



HAL
open science

Modifications structurales du Virus de la Mosaïque du Brome et interactions entre particules virales en solution : application à la cristallisation

Marina Casselyn

► **To cite this version:**

Marina Casselyn. Modifications structurales du Virus de la Mosaïque du Brome et interactions entre particules virales en solution : application à la cristallisation. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2002. Français. NNT: . tel-00006118

HAL Id: tel-00006118

<https://theses.hal.science/tel-00006118>

Submitted on 18 Jun 2004

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.



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Biophysique Moléculaire

Ecole doctorale Inter///Bio

présentée par

Marina Casselyn

pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

**Modifications structurales du Virus de la Mosaïque du
Brome et interactions entre particules virales en solution :
application à la cristallisation**

Soutenue le 18 décembre 2002 devant le jury composé de :

Pr. Hervé Delacroix	Directeur de thèse
Pr. Paul Vigny	Président du jury
Dr. Christine Ebel	Rapporteur
Pr. Roger Fourme	Rapporteur
Dr. Theyencheri Narayanan	Examineur
Dr. Félix Rey	Examineur
Dr. Annette Tardieu	Invitée

Equipe de Bioinformatique Structurale (UPMC - Centre de Génétique Moléculaire)
Bâtiment A, 4ème étage, Case courrier 11 - 7, quai St Bernard - 75252 Paris cedex 05

Remerciements

Ma thèse s'est déroulée entre deux laboratoires : l'équipe de BioInformatique Structurale (Centre de Génétique Moléculaire), et le Laboratoire de Minéralogie et Cristallographie de Paris, où j'ai effectué une grande partie de mon travail expérimental.

Je remercie Monsieur André Adoutte, qui nous a quittés en mars 2002, pour m'avoir accueillie au Centre de Génétique Moléculaire.

Je remercie Monsieur Bernard Capelle, directeur du Laboratoire de Minéralogie et Cristallographie de Paris, pour m'avoir permis de travailler dans ses locaux.

Je remercie particulièrement le professeur Hervé Delacroix, directeur de l'équipe de BioInformatique Structurale, pour avoir dirigé mes recherches, ainsi qu'Annette Tardieu, pour tout le temps qu'elle m'a consacré.

Je tiens à remercier tout le groupe Systèmes Moléculaires et Biologie Structurale de Jean-Paul Mornon, et particulièrement Claudine Mayer et Nicolas Boisset pour leur participation à ma formation et leur collaboration à mon travail de recherche, en cristallogénèse et en microscopie.

Je remercie également Jean Delettré et Paul Vigny pour m'avoir fait entrer, depuis la maîtrise, dans le milieu de la Biophysique.

Je remercie Christine Ebel et Roger Fourme d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Theyencheri Narayanan, Félix Rey et Paul Vigny d'avoir bien voulu en être les examinateurs.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai collaboré ou qui m'ont aidée dans mon travail : Jean Witz (IBMC), sans qui la production du virus n'aurait pas été possible, pour sa disponibilité et pour ses connaissances en virologie dont il m'a fait profiter ; Patrick Dumont (CEMV) et Jean-Michel Camadro (IJM), pour la culture de l'orge ; Javier Perez et Patrice Vachette (LURE), ainsi que Stéphanie Finet (ESRF) pour la diffusion des rayons X aux petits angles ; Eric Larquet, pour m'avoir permis de numériser les négatifs de microscopie dans son laboratoire ; Josette Parand et Jean-Pierre Lechaire (Biologie Marine) pour la microscopie électronique ; Celia Plisson, qui m'a fait cadeau d'une semaine de sa vie de thésarde, et Patrick Bron (ICM), pour la reconstruction tridimensionnelle du BMV.

Je remercie encore Hervé, pour avoir supporté mon sale caractère, et Annette pour sa patience inlassable.

Je remercie les Annette's girls : Fériel, Karine et Françoise, ainsi que Nour, et bien sûr Denis V.

Je remercie tous mes compagnons de cafet, par ordre alphabétique ! : Emilie, Franck, et Victoria, et les anciens petits DEA maintenant thésards Guillaume, Richard, Sabrina et Ludovic. Je remercie également ceux qu'on ne voit pas souvent à la cafet : Jean-Luc et Jérôme, et puis Bertrand.

Mention spéciale pour les membres de l'équipe de BioInfo Structurale : Marie-Agnès, Thomas, Sébastien, Marie-Hélène et Vincent.

Je remercie également tous les membres du « couloir 16-15 » : Annick, Claire, Claudine, Gaëlle, Isabelle, Jean, Nicolas, Nikki, Paul, Sophie et Tatiana.

Merci à tous les « anciens de Paris 6 » : Andrée, Murielle, Albéric, Eva, Guillaume, à la promotion 1999 du DEA de Biophysique Moléculaire : Marie-Jeanne, Ludovic et Thomas, Christophe et Xavier, et à tous les autres que je ne cite pas mais que je n'oublie pas.

Merci aussi à Marc alias LCV, pour tout, mais ça ne fait que commencer...

Enfin je remercie mon père, à qui je dédie cette thèse, ainsi que Suzanne et Hélène.

Résumé

Les virus sont des objets biologiques dont les mécanismes de prolifération restent mal compris, et dont la taille et l'organisation du génome rendent la cristallisation difficile. Nous avons étudié les modifications structurales d'un virus sphérique de plante, le Virus de la Mosaïque du Brome (BMV), ainsi que les interactions entre particules virales en solution afin de définir des conditions de cristallisation.

Le gonflement de la capsid lors de l'entrée du virus dans les cellules de plantes est impliqué dans la prolifération virale. Dans un premier temps, nous avons modélisé la capsid du BMV, sous sa forme compacte à pH 5,9 et sous sa forme gonflée à pH 7,5, par reconstruction tridimensionnelle à partir de clichés de cryomicroscopie. Nous avons ainsi pu observer le réarrangement de l'ARN entre les deux états.

Nous avons ensuite étudié les interactions entre particules virales en solution par diffusion des rayons X aux petits angles. Nous avons fait varier plusieurs paramètres physico-chimiques comme le pH, et la concentration en sels et en polymères, afin d'induire des interactions attractives entre virus en solution. En effet, la cristallisation des protéines a lieu en régime attractif. Grâce aux résultats obtenus par l'utilisation de polyéthylène glycol (PEG), nous avons pu déterminer des conditions de cristallisation du BMV, et montrer la corrélation existant entre la nature des interactions en solution et la cristallisation de macromolécules de la taille du BMV.

Nous avons également mis en évidence qu'un excès de PEG provoque la précipitation microcristalline des virus. L'étude de la cinétique d'apparition et de croissance des microcristaux nous a permis de mieux caractériser les étapes précoces de cristallisation du BMV en présence de PEG.

Abstract

Viruses are biological objects, which mechanisms of proliferation remain badly understood, and which size and organization of the genome make crystallization difficult. We studied the structural modifications of a spherical plant virus, the Brome mosaic Virus (BMV), as well as the interactions between viral particles in solution in order to define crystallization conditions.

The capsid swelling that occurs when the virus enters into the host cells is involved in the viral proliferation. We modeled the BMV capsid, in its compact form at pH 5.9 and in its swollen form at pH 7.5, by three-dimensional reconstruction from electron cryomicroscopy images. We thus could observe the rearrangement of RNA between the two forms.

We then studied the interactions between viral particles in solution by small angle X-ray scattering. We varied several physicochemical parameters as pH, and polymer and salt concentration, to induce attractive interactions between viruses in solution. Indeed, crystallization of protein occurs in attractive regime. Owing to the results obtained by using polyethylene glycol (PEG), we could determine crystallization conditions of BMV, and show the correlation existing between the nature of the interactions in solution and the crystallization of macromolecules of the size of BMV.

We also highlighted that an excess of PEG causes the microcrystalline precipitation of the viruses. The study of kinetics of appearance and growth of the microcrystals enabled us to better characterize the early stages of crystallization of BMV in presence of PEG.

