut. Outre cet aspect "cristal liquide", l'ADN est un polymère chargé, et les interactions électrostatiques entre les brins d'ADN doivent être prises en compte. Ces interactions ont fait l'objet de nombreuses études ([81] pour une revue sur le sujet). Elles dépendent notamment fortement du type et de la concentration en contre-ions.

Lorsque la distance interbrin est supérieure à 3nm, l'ADN peut être modélisé par un cylindre de charge effective uniforme dans un milieu continu. Les interactions électrostatiques dépendent de la concentration et du type de contre-ions (régime de Debye-Hückel). Lorsque la distance interbrin est inférieure à 3nm, ces approximations ne sont plus valables :

- l'aspect hélicoïdal de la molécule entre en jeu. Une étude récente [61] a tenté de prendre en compte cet aspect en résolvant le problème de l'interaction entre des molécules hélicoïdales chargées. Néanmoins, cette étude s'applique à des hélices de pas fixe or il a été observé que le pas de l'hélice d'ADN est variable, car l'hélice est capable de se déformer pour s'accommoder à une maille cristalline [76].
- à ces distances, la nature discrète de l'eau, des ions ainsi que la structure moléculaire de l'ADN prennent leur importance. Nous entrons dans le régime dit "d'hydratation" qui dépend fortement du type de contre-ions, mais qui est relativement indépendant de leurs concentrations.

Pour être tout à fait complet, la frustration de l'ADN dans la capsid est probablement à l'origine des nombreux défauts du cristal d'ADN visualisés sur la figure 9.2. Il faut donc probablement prendre en compte ces défauts cristallins, qui peuvent avoir leur importance dans l'énergie libre et dans la dynamique de l'ADN.

9.3.1 Modèle semi-empirique

Je présente un modèle fortement inspiré des travaux de Kindt et coll [60] et de Purohit et coll [105], avec quelques modifications, afin de calculer la force exercée par l'ADN dans la capsid. Le modèle permet de prendre en compte empiriquement les effets décrits ci-dessus empiriquement. Nous négligeons les effets de courbure et justifions cette approximation. Seule la frustration de l'ADN dans la capsid et les défauts cristallins qui en résultent sont totalement

ignorés.¹⁰

Mon modèle est inspiré du travail précédent de Purohit et coll [105]. Cependant, je simplifie le modèle en négligeant les effets de courbure de l'ADN. Il se trouve que la courbure de l'ADN, lorsqu'elle est répartie de manière relativement homogène dans la capsid, change peu le résultat de la théorie (cf paragraphe 9.3.1.3). Ce choix a d'ailleurs été effectué par P. Grayson dans sa thèse [45]. Négliger cet effet présente un autre avantage : à condition saline fixée, la force exercée par l'ADN dans la capsid ne va dépendre que de la fraction volumique ρ de l'ADN dans la capsid et non de la géométrie de celle-ci. Nous pourrions ainsi comparer les phages entre eux en se basant sur ce paramètre ρ uniquement.

Des expériences de stress osmotique décrites pour la première fois dans [28] et qui sont présentées dans le paragraphe suivant ont permis de caractériser le comportement mécanique de phases condensées d'ADN. Ces expériences relient, pour une phase hexagonale d'ADN, la distance entre les brins d'ADN d_i en fonction de la pression appliquée Π sur l'ADN. On mesure ainsi une équation d'état du type $\Pi = f(d_i)$, de la même manière que l'équation d'état des gaz parfaits relie la pression d'un gaz à son volume. Les distances interbrins mesurées correspondent parfaitement à la gamme de distances observées dans les capsides de phages. Logiquement, le modèle semi-empirique applique ce comportement mécanique au problème du confinement de l'ADN des phages.

9.3.1.1 Mesure de l'équation d'état $\Pi = f(d_i)$ dans les expériences de stress osmotique

Le principe de la mesure est montré figure 9.3. Brièvement, une séparation de phases se crée dans une solution d'ADN en présence d'agents stressants osmotiques comme le dextran. L'ADN s'ordonne spontanément sous forme de tore et exclut l'agent stressant de sa phase. L'eau et les ions sont libres de s'échanger entre les deux phases. Il y a donc une pression exercée sur le tore d'ADN qui est égale à la pression osmotique de l'agent stressant. Par des mesures de diffraction aux rayons X, il est possible de déterminer l'équation d'état f des condensats d'ADNs, équation qui relie la pression osmotique Π de la solution de dextran à la distance inter brins d'ADN d_i ($\Pi = f(d_i)$).¹¹ Cette mesure expérimentale a été initialement réalisée par Rau et coll [109].