Liste des principales abréviations

2D	bidimensionnel
3D	tridimensionnel
Å	Angström
A ₂	deuxième coefficient du viriel
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
Da	Dalton (1,66 .10 ⁻²⁷ kg)
DXPA	Diffusion des rayons X aux Petits Angles
EDTA	Ethylène-DiamineTétrAcétate
I(c,s)	Intensité diffusée
I(0,s), S(c,s)	facteur de forme, facteur de structure
M	« molaire » ou concentration molaire (nombres de moles par litre)
PDB	Protein Data Bank
PEG	PolyEthylene Glycol

Virus (pour la plupart des virus, nous utiliserons les noms anglais)

BMV	virus de la mosaïque du brome, ou brome(grass) mosaic virus
CCMV	virus de la marbrure chlorotique de la cornille, ou cowpea chlorotic mottle virus
CMV	virus de la mosaïque du concombre, ou cucumber mosaic virus
CPMV	virus de la mosaïque de la cornille, ou cowpea mosaic virus
STNV	virus satellite de la nécrose du tabac
SV 40	virus simien 40
TBSV	virus du rabougrissement buissonneux de la tomate, ou tomato bushy stunt virus
TMV	virus de la mosaïque du tabac, ou tobacco mosaic virus
TYMV	virus de la mosaïque jaune du navet, ou turnip yellow mosaic virus

Laboratoires et organismes cités

CGM	Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette
CRMC2	Centre de Recherche sur les Mécanismes de Croissance Cristalline, Marseille
ESFR	European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble
IBPC	Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg
ICM	Interactions Cellulaires et Moléculaires, Rennes
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
LMCP	Laboratoire de Minéralogie et Cristallographie de Paris
LURE	Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique, Orsay
UPMC	Université Pierre et Marie Curie, Paris

MODIFICATIONS STRUCTURALES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU BROME ET INTERACTIONS ENTRE PARTICULES VIRALES EN SOLUTION : APPLICATION A LA CRISTALLISATION

INTRODUCTION.....	9
I- GENERALITES SUR LES VIRUS ET PRESENTATION DU SYSTEME.....	11
I-A. Généralités	11
1) Structure des virus.....	11
Le génome viral.....	13
La capside.....	14
L'enveloppe lipidique	19
2) Mécanismes d'infection et multiplication	20
I-B. Particularités des virus de plantes	21
1) Les différents types de virus de plantes	22
2) Mode d'infection et de propagation	22
I-C. Le Virus de la Mosaïque du Brome	26
1) Production et purification du BMV	27
2) Propriétés du BMV	28
Fonction des protéines codées par le génome du BMV	29
Auto-assemblage et stabilisation des capsides	30
Dynamique structurale des capsides.....	33
3) Structure du BMV à basse résolution	35
II- STRUCTURE DU BMV A HAUTE RESOLUTION	38
II-A. Structure atomique du BMV, déterminée par Lucas et coll. (2002).....	38
1) Organisation de la capside	39
2) Stabilisation de la capside.....	41
II-B. Modélisation par homologie de séquences : principe et résultats.....	47
1) Principe	47
2) Résultats.....	49
3) Validation du modèle.....	50
4) Attribution des structures secondaires	52
II-C. Structure de la forme gonflée du BMV à 30 Å de résolution	57

1) La cryomicroscopie électronique	58
Présentation de la méthode	58
Préparation et observation des échantillons	59
2) Principe de la reconstruction des virus icosaédriques par Transformée de Fourier Polaire (TFP)	59
3) Reconstruction du BMV	61
III- INTERACTIONS ENTRE MACROMOLECULES EN SOLUTION	66
III-A. Les forces d'interaction entre particules en solution	66
1) Forces répulsives de volume exclu ou de « sphères dures »	67
2) Forces électrostatiques	68
3) Forces de Van der Waals	69
4) Effet Hofmeister	70
5) Attraction de déplétion	71
6) Autres types d'interactions	72
Les liaisons hydrogènes	72
L'hydratation	73
III-B. Diagrammes de phases et cristallisation des macromolécules biologiques	74
1) Solubilité des macromolécules	74
2) Méthodes de cristallisation	76
3) Nucléation	77
4) Croissance cristalline	79
III-C. La diffusion des rayons X aux petits angles	81
1) Principe	81
2) Facteur de forme et facteur de structure	83
Diffusion par une solution idéale	83
Diffusion par une solution de particules	84
Calcul de modèles de diffusion théoriques	85
Diffusion par un échantillon constitué de deux phases	86
Diffraction des rayons X	87
3) Dispositif expérimental	88
Ligne D24 au LURE, Orsay	88
Ligne ID2, à l'ESRF (Grenoble)	92

IV- INTERACTIONS ENTRE PARTICULES VIRALES EN SOLUTION	95
IV-A. Effets du pH et des sels sur les interactions en solution	96
1) Effet du pH.....	97
2) Effet des sels	99
IV-B. Effets du pH et des sels sur la structure du virus	101
1) Observation des signaux de diffusion	101
2) Calculs de modèles théoriques de la diffusion de sphères creuses	104
IV-C. Effets du polyéthylène glycol	107
1) Effet synergique entre sels et PEG.....	107
2) Effets du PEG seul	109
V- ETUDE DES PRECIPITES OBTENUS EN PRESENCE DE POLYETHYLENE GLYCOL : DES MICROCRISTAUX AUX CRISTAUX	114
V-A. Diagrammes de phases et cristallisation du BMV	114
1) Diagrammes de phases.....	114
2) Cristallisation du BMV	116
3) Diffraction des cristaux.....	119
Cryoprotection.....	119
Fragilité des cristaux.....	120
Diffraction à 8 Å.....	120
V-B. Caractérisation des pics de diffraction obtenus avec les échantillons de BMV précipités.....	122
1) Caractéristiques des signaux de diffraction observés	122
2) Indexation des pics de diffraction	128
3) Taille des microcristaux	129
4) Cinétique de croissance et nucléation	131
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	142

INTRODUCTION

Les interactions entre macromolécules jouent un rôle central dans tous les processus biologiques : la reconnaissance (par exemple hormone/récepteur), la synthèse ou la dégradation (la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase, l'endocytose de molécules étrangères par les macrophages), le modelage cellulaire (l'auto-assemblage du cytosquelette), et les processus d'assemblage en général... Les interactions intermoléculaires gouvernent également de nombreux évènements physico-chimiques observés *in vitro* comme les transitions de phase et la cristallisation par exemple.

Nous avons choisi d'étudier le Virus de la Mosaïque du Brome (BMV), car ce petit virus sphérique de plante a servi de modèle pour de nombreuses études biochimiques et structurales. La capsid du BMV possède des propriétés dynamiques particulières. L'assemblage de cette capsid résulte de l'association spontanée de protéines identiques, dans des positions spécifiques dites quasi-équivalentes, suivant une symétrie icosaédrique. Cet auto-assemblage étant non-covalent, il facilite la prolifération virale grâce au gonflement et à la déstabilisation de la capsid qui ont lieu lors de la pénétration du virus dans la cellule hôte.

L'assemblage qui a lieu *in vivo* peut être reproduit *in vitro* et, selon les conditions, produire des capsides vides ou des virus entiers. Enfin, la forme sphérique du BMV lui confère des propriétés particulières au niveau de l'analyse des interactions entre particules en solution, mais également au niveau des mécanismes de cristallisation.

Afin de mieux comprendre les caractéristiques structurales du BMV, nous avons voulu établir un modèle de la structure tridimensionnelle complète du virus en la modélisant par homologie à partir de la structure cristallographique du Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV). La protéine de capsid du CCMV présente en effet une très forte identité de séquence avec celle du BMV. Nous avons également voulu étudier les modifications structurales entre la forme gonflée et la forme compacte du BMV, grâce à la reconstruction tridimensionnelle du virus à partir de clichés de cryomicroscopie.

De nombreuses études de diffusion des rayons X, des neutrons et de lumière, ont été menées sur le BMV aussi bien pour observer la cinétique d'assemblage de la capsid *in vitro*, que la stabilité et la forme du virus dans différentes conditions de pH et de sels. En revanche,

les interactions entre particules virales entières n'avaient jamais été étudiées de façon systématique, sur le BMV ou sur tout autre virus d'ailleurs.

Nous avons mis en œuvre l'étude du BMV par diffusion des rayons X aux petits angles, en collaboration avec l'équipe d'Annette Tardieu (LMCP), afin de mettre en évidence avec des macromolécules aussi grosses que le BMV ($4,6 \cdot 10^6$ Da) la corrélation existant déjà entre la nature des interactions en solution et la cristallisation de molécules de tailles plus réduites. En effet, il est maintenant reconnu que la cristallisation des protéines a lieu dans des conditions attractives. La variation de paramètres physico-chimiques tels que le pH, et la présence ou la concentration de sels et en polymères, peuvent induire des interactions attractives en solution, donc la cristallisation.

Cette thèse s'organise en cinq chapitres. Les deux premiers s'intéressent à la structure du BMV lui-même, et les trois derniers chapitres décrivent le comportement des particules virales en solution.

Le premier chapitre consiste en une introduction bibliographique générale portant sur les virus, qui sont des objets biologiques très originaux d'un point de vue métabolique et structural, et en une présentation plus spécifique du Virus de la Mosaïque du Brome. Le protocole de production du BMV a également été introduit dans ce chapitre.