J'ai choisi d'utiliser des données plus récentes, tirées de [122] (figure 9.4), qui sont faites sur une plus large gamme de distances interbrin¹². Une explication théorique et un modèle de ces courbes sont fournis dans l'article de Strey et coll [122]. Sans rentrer dans le détail nous retiendrons trois éléments principaux :

- Ces courbes dépendent de la nature des ions en solution (et non de celle de l'agent stressant). Les courbes présentées figure 9.4 gauche sont celles valables pour Na^+ comme seul contre-ion disponible. **En présence de contre-ions divalents, la pression osmotique est divisée d'un facteur 3 à 10 par rapport à des contre-ions monovalents pour une distance interbrin identique (courbe verte figure 9.4 droite).**¹³

10. T. Odijk propose une approche non empirique dans les deux travaux suivants : [96, 97].

11. Ces mesures prennent donc en compte nombre des effets complexes présentés en introduction.

12. donc de concentration en ADN

13. Les co-ions, tel que Cl^- ou SO_4^{2-} font aussi varier l'équation d'état, dans une moindre mesure.

- **A nature de sel fixée, deux régimes** sont visibles en fonction de la distance interbrin d_i :
 - $d_i > 3nm$, il s'agit du régime où les répulsions électrostatiques type Debye-Hückel sont visibles¹⁴. L'écrantage électrostatique s'effectue suivant la longueur caractéristique de Debye λ_D qui est **dépendante de la concentration C en contre-ions**.
 - $d_i < 3nm$, ce régime est **indépendant de la concentration en contre-ions** (cf figure 9.4). Il s'agit du régime dit d'hydratation où la nature discrète des molécules prend son importance, la longueur de décroissance caractéristique de ces forces est de 0.3nm.

9.3.1.2 Application au cas des bactériophages

L'approche présentée ci-dessous est identique au travail des publications de Purohit et coll ([105, 104]), à deux exceptions près. Nous allons, pour notre modèle, calculer la distance interbrin de manière uniquement géométrique. Nous négligerons les effets de courbure¹⁵, ce qui permet de calculer une énergie libre qui dépende exclusivement de la concentration en ADN intracapside, facilitant ainsi les comparaisons entre phages.

Nous allons calculer la force exercée par l'ADN dans la capsidie en fonction de la fraction volumique d'ADN intracapsidie. Cette force est celle qu'il faut appliquer pour faire rentrer de l'ADN dans la capsidie ou bien la force motrice de l'éjection d'ADN hors de la capsidie. C'est donc une quantité importante à confronter aux expériences. Pour la calculer à partir de l'équation d'état des condensats d'ADN, 3 étapes sont nécessaires :

- Calculer le potentiel effectif d'interaction entre brins d'ADN à partir de l'équation d'état.
- Calculer l'énergie libre de l'ADN confiné à partir du potentiel effectif.
- Calculer la dérivée de l'énergie libre par rapport à la longueur de l'ADN, qui est la force exercée par l'ADN dans la capsidie.

Pour relier la pression osmotique à l'énergie libre F du système, nous relierons la pression osmotique Π à la distance interbrin d_i . La pression est l'opposé de la dérivée de l'énergie libre par rapport au volume du système, à température et potentiels chimiques constants. . On suppose que les cristaux d'ADN sont empilés de manière hexagonale et que la variation longitudinale de la longueur d'ADN est nulle. La compression s'effectue uniquement de manière à rapprocher les brins d'ADN, réduisant la surface de la maille cristalline :

$$\Pi(d_i) = -\frac{dF}{dV} = -\frac{dF}{d(SL)} = -\frac{1}{L} \frac{dF}{d(S)}$$

Avec S la surface d'une maille du réseau hexagonal d'ADN et L la longueur totale de l'ADN. La surface d'une maille hexagonale prise pour un espace interbrin d_i est de $\frac{\sqrt{3}d_i^2}{2}$, d'où :

14. Il existe en plus des forces entropiques de répulsions entre brins type "forces de Hellfrich", initialement décrites pour expliquer la répulsion entre deux membranes lipidiques proches.

15. P Grayson, dans sa thèse, a utilisé une démarche similaire [45]. Une justification de cette approximation est présentée en fin de chapitre.