Le deuxième chapitre porte sur la structure à haute résolution du BMV, et traite des techniques utilisées pour les modèles des formes compacte et gonflée du virus.

La théorie des forces d'interaction entre macromolécules en solution, les notions de solubilité et de cristallisation, et la technique de diffusion des rayons X aux petits angles sont rassemblées dans le Chapitre III.

Le Chapitre IV présente les résultats obtenus par diffusion des rayons X aux petits angles sur les solutions de particules virales en fonction des variations du pH et des concentrations en sels et en polyéthylène glycol.

Enfin, le Chapitre V décrit les expériences mises en œuvre à partir des résultats présentés dans le Chapitre IV. Elles concernent la cristallisation du BMV et les étapes précoces de cristallisation.

La conclusion présentera les orientations futures de ce travail.

I- GENERALITES SUR LES VIRUS ET PRESENTATION DU SYSTEME

I-A. Généralités

1) *Structure des virus*

Certains considèrent les virus comme étant la forme de vie la plus simple ; pourtant il n'existe pas de « cellule virale ». Le virus se situe aux limites du monde vivant : il possède, comme tous les êtres vivants, la capacité de répliquer son propre patrimoine génétique, et cependant, bien qu'il soit capable de se multiplier, le virus, contrairement aux cellules, ne respire pas, ne croît pas, ne se divise pas, et n'a aucun échange avec le milieu externe. La composition d'un virus est minimaliste; elle consiste en un génome, protégé du milieu extracellulaire par une capsidie protéique qui a la propriété de s'auto-assembler. Ce complexe nucléoprotéique est appelé nucléocapsidie.

En 1953, André Lwoff donne une définition du virus, quelle que soit son origine (animale, végétale, bactérienne) :

1. un virus ne possède qu'un seul type d'acide nucléique (ARN ou ADN).
2. un virus se reproduit uniquement à partir de son acide nucléique.
3. un virus ne croît pas en taille et ne peut pas se scinder pour se multiplier, il se multiplie dans la cellule grâce à la synthèse et à l'assemblage de ses constituants.
4. un virus ne contient aucune information génétique concernant les enzymes du métabolisme intermédiaire (production d'énergie).
5. un virus ne se multiplie qu'à l'intérieur de cellules vivantes.

Depuis, cette définition a évolué, car il a été montré que certains virus plus complexes comme les Herpesvirus ou les Poxvirus, codent pour des enzymes nécessaires au métabolisme de l'ADN viral. D'autres enfin comme les Rétrovirus peuvent transporter des enzymes particulières comme une intégrase, une protéase, ou une transcriptase inverse.

Certains virus protègent leur génome avec deux couches protéiques concentriques, comme les Rotavirus. Les virus peuvent aussi être enveloppés, c'est à dire qu'ils sont entourés

d'une bicouche lipidique contenant les glycoprotéines de fusion nécessaires au mécanisme d'infection (Figure I-1). Ces protéines, également appelées spicules, apparaissent sous forme de petites protubérances à la surface de l'enveloppe virale.

Une particule virale infectieuse, c'est-à-dire complète (composée de la capsid, du génome, de l'enveloppe et/ou de protéines particulières selon les cas), peut être également appelée « virion ».

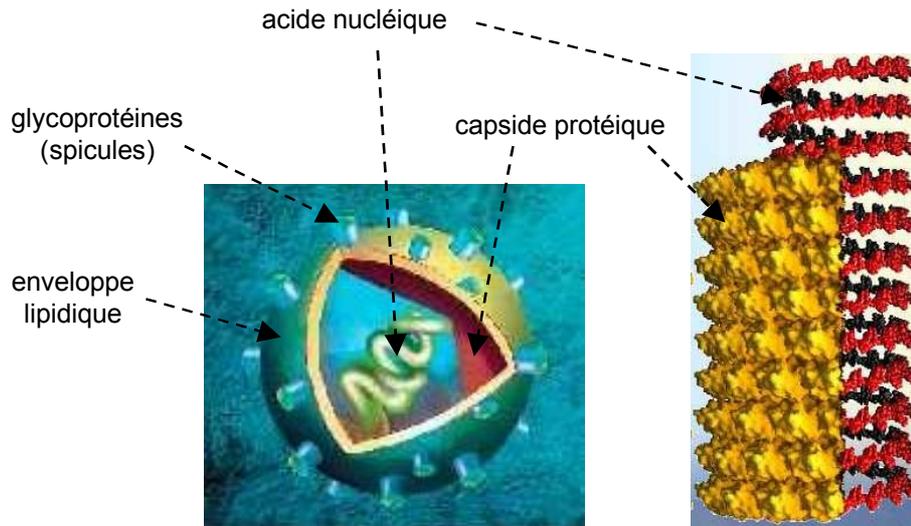


Figure I-1 : Structure des deux grandes formes de virus : sphérique et hélicoïdale (Sources : www.astrosurf.com/lombry/bioastro-originevie5.htm et Namba et coll., 1989). Les virus sphériques les plus simples sont constitués d'un génome protégé par une coque protéique ou capsid ; d'autres plus complexes, dits « enveloppés », sont entourés d'une membrane lipidique contenant les glycoprotéines de fusion nécessaires à la pénétration du virus dans la cellule hôte. Les virus hélicoïdaux ont une forme de bâtonnet, et peuvent également être enveloppés. Leur génome s'insère dans la capsid pendant sa construction.

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires : comme ils ne possèdent aucun organe, ils sont entièrement dépendants de leur cellule hôte, dont ils détournent les ressources métaboliques et la machinerie intracellulaire. Un virus est d'abord caractérisé par son spectre d'hôte, c'est-à-dire le type de cellule qu'il infecte. Un virus particulier aux bactéries est un bactériophage, on parle de « virus animal » et de phytophage ou « virus végétal ». Quelques exemples de virus sont donnés dans la Figure I-2.

Tous les virus, quelle que soit la nature de leur hôte, peuvent être classés selon trois critères :

- la nature de leur génome, qui peut être de l'ADN ou de l'ARN, mono ou bicaténaire.
- la symétrie de la capsid, qui peut être icosaédrique (sphérique) ou hélicoïdale (en bâtonnet).

- la présence ou l'absence d'enveloppe lipidique; le virus sera dit respectivement « enveloppé » ou « nu ».

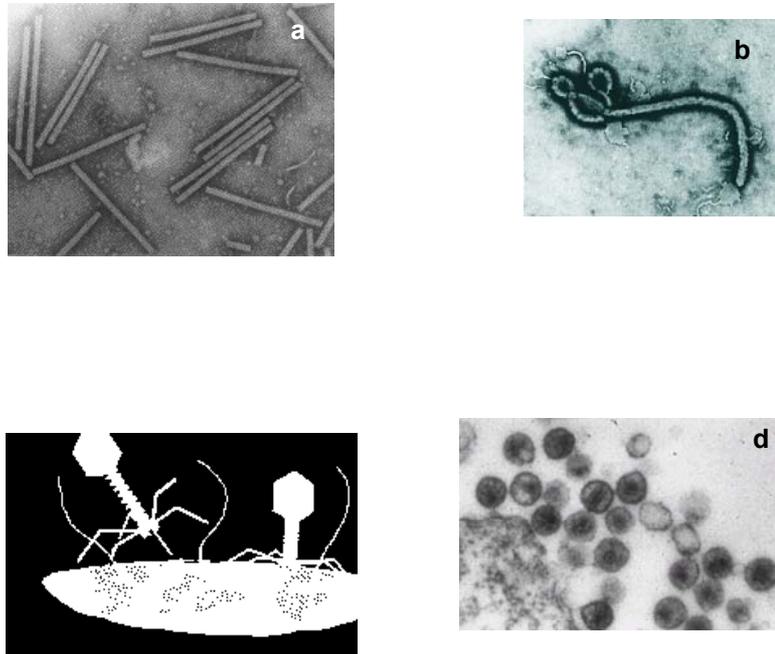


Figure I-2 : Quelques exemples de virus.

- a) Virus hélicoïdal : le Virus de la Mosaïque du Tabac, d'un diamètre de 10 à 18 nm, et d'une longueur de 250 nm (www.virology.net/Big_Virology).
- b) Virus filamenteux, à symétrie hélicoïdale : le virus Ebola, d'un diamètre de 80 nm et d'une longueur de 130-14 000 nm (www.astrosurf.com/lombry/bioastro-originevie5.htm).
- c) Virus complexe : le Bactériophage T4, à tête icosaédrique (diamètre de 70 nm en moyenne) et queue contractile (80-400 nm) (www.cellsalive.com/phage.htm).
- d) Virus sphérique, enveloppé : Virus de l'Immunodéficience Humaine, d'un diamètre variant entre 100 et 120 nm (<http://medstat.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/AIDS/AIDS002.html>).