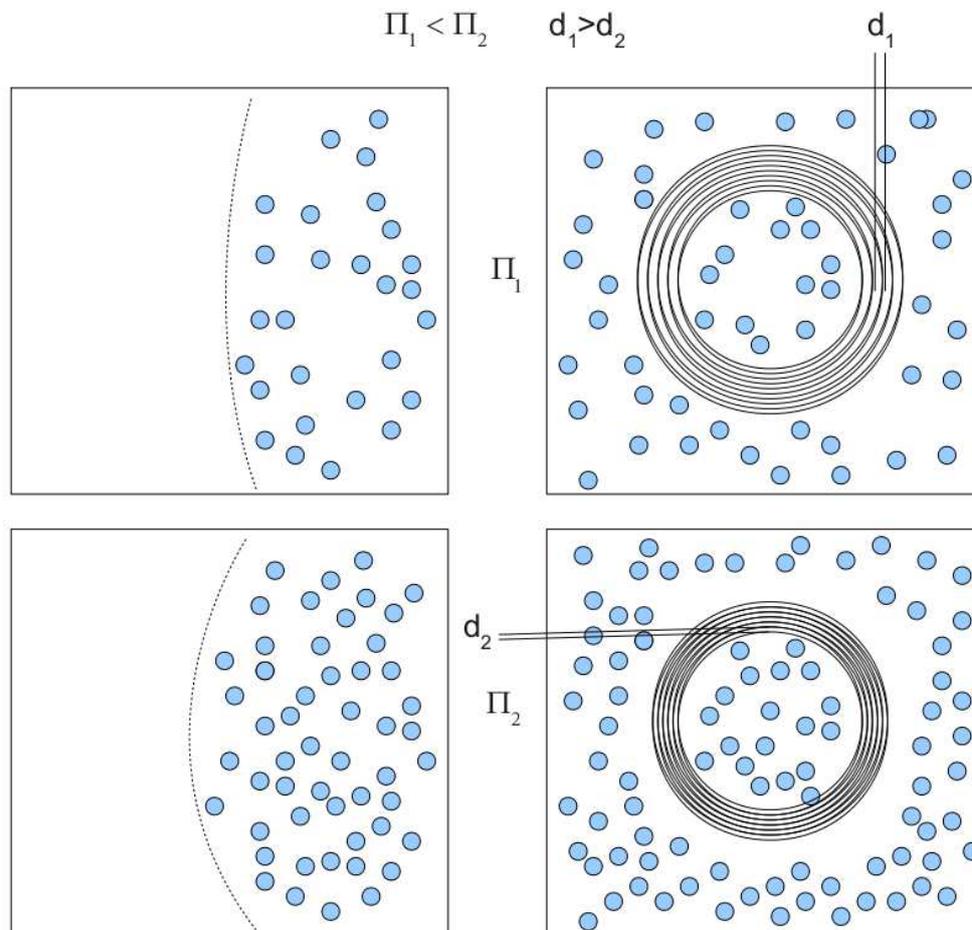


Figure 9.3 – Principe de la mesure de l'équation d'état des condensats d'ADN. Gauche : une membrane semi-perméable isole les polymères de stress osmotique (ronds bleus) à droite de la cuve, mais laisse passer l'eau et les ions. Les polymères exercent une pression osmotique qui fait affluer l'eau de leur côté, créant une différence de pression hydrostatique sur la membrane. Un équilibre est atteint lorsque la pression hydrostatique appliquée sur la membrane égalise la pression osmotique de la solution de polymères. La pression osmotique augmente avec la quantité d'agents stressants, comme l'illustre la membrane qui est plus déformée lorsqu'il y a plus de polymères stressants. Droite : les agents stressants exercent une pression osmotique sur des tores d'ADN. La distance entre les brins d'ADN d_i décroît avec l'augmentation de la pression osmotique Π exercée.

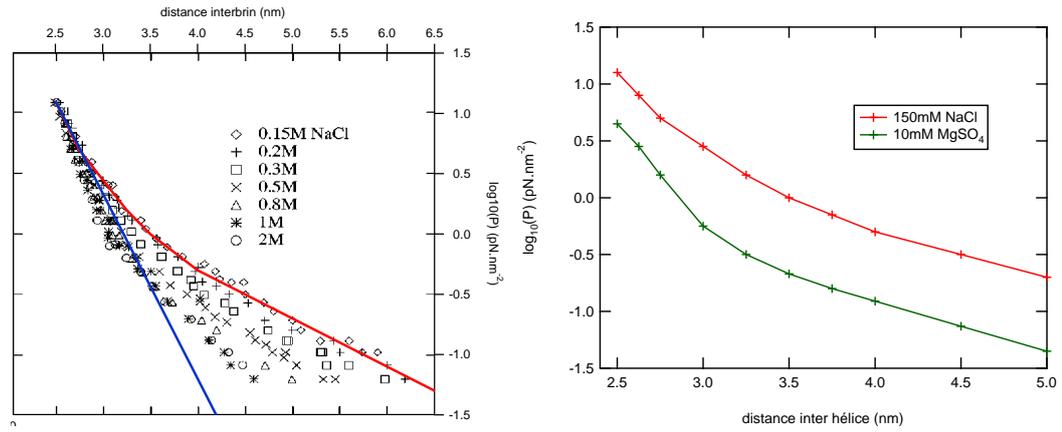


Figure 9.4 – Equation d'état des condensats d'ADN. Les figures montrent la dépendance de l'espace interbrin de l'ADN en fonction de la pression osmotique appliquée. Gauche : la figure est reproduite de [122]. La courbe rouge correspond à l'ajustement empirique utilisé pour les expériences en présence de NaCl. On voit la transition entre un régime d'hydratation indépendant de la concentration en sels, et un régime type Debye-Huckel. La courbe bleue correspond à l'ajustement monoexponentiel décrit dans les calculs qui est valable uniquement pour le régime d'hydratation. Droite : comparaison de l'équation d'état pour deux conditions salines différentes. Les données en 10mM $MgSO_4$ de la courbe verte sont issues de la thèse de P. Grayson [45].

$$\Pi(d_i) = -\frac{1}{L} \frac{dF}{d\left(\frac{\sqrt{3}d_i^2}{2}\right)} = -\frac{1}{\sqrt{3}Ld_i} \frac{dF}{dd_i}$$

$$\frac{dF}{dd_i} = -\sqrt{3}Ld_i\Pi(d_i)$$

Cette expression permet d'obtenir, par intégration, l'expression de l'énergie libre pour un cristal d'ADN dont on rapprocherait les brins depuis l'infini jusqu'à une distance d_i . C'est le potentiel effectif d'interaction entre des brins d'ADN parallèles.

$$F(d_i) = -\sqrt{3}L \int_{\infty}^{d_i} x\Pi(x)dx$$

Pour continuer le calcul analytiquement, nous supposons que la pression osmotique de la solution d'ADN dépend exponentiellement de la distance d_i : $\Pi(d_i) = \Pi_0 e^{-\frac{d_i}{l_h}}$, avec l_h la longueur caractéristique de décroissance. Nous utiliserons l'ajustement de la courbe bleue sur la figure 9.4, qui représente bien les forces d'hydratation, mais pas celles du régime où le réseau est plus lâche. Les forces internes calculées à partir des courbes empiriques rouge et verte, pour des conditions salines de 150mM NaCl et 10mM $MgSO_4$ respectivement, sont calculées uniquement numériquement et montrées figure 9.5.

$$\Pi(d_i) = \Pi_0 e^{-\frac{d_i}{l_h}}$$

Alors l'énergie libre peut s'intégrer en :

$$F(d_i) = \sqrt{3}\Pi_0 L(l_h^2 + l_h d_i) e^{-\frac{d_i}{l_h}}$$

Si l'on suppose que l'ADN est arrangé en brins parallèles de manière hexagonale, nous pouvons relier d_i à L , la longueur totale de génome encapsidé :

$$L \frac{\sqrt{3}d_i^2}{2} = V_{capsid}$$

On peut exprimer d_i en fonction de la fraction volumique en ADN ρ :

$$\rho = \frac{V_{ADN}}{V_{capsid}} = \frac{sL}{V_{capsid}} \Rightarrow \frac{V_{capsid}}{L} = \frac{s}{\rho}$$

Où s est la section de la double hélice d'ADN.

$$\begin{aligned} d_i^2 &= \frac{2}{\sqrt{3}} \frac{V_{capsid}}{L} = \frac{2}{\sqrt{3}} \frac{s}{\rho} \\ d_i &= \sqrt{\frac{2}{\sqrt{3}} \frac{s}{\rho}} = \frac{\alpha}{\sqrt{\rho}} \end{aligned} \quad (9.1)$$

En notant $\alpha = \sqrt{\frac{2s}{\sqrt{3}}}$. En supposant que la surface d'un nucléotide vaut $\pi * 1^2 nm^2$, $\alpha = 1.905 nm$. On peut relier ρ à la concentration massique c par la formule $c = 1027\rho(g.L^{-1})$.

On exprime l'énergie libre F , en fonction de ρ :

$$F(\rho) = \sqrt{3}\Pi_0 \frac{\rho V_{capsid}}{s} (l_h^2 + \frac{l_h \alpha}{\sqrt{\rho}}) e^{-\frac{\alpha}{l_h \sqrt{\rho}}}$$

Calculons la force exercée par l'ADN à la sortie de la capsid f ; $f = \frac{dF}{dL} = \frac{s}{V_{capsid}} \frac{dF}{d\rho}$. D'où :

$$\begin{aligned} f(\rho) &= \sqrt{3}\Pi_0 \frac{d}{d\rho} ((l_h^2 \rho + l_h \alpha \sqrt{\rho}) e^{-\frac{\alpha}{l_h \sqrt{\rho}}}) \\ f(\rho) &= \sqrt{3}\Pi_0 (l_h^2 + \frac{l_h \alpha}{\sqrt{\rho}} + \frac{\alpha^2}{2\rho}) e^{-\frac{\alpha}{l_h \sqrt{\rho}}} \end{aligned} \quad (9.2)$$

Avec $l_h = 0.283 nm$ et $\Pi_0 = 87100 pN.nm^2$ (fit monoexponentiel de la pression osmotique : droite bleue figure 9.4), nous obtenons la courbe bleue sur la figure 9.5. Si nous calculons

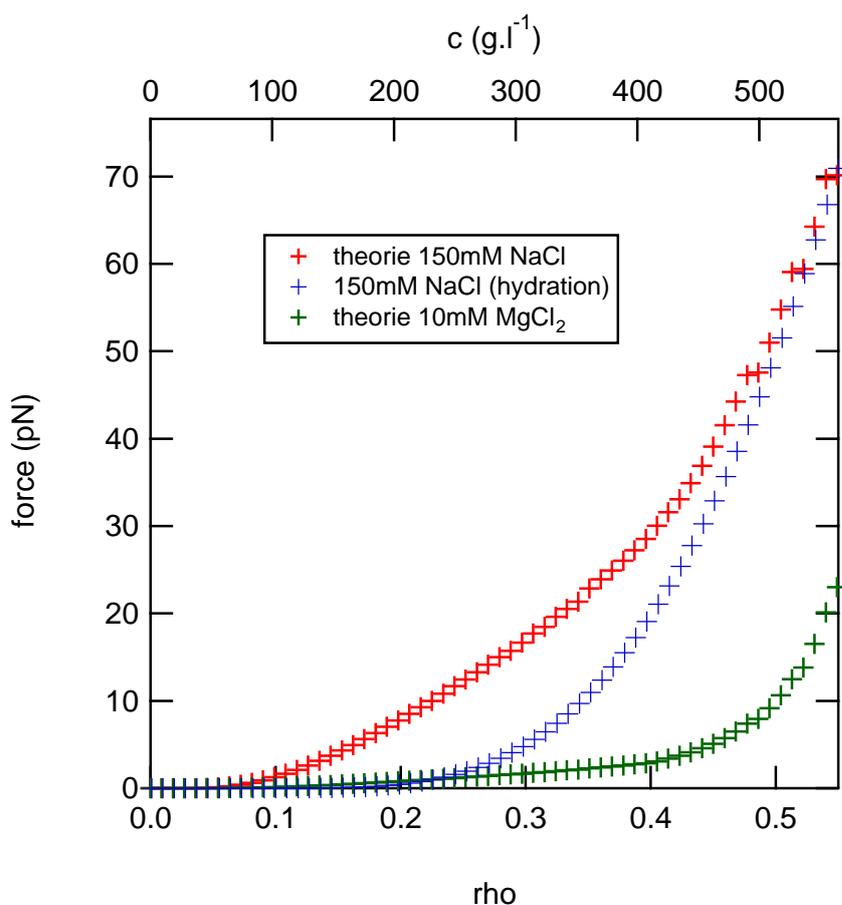


Figure 9.5 – Force théorique exercée par l'ADN en fonction de la fraction volumique en ADN et de la concentration massique. Deux conditions expérimentales sont étudiées : 150mM NaCl et 10mM $MgSO_4$ en rouge et en vert respectivement. La courbe bleue montre le résultat de l'équation 9.2, qui ne coïncide avec la courbe rouge qu'aux très hautes concentrations en ADN, c'est-à-dire dans le régime d'hydratation.