Le génome viral

Le génome viral contient l'ensemble de l'information génétique nécessaire à la construction de nouvelles particules complètes infectieuses. Le volume de la capsid virale étant restreint, le génome doit être le plus petit possible. Le TMV par exemple est constitué de 95% de protéines, et de 5% d'ARN. Le nombre de gènes peut aller de 3 à 200, selon la complexité des virus. Ils peuvent être portés par un ou plusieurs fragments d'acide nucléique.

Dans le cas des virus à ADN, la longueur du génome varie de 2.5 Kb à 375 Kpb. Les ADN viraux ne sont porteurs que de gènes codant pour des protéines, et non pas, comme dans le cas des eucaryotes, d'ARN de transfert ou d'ARN ribosomal. Dans le cas des virus à ARN, la longueur des génomes varie de 3,6 Kb à 30 Kb. Les virus sont les seuls objets biologiques dont le génome peut être constitué uniquement d'ARN.

La stratégie de réplication d'un virus dépend de la nature de son génome. Le virus doit dans tous les cas produire dans le cytoplasme de la cellule infectée des ARN messagers, qui seront reconnus par la machinerie de l'hôte pour être traduits en protéines virales.

La taille réduite du génome implique qu'il ne code que pour un petit nombre de protéines. La capsidite doit être constituée par l'assemblage de sous-unités identiques, ou appartenant à un petit nombre d'espèces distinctes. Caspar et Klug (1962) ont élaboré une théorie géométrique de la symétrie des capsides.

La capsidite

« the paradox of virion disassembly is that the virion must be stable enough to protect its acid, yet dynamic enough to release it to the host cell » (Albert et coll., 1997)

La grande particularité de la capsidite virale réside dans le fait qu'elle s'auto-assemble, c'est-à-dire que les sous-unités protéiques qui la composent s'organisent spontanément. *In vivo*, la présence de l'acide nucléique est parfois indispensable à cet assemblage. *In vitro*, les sous-unités capsidiques du Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV), du Cowpea Chlorotic Mosaic Virus (CCMV) et du Brome Mosaic Virus (BMV) forment des capsides vides en absence d'ARN, et des virions en présence d'ARN (Bancroft et coll., 1967; Cuillel et coll., 1983; Fraenkel-Conrat et Williams, 1955).

L'auto-assemblage non-covalent de la capsidite permet au génome viral d'être libéré rapidement dans le cytoplasme des cellules infectées, mais il permet également une encapsidation toute aussi rapide, nécessaire à leur protection, de l'ARN ou de l'ADN neo-synthétisé. Les capsides sont stabilisées par des liaisons hydrogènes, des liaisons ioniques, des interactions hydrophobes et de Van der Waals entre les protéines de capsidite ou entre les protéines et l'acide nucléique. L'auto-assemblage et l'architecture des capsides dépendent de trois types d'interactions : les interactions spécifiques ARN-protéines ou ADN-protéines qui initient et régulent le processus d'auto-assemblage, les interactions non-spécifiques acide nucléique-protéines, qui fixent le génome dans la capsidite, et les interactions protéines-protéines qui stabilisent la capsidite. La capsidite de virus comme le BMV et le CCMV serait plutôt stabilisée par des interactions ARN/protéines car elle nécessite, dans les conditions physiologiques, la présence d'ARN pour s'auto-assembler. Les Tymovirus et les Comovirus peuvent en revanche former *in vivo* des capsides vides, et sont donc majoritairement stabilisés par des interactions protéines-protéines.

Qu'elle soit composée de la répétition d'une protéine unique ou de plusieurs protéines codées par des gènes distincts selon la complexité des virus, une capsid virale ne peut s'assembler que selon deux modes. Le premier, et aussi le plus simple, consiste en un assemblage hélicoïdal des protéines selon un angle α . Dans le cas du Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV), la chaîne d'acide nucléique s'insère dans l'assemblage protéique en cours de formation. Le virion prend une forme de bâtonnet (Figure I-1, Figure I-2a). Dans le cas des phages filamenteux (Figure I-2 b), l'acide nucléique se retrouve dans le canal central. Le nombre de sous-unités protéiques autour de l'axe est de $360^\circ/\alpha$. Le TMV est le modèle type de virus à symétrie hélicoïdale. Il a été le premier virus observé par microscopie électronique, vers la fin des années trente.

Les autres virus ont une forme quasi-sphérique, dite « icosaédrique ». Le terme icosaédrique ne s'applique cependant pas à la forme du virus, puisque les virus ont le plus souvent à leur surface des protubérances (protomères) et sont plus ou moins sphériques, mais à la symétrie de la structure de la capsid du virus. C'est à cette catégorie de virus que nous allons particulièrement nous intéresser. Caspar et Klug ont montré en 1962 (Caspar et Klug, 1962) que la symétrie icosaédrique était la mieux adaptée pour l'assemblage de capsides sphériques à partir de sous-unités protéiques.

Un icosaèdre est un polyèdre composé de vingt faces triangulaires équilatérales. Il présente 15 axes d'ordre 2 (30 centres d'ordre 2), 10 axes d'ordre 3 (20 centres d'ordre 3), et 6 axes d'ordre 5 (12 centres d'ordre 5) (Figure I-1).

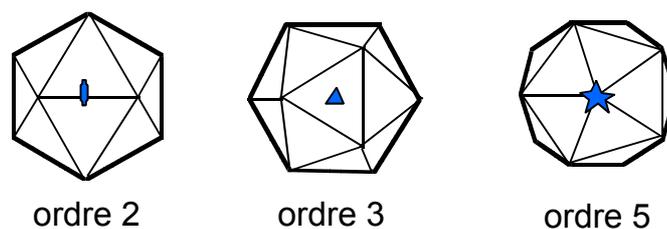


Figure I-1 : Représentation des axes de symétrie icosaédrique. L'icosaèdre est un polyèdre à 20 faces triangulaires équilatérales.

Les protéines de la capsid n'étant pas des objets symétriques, aucun axe de symétrie ne peut passer par elles. Il doit donc y avoir plus d'une protéine par face triangulaire. Une face triangulaire ayant une symétrie d'ordre 3, il est facile d'en déduire que chaque face peut être divisée en trois « unités asymétriques », chacune contenant une protéine ou « sous-unité asymétrique », reliées entre elles par un axe 3. Les plus petits virus sphériques ont donc une

capside composée de 60 protéines. Il en existe très peu, et ce sont pour la plupart des satellites d'autres virus, c'est-à-dire dépendants de virus plus complexes, car leur génome ne peut pas porter tous les gènes nécessaires à leur réplication. Par exemple, le Virus Satellite de la Nécrose du Tabac ne contient que le gène codant pour sa protéine de capsid. Il nécessite la présence du Virus de la Nécrose du Tabac, pour pallier les gènes manquants. En fait, la majorité des virus possède un génome trop grand pour être empaqueté dans un assemblage de 60 protéines seulement.

Comment, tout en respectant les contraintes de symétrie icosaédrique, des capsides de plus grande taille peuvent-elles s'assembler ? L'utilisation de protéines plus grandes permettrait d'augmenter la taille globale de la capsid, mais l'épaisseur résultante ne permettrait pas la formation d'un volume interne plus important. La plupart des capsides icosaédriques sont donc composées de plus de 60 protéines. Caspar et Klug ont montré, bien avant que la première structure atomique de virus ne soit résolue, que seuls certains multiples de 60 permettent la formation de capsides icosaédriques, où les protéines occuperaient des positions quasi-équivalentes, c'est-à-dire qu'elles auraient des environnements similaires mais pas totalement identiques grâce à une flexibilité des liaisons entre elles. La base de la quasi-équivalence est la formation interchangeable d'hexamères ou de pentamères par la même protéine, à partir d'un réseau hexagonal (Figure I-2).

Un hexagone, isolé, peut être décomposé en six triangles équilatéraux. Si l'on supprime l'un des ces triangles pour créer un pentamère, il faut induire une courbure pour relier les deux côtés laissés libres. Si l'hexagone n'est pas isolé, mais fait partie d'un réseau, le réseau entier subira une courbure pour la construction du pentamère. Lorsque la courbure est répétée 12 fois sur 12 hexagones adjacents, on obtient un icosaèdre simple. Si les hexagones choisis ne sont pas adjacents, on obtiendra une structure plus grosse.

En prenant pour origine un axe 5 dans le plan, on considère h et k , deux axes portés par les cotés du triangle. La position des autres axes 5 des pentamères dans le plan pourra être indexée selon un nombre de pas pris le long de h et k , reliés entre eux par un angle de 60° . On peut alors définir le nombre de triangulation T qui est le carré de la distance d entre deux axes 5 adjacents : $T = d^2 = h^2 + k^2 + 2hk \cos 60^\circ$, où d est la distance entre l'axe 5 origine et un autre axe, ce qui revient à $T = h^2 + hk + k^2$. Dans ce modèle, les capsides seront composées de $60T$ sous-unités, ou autrement dit de 12 pentamères et de $10(T-1)$ hexamères (Figure I-3). On dit que les protéines s'assemblent de façon « quasi-équivalente » dans le cas où des protéines

identiques forment la capside, ou « pseudo-équivalente » si la capside est constituée de protéines différentes (Picornavirus, Comovirus).

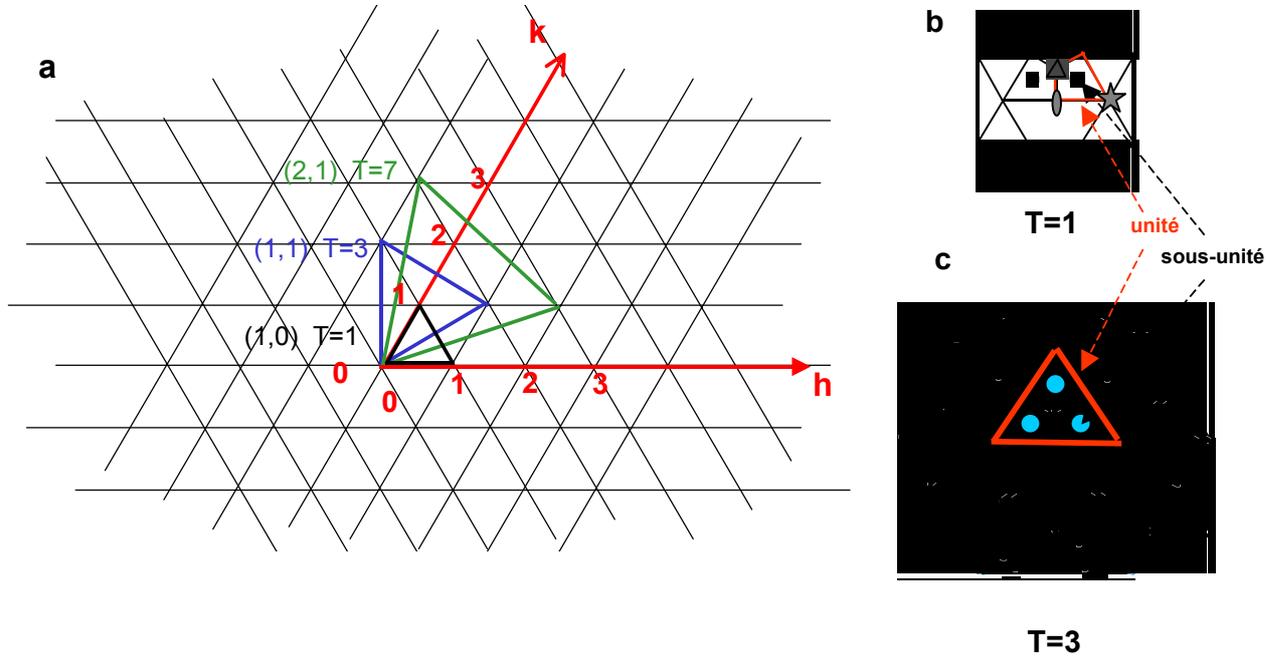


Figure I-2 : Construction d'icosaèdres quasi-équivalents.

- a) Réseau d'hexamères et axes (h,k) (Caspar et Klug, 1962; Johnson et Speir, 1997).
 b) Icosaèdre $T=1$. Chaque unité asymétrique contient une sous-unité.
 c) Icosaèdre $T=3$, où $h = k = 1$. Chaque unité asymétrique contient trois sous-unités.
 La taille du virus est liée à la valeur de T .

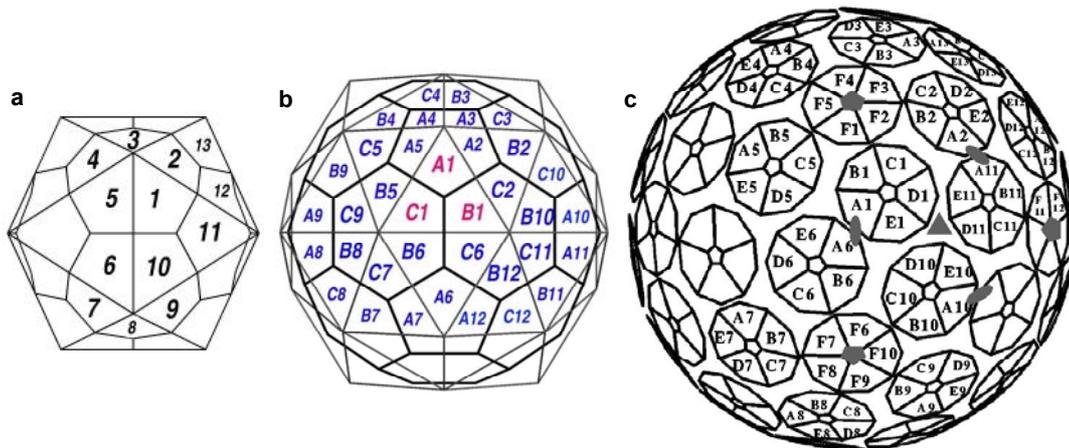


Figure I-3 : Exemples de capsides virales, d'après le site Virus Particle ExploreR (VIPER) (Reddy et coll., 2001) (<http://mmtsب.scripps.edu/viper/>). a) $T=1$ (Satellite Tobacco Mosaic Virus). b) $T=3$ (Cowpea Chlorotic Mosaic Virus). c) $T=7$ (Simian 40 Virus).

Les protéines ne peuvent prendre qu'un petit nombre de conformations distinctes, leur permettant de se lier à d'autres protéines ayant elles-mêmes une conformation particulière ; c'est ce que l'on appelle les « règles locales » (« local rules ») (Berger et coll., 1994). Dans la théorie de 1962, la quasi-équivalence était obtenue grâce à des déformations des sous-unités. En fait, dans la plupart des structures de capsides connues à ce jour, elle est due à l'existence de contacts différents entre diverses classes de sous-unités bien que la symétrie icosaédrique soit conservée (Klug, 1983). Dans le cas de certains virus icosaédriques, la théorie de Caspar et Klug ne s'applique pas exactement. Pour le SV40 ($T=7$), les hexamères prédits sont en fait des pentamères (Figure I-3 b) (Liddington et coll., 1991; Stehle et coll., 1996). On peut trouver également des différences d'orientation et des changements de conformation entre les sous-unités, qui sont alors « non-équivalentes », comme dans le cas des Polyomavirus. Enfin, l'assemblage de la capside nécessite parfois des protéines d'« échafaudage » qui s'assemblent temporairement avec les protéines de capside pour former une procapside, mais qui se détachent pour permettre la formation de la capside mature, comme dans le cas du phage P22 (travaux de J. King, cités dans Berger et coll., 1994).

Les premiers virus dont on ait déterminé la structure à haute résolution étaient des virus de plantes, tout d'abord le Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV), un virus $T=3$ (Harrison et coll., 1978), puis le Southern Bean Mosaic Virus (SBMV) $T=3$ également (Abad-Zapatero et coll., 1980), et le Satellite Tobacco Necrosis Virus (STNV), $T=1$ (Liljas et coll., 1982). L'étude des Picornavirus a ensuite connu une expansion dans les années 80. Dans les années 90, les structures de plus gros virus ont été résolues, comme le Simian Virus 40 (SV 40), d'un rayon de 250 Å, $T=7$ (Liddington et coll., 1991; Stehle et coll., 1996), et le Bluetongue Virus, d'un rayon de 350 Å, $T=13$ (Grimes et coll., 1997; Grimes et coll., 1998). Le Tableau I-1 regroupe les noms et codes PDB des virus icosaédriques dont la structure est connue au 28/05/04.

Tableau I-1 : Virus icosédriques dont la structure est connue au 28/05/04, d'après la Protein Data Bank (PDB) et le site VIPER (Reddy et coll., 2001). Le code PDB de chaque protéine est indiqué entre parenthèses.