numériquement la force à partir d'un ajustement de la courbe expérimentale rouge réalisée à 150mM en NaCl (figure 9.4), nous obtenons la courbe rouge de la figure 9.5, où la force exercée par l'ADN est sensiblement plus élevée aux fractions volumiques intermédiaires. La force exercée en présence d'ions divalents (10mM $MgSO_4$) est aussi calculée numériquement (courbe verte figure 9.5) à partir de la courbe verte de la figure 9.4. **La force exercée est beaucoup plus faible en présence d'ions monovalents qu'en présence d'ions divalents à fraction volumique identique**, en accord avec les mesures de pression.

9.3.1.3 Contribution de la rigidité de courbure.

Une des différences entre les condensats d'ADN utilisés dans les expériences de stress osmotique et les ADNs dans les capsides est la courbure. L'ADN est plus courbé dans les capsides que dans les tores d'ADN. Mais la contribution énergétique due à la courbure est probablement faible. En effet, si nous majorons l'énergie de courbure, en considérant par

exemple que tout l'ADN encapsidé a un rayon de courbure de $R_{min} = 5nm$ ¹⁶, alors la force nécessaire pour encapsider cet ADN courbé ne dépasse pas $4pN$. L'enthalpie libre de l'ADN s'écrit :

$$G_{courbure}(L) = \frac{\xi_p k_b T}{2} \int_0^L \frac{ds}{R(s)^2} = \frac{\xi_p k_b TL}{2R_{min}^2}$$

ξ_p est la longueur de persistance de l'ADN ($\approx 50nm$). Soit pour un rayon de courbure R_{min} de $5nm$:

$$f = G_{courbure}(L)/L = \frac{\xi_p k_b T}{2R_{min}^2} = \frac{50 * 4}{2 * 5 * 5} = 4pN$$

Cette force ne serait pas négligeable aux faibles concentrations en ADN, mais à ce stade, il n'est pas nécessaire pour l'ADN d'être aussi courbé. A forte concentration, cette force est faible devant la force calculée par le modèle précédent, et ce, d'autant plus que la longueur de persistance de l'ADN diminue lorsqu'il est dans un état condensé.

9.4 Expériences antérieures, état de l'art

Dans ce paragraphe, nous allons présenter deux séries d'expériences antérieures à notre travail et qui illustrent la validité du modèle précédent.

9.4.1 Mesure de la force exercée par l'ADN dans les expériences d'encapsulation

En 2001, Smith et coll. [118] ont pu réaliser une mesure en virus unique de la force exercée par l'ADN contenu dans la capsid chez le phage $\phi 29$. Cette mesure est réalisée en suivant la cinétique d'encapsulation de l'ADN dans les capsides à l'aide de pinces optiques (voir figure 9.6). Brièvement, lorsque les virus sont multipliés dans les cellules, les capsides sont formées, vides, et sont ensuite remplies d'ADN à l'aide d'un moteur moléculaire (terminase). Cette étape d'encapsulation est en quelque sorte l'étape symétrique de l'éjection d'ADN lors de l'infection. Lors de cette encapsidation le moteur moléculaire introduit l'ADN dans la capsid, typiquement à une vitesse de quelques centaines de paires de bases par seconde. Au fur et à mesure de l'encapsulation, la force exercée par l'ADN dans la capsid augmente et résiste au moteur, de la même manière qu'un duvet nous résiste au fur et à mesure qu'on essaie de le faire rentrer dans sa housse. L'augmentation de la résistance se traduit par un ralentissement du moteur d'encapsulation. En caractérisant indépendamment la fonction force-vitesse du moteur puis en mesurant la cinétique de translocation de l'ADN, les auteurs ont pu calculer la force interne exercée par l'ADN dans la capsid.

16. Choix qui paraît être une borne minimale raisonnable pour un rayon externe de capsid de $40nm$ (cf figure 9.2)

Depuis 2001 ce type d'expériences a aussi pu être réalisé avec les phages λ [111, 41] et T4 [39]¹⁷. La précision des mesures sur $\phi 29$ a été améliorée [19, 112, 63, 1] et l'influence des ions a été étudiée [40].

Nous pouvons directement comparer la théorie du paragraphe précédent à ces mesures expérimentales. En traduisant les longueurs des ADN encapsidés en terme de fraction volumique, grâce aux données du tableau 9.1, j'ai rassemblé sur un même graphe les mesures disponibles sur le phage $\phi 29$ et le phage λ (figure 9.6). Concernant $\phi 29$, les données sont extraites de la publication de Fuller et coll ([40]) où sont comparées les forces internes pour différents types de solutions ($NaCl / MgCl_2 / Co^{3+}$). Pour λ , l'étude disponible est aussi de Fuller et coll ([41]), mais les données ne sont réalisées qu'en présence d'ions divalents.