	Virus de mammifères	Virus de plantes	Bacteriophages Insectes
T=1	Canine Parvovirus Empty (2cas) Feline Panleukopenia Virus (1fpv) Murine Minute Virus (1mvm) Porcine Parvovirus (1k3v) Reovirus Core (1ej6)	Alfalfa Mosaic Virus Satellite Panicum Mosaic Virus (1stm) Satellite Tobacco Mosaic Virus (1a34) Satellite Tobacco Necrosis Virus (2stv)	G4 (1gff) Φx174 (2bpa) Densovirus (1dnv)
(T=1) P=3	Bovine Enterovirus (1bev) Coxsackievirus B3 (1cov) Echovirus 1 (1ev1) Foot and Mouth Disease Virus (1bbt) Human Rhinovirus 1A (1r1a) Human Rhinovirus 2 (1fjn) Human Rhinovirus 3 (1rhi) Human Rhinovirus 14 (4rhv) Human Rhinovirus 16 (1aym) Mengo Encephalomyocarditis Virus (2mev) Poliovirus empty (1pov) Poliovirus 1 (2plv) Poliovirus 2 (1eah) Poliovirus 3 (1pvc) Theiler Mur. Encephalo-Myelitis Virus DA (1tme) Theiler Mur. Encephalo-Myelitis Virus BeAn (1tmf)	Bean Pod Mottle Virus (1bmvt) Cowpea Mosaic Virus (1cpmv) Red Clover Mottle Virus Tobacco Ringspot Virus (1a6c)	Cricket Paralysis Virus (1b35)
T=3	Norwalk Virus Capsid (1ihm)	Brome Mosaic Virus (1js9) Cowpea Chlorotic Mottle Virus (1cwp) Cucumber Mosaic Virus (1f15) Desmodium Yellow Mottle Virus (1ddl) Flock House Virus Physalis Mottle Virus(1qjz) Rice Yellow Mottle Virus(1f2n) Sesbania Mosaic Virus (1smv) Southern Bean Mosaic Virus (4sbv) Tobacco Necrosis Virus (1c8n) Tomato Bushy Stunt Virus (2tbv) Turnip Yellow Mosaic Virus (1auy)	FR (1frs) GA (1gav) MS2 (2ms2) PP7 (1dwn) Q Beta (1qbe) Black Beetle Virus (2bbv) Nodamura Virus (1nov) Pariacoto Virus(1f8v)
T=4	Human Hepatitis B Viral Capsid (1qgt)		Nudaurelia w Capensis Virus (1nvw)
T=7	Simian Virus 40 (1sva) Polyomavirus (1sid) Hong Kong 97 (1fh6)		
T=13	Bluetongue Virus (2btv)		

L'enveloppe lipidique

La plupart des virus de mammifères sont entourés d'une bicouche phospholipidique, qui provient du bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule hôte lors de la libération des virus dans le milieu extérieur. L'enveloppe peut être simple, ou complexe, si elle contient des glycoprotéines d'origine virale, servant à la reconnaissance spécifique de la cellule hôte et à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Dans le cas des virus de plantes, seuls les *Rhabdoviridae* et les *Bunyaviridae* possèdent une enveloppe lipoprotéique. L'existence

même de cette couche lipidique rend les virus enveloppés plus sensibles à la chaleur, à l'acidité et aux solvants.

2) Mécanismes d'infection et multiplication

Exception faite des virus de plantes, la première étape de l'infection virale est l'adsorption du virus à une cellule hôte. La reconnaissance se fait grâce à la fixation d'une protéine de la surface virale à un récepteur protéique de la cellule (Figure I-1). Certains virus comme le bactériophage T4 possèdent une gaine contractile qui leur permet d'injecter leur génome. Tous les virus enveloppés pénètrent dans le cytoplasme par fusion de membranes. Cet événement se produit par l'intermédiaire des glycoprotéines présentes à la surface des virus, et qui interagissent avec les récepteurs membranaires de la cellule hôte. Le récepteur peut avoir un rôle actif, en provoquant le changement de conformation de la glycoprotéine et conduisant ainsi à la fusion membranaire (HIV), entre la membrane du virus et la membrane plasmique cellulaire. Le récepteur peut également avoir un rôle passif de rétention du virus à la surface cellulaire (virus de la grippe), ce qui entraîne l'endocytose du virus. Dans ce deuxième cas, c'est le pH acide de l'endosome ainsi formé qui provoque le changement conformationnel des glycoprotéines virales, entraînant ensuite la fusion des membranes du virus et de l'endosome. Les virus nus pénètrent par translocation ou par endocytose. La capsidite des picornavirus (« très petits virus à ARN ») par exemple, présente à sa surface un sillon qui s'adapte sur un récepteur cellulaire.

Pour les virus qui se répliquent dans le cytoplasme, la dégradation de la capsidite protéique permet la libération du génome viral. Lorsque le génome est constitué d'ARN, il peut être soit directement traduit en protéines, soit transcrit en ARN messager, soit transcrit en ADN grâce à une transcriptase réverse virale. Si le génome est constitué d'ADN, celui-ci est transporté dans le noyau. Il peut être alors directement transcrit en ARN messager puis traduit en protéines virales, qui vont permettre la production et la réplication de nouvelles particules virales. Ces événements d'adsorption, pénétration, multiplication et libération constituent le cycle lytique de la réplication virale. Dans certains cas, l'ADN viral intègre un chromosome de l'hôte. L'ADN reste silencieux et se réplique au fil des générations jusqu'à une activation du cycle lytique par un changement des conditions physiologiques. Il s'agit alors d'un cycle lysogène, comme dans le cas des bactériophages tempérés (phage λ).

La reproduction du virus affaiblit la cellule infectée dont les fonctions ne sont plus assurées. La présence de milliers de nouveaux virions dans le cytoplasme provoque

l'éclatement de la cellule hôte. La lyse associée à certains virus pourrait être en fait due à la dégradation progressive de la membrane plasmique, suite au détournement métabolique provoqué par les virus. Le bourgeonnement des virus enveloppés hors de la cellule ne provoque pas obligatoirement la mort de celle-ci.

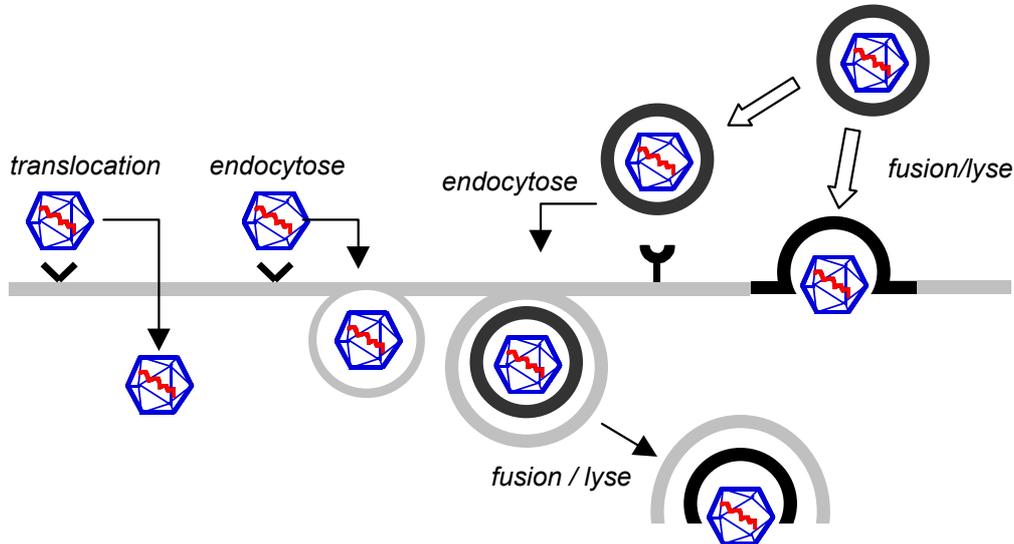


Figure I-1 : Les différents mécanismes d'entrée des virus dans la cellule hôte (d'après le site <http://membres.lycos.fr/neb5000/VirologieI>). La première étape est la reconnaissance d'un récepteur cellulaire, puis le virus pénètre dans la cellule par translocation ou par endocytose si le virus est nu. Si le virus est enveloppé, il pénètre par endocytose ou par fusion.

Les seuls virus à ne pas utiliser de récepteur cellulaire sont les virus de plantes. Leur mécanisme d'infection est expliqué dans le paragraphe suivant.