Qualitativement, le modèle reproduit bien la croissance de la force interne avec le degré de compaction et l'influence des contre-ions. La force interne est plus faible en présence d'ions divalents. Quantitativement le résultat est plus nuancé. L'accord quantitatif est correct pour $\rho < 0.25$ ¹⁸, mais la force interne grandit beaucoup plus vite que celle prédite par notre théorie aux concentrations supérieures. La différence est moins marquée pour λ , mais s'affiche clairement pour $\rho > 0.3$. Il manque un élément important dans la théorie pour expliquer cette différence. Enfin, la différence observée entre les deux phages invalide la vision selon laquelle la force interne ne dépendrait que de la fraction volumique en ADN.

9.4.2 Inhibition d'éjection par pression osmotique

En 2003, Evilevitch et coll ont montré qu'il était possible d'inhiber partiellement ou totalement l'éjection de l'ADN des phages λ en les faisant éjecter *in vitro* dans une solution de polymères [35]. Cette technique s'apparente à la méthode décrite figure 9.3. Les polymères ne pouvant rentrer dans la capsid, ils exercent une pression osmotique s'opposant à l'éjection de l'ADN du phage (voir figure 9.7). Pour une pression osmotique donnée, une fraction de l'ADN du phage est éjectée, jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint, la pression interne du phage égalant la pression osmotique du polymère (pour une description plus détaillée et plus rigoureuse du phénomène, voir [34]). Les expériences sont répétées afin de mesurer la quantité d'ADN restant à l'intérieur du phage en fonction de la pression osmotique appliquée. Dans notre cas, la fraction d'ADN restant à l'intérieur du phage est traduite en terme de concentration volumique.

Ce type d'expériences a été réalisé pour λ [35, 17, 132, 43], SPP1[116], et T5[74]. Nous allons comparer de manière succincte le modèle aux résultats de suppression osmotique obtenus avec ces 3 phages (voir figure 9.7).¹⁹ De la même manière que pour les expériences d'encapsulation, nous traçons les deux courbes théoriques de résultats, la courbe verte montre

17. Bien que les fluctuations statiques et dynamiques du moteur d'encapsulation de T4 ne permettent pas de mesurer la force interne exercée par l'ADN, contrairement à λ et $\phi 29$

18. Si l'on cherche à obtenir un meilleur accord dans ce régime, il faut prendre en compte la différence dans la longueur de Debye, puisque les mesures sur les condensats sont à 150mM NaCl tandis que l'encapsulation est effectuée à 100mM NaCl 1mM $MgSO_4$. De plus, il est probable que dans ce régime l'empilement ne soit pas parfaitement hexagonal compact, augmentant la valeur du paramètre α liant d_i et ρ . [26]

19. Notons que l'article de Sao Jose[116] a permis de montrer que les expériences précédentes pouvaient souffrir d'un biais lié à l'effet de l'inactivation de l'ouverture du phage par effet de l'agent de stress osmotique. La pression nécessaire à inhiber l'éjection de λ est peut être sous estimée.

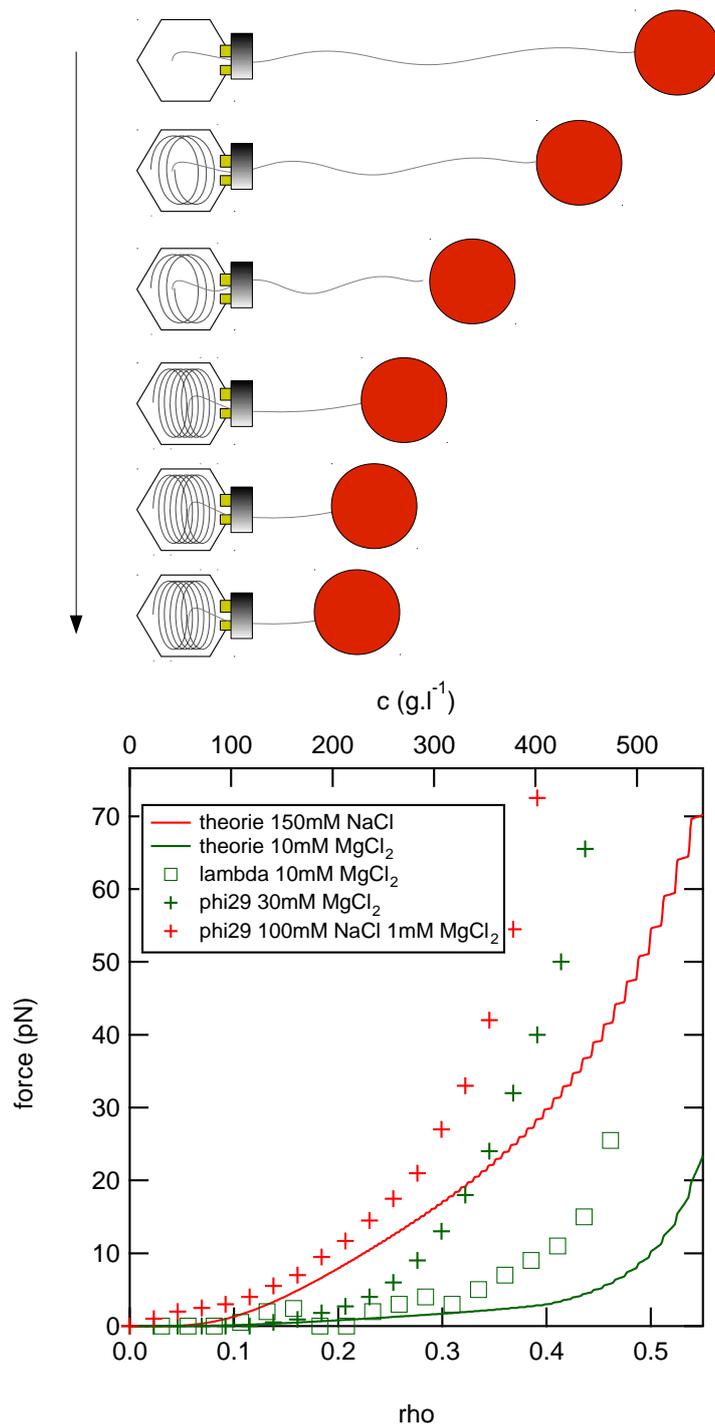


Figure 9.6 – Comparaison théorie / expériences d'encapsidation. Haut : schéma de principe des expériences d'encapsidation. Une capsid est fixée sur la surface d'une bille (non représentée) à l'aide d'anticorps spécifiques de la capsid. Une extrémité de l'ADN est attachée à la capsid via la terminase tandis que l'autre extrémité est fixée sur une bille tenue par une pince optique. La terminase transfère l'ADN dans la capsid. La quantité d'ADN insérée est mesurée à l'aide de la pince optique qui exerce une force constante sur l'ADN. La vitesse du moteur est maximale au début de l'encapsidation puis diminue. Bas : courbes montrant la croissance de la force interne exercée par l'ADN en fonction de la fraction volumique d'ADN encapsidée chez phi29 (+) et chez lambda (□). Les courbes théoriques issues du modèle figure 9.5 sont en trait plein. Données issues de [39] et [41].

les résultats attendus en présence d'ions divalents et la courbe rouge les résultats attendus en présence d'ions monovalents. Les résultats obtenus avec les trois phages sont comparés à ces courbes, après un rééchelonnement suivant leur concentration volumique.^{20 21}

De la même manière que pour les expériences d'encapsidation, nous pouvons observer un accord qualitatif des résultats : en absence d'agent stressant, aucune pression externe ne s'exerce sur l'ADN et tout l'ADN est éjecté hors de la capsid. Si une force externe est exercée par l'ajout d'un agent osmotique, une partie de l'ADN du phage reste bloquée dans la capsid. Plus la force externe est grande, plus la quantité d'ADN restante dans la capsid sera grande. Qualitativement, un travail récent [132] sur lambda a permis de confirmer l'influence du type de contre-ions dans ces expériences, la fraction volumique d'ADN restant dans la capsid étant plus faible en présence d'ions monovalents qu'en présence d'ions divalents. Les résultats obtenus pour le phage T5 en présence d'ions monovalents sont très étonnants puisqu'ils sont quasiment identiques à ce qui est obtenu pour les autres phages dans les solutions d'ions divalents.²²

Si l'on fait abstraction de cette remarque, on peut voir que globalement, les phages gardent "moins" d'ADN dans leur capsid qu'attendu. Cette observation s'accorde bien avec les différences observées dans les expériences d'encapsidation entre théorie et expériences, où la force d'encapsidation est plus forte qu'attendu. En effet, si la force d'encapsidation est plus grande que prévue, cela signifie que pour un d_i donné, la pression dans la capsid est plus grande qu'attendu. Ainsi, on s'attend à ce qu'une concentration volumique plus faible que la théorie soit suffisante pour s'opposer au stress osmotique. Une publication a déjà observé ce phénomène et l'a expliqué par l'effet de la courbure de l'ADN dans la capsid [34]. Nous pensons que l'effet de la courbure répartie de manière homogène dans la capsid est négligeable (voir paragraphe 9.3.1.3). Nous proposons que la différence observée puisse être expliquée par la "frustration" de l'ADN. Cette frustration proviendrait non pas d'une courbure répartie de manière homogène dans la capsid, mais des surfaces de défauts entre nanodomains d'ADN qui ont été observées en cryomicroscopie électronique pour T5 ([75] et figure 9.2).

20. Π , la pression osmotique est reliée à la distance interbrin d_i d'après les mesures expérimentales figure 9.4, et d_i est relié à la distance interbrin via la relation $\rho = (\alpha/d_i)^2$. Nous pouvons donc en déduire la relation reliant Π à ρ pour les 2 conditions ioniques présentées.

21. $1pN.nm^{-2} = 10atm = 10^6Pa$

22. en plus d'un comportement curieux pour des pressions inférieures à $0.7pN.nm^{-2}$ où sont observées des bandes de longueur discrète.