I-B. Particularités des virus de plantes

Il existe 1 200 espèces de virus de plantes, ou « phytovirus », répartis en une quarantaine de familles. Les maladies provoquées par les virus peuvent avoir de graves incidences économiques (pour l'industrie agroalimentaire, la production de tabac ou de plantes ornementales) mais également écologiques. Le seul moyen de lutter efficacement contre les maladies végétales est d'arracher ou de brûler les plantes, arbres, plantations infectées. Une grande partie de l'étude des virus de plantes a donc pour but de détecter et de caractériser les virus, essentiellement par sérologie, afin de trouver des gènes de résistance. Ce sont pourtant les études de plantes infectées qui ont permis d'identifier les virus, au sens premier du terme, vers la fin du dix-neuvième siècle, et l'étude des virus de plantes est à la base de toute la virologie actuelle. La détermination de la structure du TBSV, du SBMV et du STNV dès la fin

des années 70 et début des années 80 a permis de caractériser les virus icosaédriques (Harrison et coll., 1978; Abad-Zapatero et coll., 1980; Liljas et coll., 1982).

1) *Les différents types de virus de plantes*

Les phytovirus, de la même façon que les bactériophages et les virus animaux, sont répartis en plusieurs classes, selon la forme de leur capsid (en bâtonnet ou sphérique) et surtout selon la nature de leur génome, ADN ou ARN (Martelli, 1997).

Les *Geminiviridae* contiennent un ou deux brins d'ADN simple brin à polarité positive. Le génome est converti dans le noyau de la cellule hôte en ADN double-brin. D'autres phytovirus ont un génome ADN double-brin, comme les *Caulimoviridae*, et répliquent leur génome grâce à une transcriptase inverse. Les seuls phytovirus enveloppés (*Rhabdoviridae* et *Bunyaviridae*) ont un ARN à polarité négative. Leur capsid renferme, en plus du génome, une transcriptase, ou RNA polymérase ARN dépendante.

Les virus dont le génome est constitué d'ARN simple brin à polarité positive représentent 90% des phytovirus. Ils se distinguent entre eux par le nombre de molécules d'ARN constituant leur génome. Certains ont des génomes monopartites, c'est-à-dire que toute leur information génétique est portée par une seule molécule d'ARN. Le génome du TMV par exemple contient quatre phases ouvertes de lecture (ORF ou « open reading frame »). Dans le cas d'autres phytovirus, le génome viral est divisé en deux ou trois segments, porteurs d'informations génétiques différentes et répartis dans des capsides distinctes. Il s'agit alors de virus à génome bipartite (Cowpea Mosaic Virus) et tripartite (Virus de la Mosaïque du Brome). Les génomes sont constitués des gènes codant pour la capsid, les protéines de mouvement et la réplication du génome.

2) *Mode d'infection et de propagation*

Contrairement à la plupart des virus de mammifères, les virus de plantes (mis à part les *Rhabdoviridae* et les *Bunyaviridae*) sont nus. Cela peut s'expliquer par la présence d'une paroi rigide autour des cellules végétales, la paroi pectocellulosique, qui rend impossible tout phénomène d'endocytose, de fusion ou de bourgeonnement. Ainsi, les virus de plantes sont plus simples que beaucoup de virus de mammifères ou de bactéries. La transmission des phytovirus se fait par l'intermédiaire d'un agent mobile ou « vecteur », qui est nécessaire aussi bien pour traverser la paroi cellulosique des cellules végétales que pour passer d'une plante à

l'autre (transmission horizontale). Certaines zoospores de champignons affectant les racines de plantes peuvent servir de transporteurs de virus, mais les principaux vecteurs sont les insectes (pucerons (aphides), mouches blanches, cochenilles...) et les nématodes, qui acquièrent et transportent les virus, parfois pendant plusieurs semaines, en se nourrissant, et qui les retransmettent à de nouvelles plantes. La « transmission verticale » du virus, c'est-à-dire la transmission à la descendance, peut se faire par l'intermédiaire des boutures, des tubercules ou des graines, selon le type de virus. Les phytovirus sont également transmis lors de blessures infligées par les machines agricoles. Le mécanisme d'infection est schématisé dans la Figure I-1.

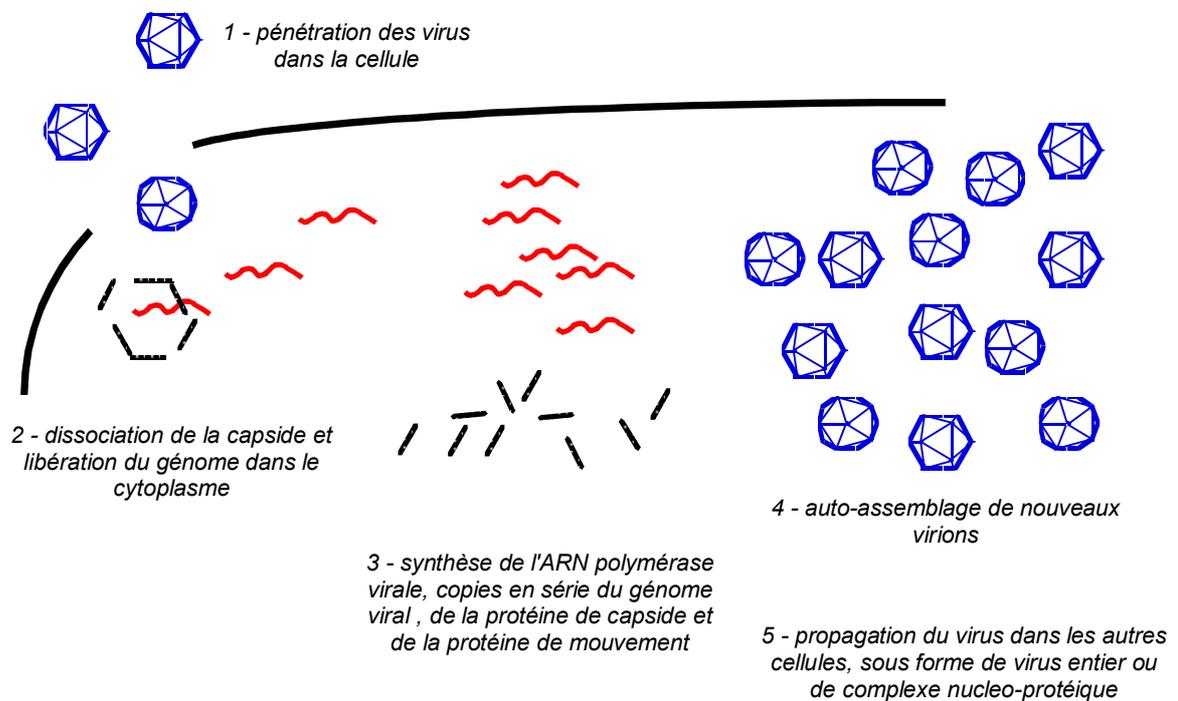


Figure I-1 Mécanisme d'infection des phytovirus. Les cellules végétales étant entourées d'une paroi pectocellulosique, les virus doivent profiter d'une écorchure de la plante pour pénétrer à l'intérieur des cellules.

Pour permettre la production de nouveaux virus, le génome doit être rendu accessible aux enzymes végétales de traduction ou de réplication. Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence (Shaw, 1996). Le premier est le couplage décapsidation/traduction, ou « désassemblage co-translationnel », comme dans le cas du TMV (Wilson, 1984; Wilson, 1985 ; Shaw, 1999), qui est provoqué par le détachement de quelques protéines de capsid qui permet de dégager l'extrémité 5' de l'acide nucléique composant le génome. Les ribosomes de

la cellule-hôte se fixent sur cette extrémité, et vont alors simultanément provoquer la dissociation de la capsid et commencer la traduction des protéines virales. Ainsi, le génome viral est continuellement protégé des attaques des nucléases présentes dans le cytoplasme. Ce mécanisme a également été observé dans le cas de certains phytovirus icosaédriques (Brisco et coll., 1986; Verduin, 1992; Wilson, 1984 ; Wilson, 1985). Pour le Cowpea Chlorotic Mottle Virus, le désassemblage co-traductionnel est amorcé par le gonflement de la capsid lors de l'entrée des virus dans la cellule. Ce mécanisme sera expliqué plus en détail dans le chapitre suivant. Dans le cas du Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV), la décapsidation débute par le départ de quelques protéines, ce qui forme un trou et permet la libération du génome dans le cytoplasme.

Les virus qui sont produits à l'intérieur d'une cellule végétale ne peuvent passer dans les cellules adjacentes par fusion ou endocytose comme dans le cas des virus animaux. Le transfert des virus se fait par l'intermédiaire des plasmodesmes, les canaux qui relient les cellules végétales entre elles. Il s'agit d'un déplacement de cellule à cellule de courte distance, qui nécessite l'intervention de protéines virales dites de mouvement. Les phytovirus peuvent se diviser en deux groupes selon leur mode de propagation (Figure I-2). Le premier groupe rassemble les virus dont les protéines de mouvement, associées à la protéine de capsid, forment une structure tubulaire dans le plasmodesme permettant le passage de virus alignés, comme pour le Cowpea Mosaic Virus (CPMV) (McLean et coll., 1993). Dans le deuxième groupe, c'est un complexe nucleoprotéique, moins encombrant que le virus entier, constitué du génome recouvert de quelques protéines de mouvement, qui passe dans les cellules voisines. Pour cela la protéine de mouvement augmente préalablement le volume d'exclusion du plasmodesme (Lucas, 1995). C'est le cas du virus hélicoïdal TMV (Citovsky, 1999).