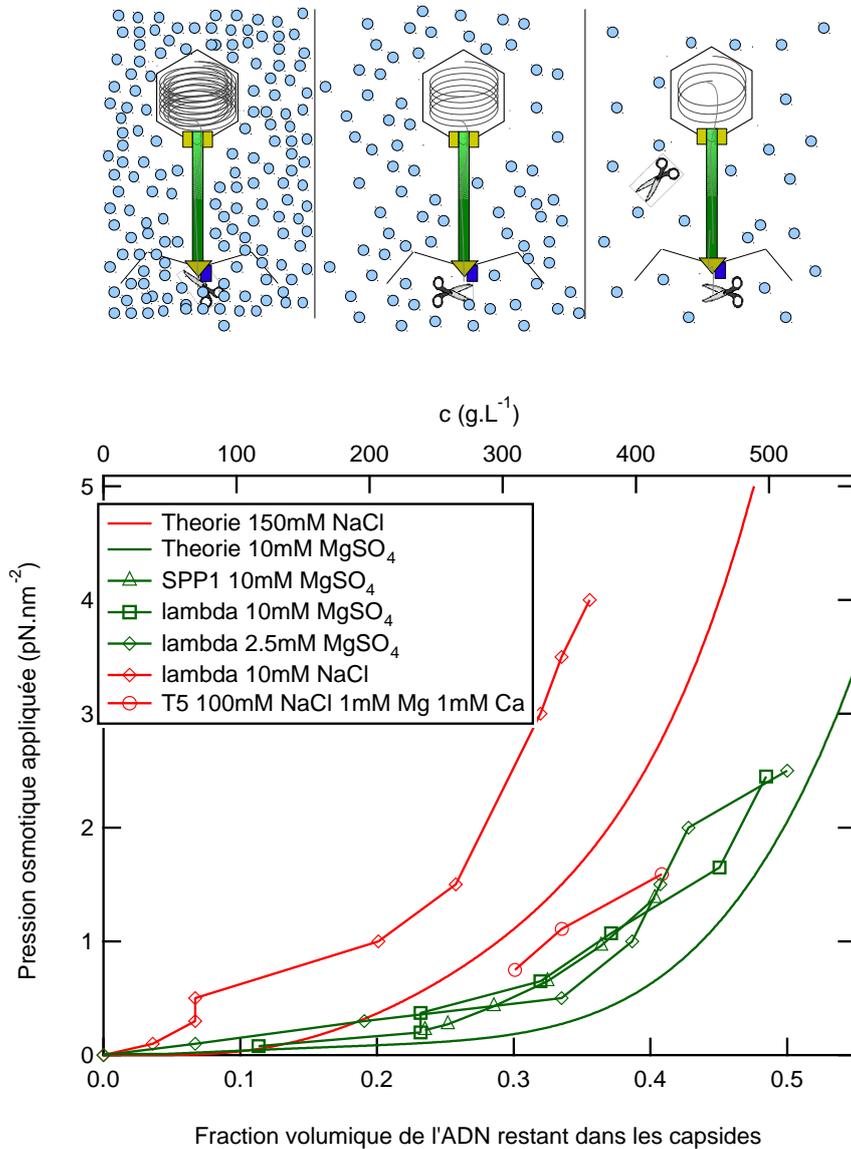


Figure 9.7 – Haut : principe des expériences de suppression osmotique. Une quantité d'ADN plus ou moins grande est éjectée de la capsid du phage en fonction de la pression osmotique externe. L'ADN éjecté est dégradé par des nucléases ajoutées au milieu. La mesure de la quantité d'ADN restant dans la capsid à l'équilibre pour différentes pressions osmotiques appliquées permet d'obtenir les courbes de la figure du bas. Bas : données disponibles dans la littérature pour différents phages sur les expériences de suppression osmotique. Les données pour lambda à 10mM MgSO_4 sont issues de [43], à 2.5mM MgSO_4 et 10mM NaCl de [132], pour SPP1 les résultats proviennent de [116], et pour T5 de [74].

9.5 Conclusion

Selon la théorie et les expériences à la fois d'encapsidation et de suppression osmotique, il se dégage une idée logique : **plus la fraction volumique d'ADN dans la capsid est grande, plus la force interne exercée par l'ADN est grande**. Le milieu dans lequel baigne le phage influe énormément sur cette force, la **pression osmotique externe de la solution** ainsi que la **concentration** et le **type de contre-ions** présents dans la solution sont les facteurs les plus importants. La force est ainsi réduite en présence de contre-ions monovalents par rapport aux contre-ions divalents.

Toutefois, même en prenant en compte ces paramètres dans le modèle, il semble manquer un élément essentiel pour expliquer quantitativement la valeur de la force interne. Je propose que cet ingrédient soit la **frustration de l'ADN** dans la capsid, qui est totalement négligée par le modèle semi-empirique. L'énergie libre de l'ADN serait dominée par les défauts cristallins de l'ADN entre nanodomains hexagonaux aux hautes fractions volumiques dans les capsides de phage.

Pour développer la dernière idée, il serait utile de pouvoir quantifier le degré de frustration de l'ADN dans les capsides. Il est possible, par exemple, que l'ADN soit mieux ordonné chez certains phages, réduisant ainsi la frustration de l'ADN.²³ Par exemple, chez T7, il est possible que le cylindre interne à la capsid favorise une configuration en bobine, plus proche du tore "idéal" d'ADN. D'ailleurs cet ordre pourrait, peut-être, se voir simplement sur des expériences de diffraction aux rayons X. L'ADN de lambda possède un ordre à longue portée visible par une modulation du pic de diffraction qui n'est pas présent chez le phage T4.[29]

23. On peut supposer que l'ADN est mieux ordonné chez lambda que chez phi29 ce qui expliquerait par exemple pourquoi la force interne est beaucoup plus faible chez lambda que chez phi29 à haute fraction volumique.