Il faut de 30 minutes à une heure pour qu'un virus passe d'une cellule à une autre. L'infection systémique de la plante se fait lorsque les virus atteignent le phloème, tissu assurant la circulation de la sève, qui va permettre la distribution des nouveaux virus dans toute la plante. On parle de mouvement à longue distance. La vitesse de diffusion des virus est alors de quelques centimètres par heure.

Dans la nature, une infection virale ne peut être détectée que par l'apparition de symptômes externes. Ils consistent essentiellement en changements de couleurs (chlorose, jaunisse, mosaïque), nécroses, malformations, selon la localisation de leur multiplication au

sein de la plante... L'identification des virus incriminés peut se faire dans de nombreux cas par microscopie électronique, par des tests sérologiques, ou par l'analyse de leur acide nucléique.

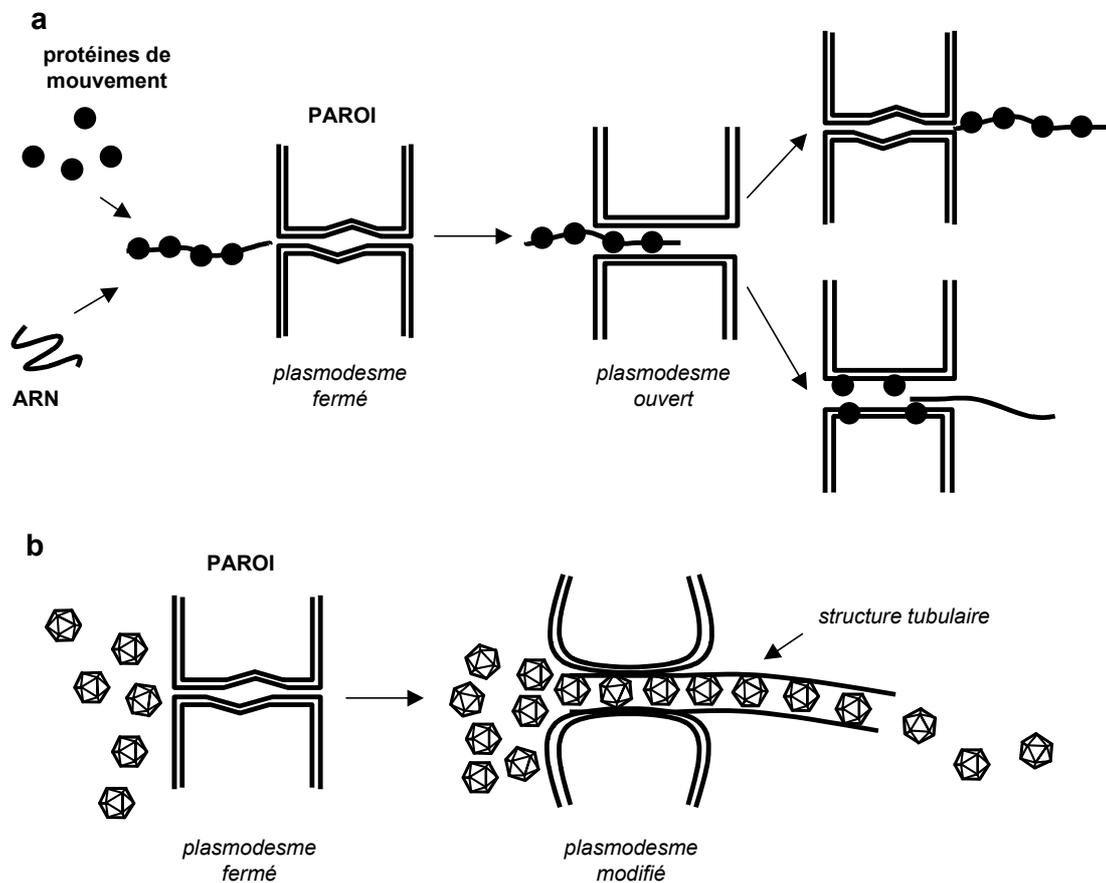


Figure I-2 : Les deux mécanismes qui permettent le mouvement cellule à cellule des virus de plantes (d'après McLean et coll., 1993). 1) Cas du TMV : Les protéines de mouvements provoquent une modification transitoire du plasmodesme, ce qui permet le transport de l'ARN couplé aux protéines, ou de l'ARN seul. 2) Cas du CPMV : Les protéines de mouvement forment un tubule à travers lequel les virions sont transportés dans la cellule voisine ; ce mécanisme provoque une déformation irréversible du plasmodesme.

Depuis les années 60, l'intérêt porté aux virus n'est plus seulement dû à des enjeux médicaux ou agronomiques. La simplicité des génomes viraux a permis la compréhension ou la découverte de mécanismes eucaryotes et procaryotes, tels que la réplication et la transcription de l'ADN (fragments d'Okasaki, ARN polymérase III...), la présence d'introns, la polyadénylation de l'ARN messager, le super-enroulement de l'ADN... On doit à l'étude des rétrovirus l'utilisation de la reverse transcriptase en biologie moléculaire, et les capsides virales sont utilisées pour le clonage de gènes et la thérapie génique.

Les virus de plantes sont facilement manipulables, car ils ne sont pas pathogènes pour d'autres espèces que les plantes, et sont également faciles à détruire. De plus, ils sont productibles en grande quantité.

Nous avons choisi d'étudier le Virus de la Mosaïque du Brome, car il avait déjà été utilisé par certains de nos collaborateurs, pour des études de diffusion des neutrons et de cinétique d'auto-assemblage de la capsidie notamment. Ce virus a un spectre d'hôte restreint, et peut être produit en moins d'un mois grâce à l'inoculation de simples pousses d'orge. C'est un virus qui est étudié depuis une cinquantaine d'années (voir pour revue Lane, 1974), aussi bien pour ses propriétés biochimiques que structurales. Dans le paragraphe suivant, nous nous efforçons de définir le plus précisément possible les caractéristiques du Virus de la Mosaïque du Brome.

I-C. Le Virus de la Mosaïque du Brome

Le Virus de la Mosaïque du Brome, ou BMV pour Brome(grass) Mosaic Virus, appartient à la famille des *Bromoviridae*, du genre *Bromovirus* qui contient cinq autres membres : le Broad Bean Mottle virus, le Cassia Yellow Blotch Virus, le Cowpea Chlorotic Mottle Virus, le Melandrium Yellow Fleck Virus, et le Spring Beauty Latent Virus.

La pathogénicité du BMV a été découverte dans les années soixante aux Etats-Unis. Le spectre d'hôte de ce virus inclut de nombreuses variétés de graminées et quelques dicotylédones comme le maïs, mais le BMV n'est pas considéré comme un agent pathogène sérieux. Il provoque ce que l'on appelle la « mosaïque du Brome », le Brome étant une plante utilisée en pâturage ou en gazon, dans des régions du monde aussi variées que l'Australie, les Etats-Unis, l'Europe de l'Est et l'Afrique du Sud. Le terme « mosaïque » provient de la nature des symptômes induits par ce virus, qui sont l'apparition de taches et de stries jaunes à la surface des plantes infectées (Figure I-1); en une trentaine de jours les plantes meurent par nécrose. Les virions sont localisés dans le cytoplasme, l'espace périnucléaire, et les chloroplastes (Lane, 1974).

Dans la nature, le BMV est transmis par des invertébrés de type nématode (*Xiphinema*). Il ne peut pas être transmis par des pucerons, mites ou autres insectes, et ne se retrouve pas dans les graines. L'infection mécanique en laboratoire peut se faire par l'inoculation de la sève.

Le BMV reste l'un des virus les plus étudiés, aussi bien du point de vue génomique que structural. Après avoir décrit le protocole de production du virus au laboratoire, nous ferons un historique des caractéristiques génomiques et protéiques du BMV. Nous décrirons ensuite la structure du virus à basse résolution.



Figure I-1 : Symptômes provoqués par le BMV. Ces symptômes sont l'apparition de stries et de taches jaunes.

1) Production et purification du BMV

Le protocole que nous avons employé pour produire le Virus de la Mosaïque du Brome a été mis au point à la fin des années 60 (Bancroft et coll., 1967) et amélioré par le Dr J. Witz (IBMC, Strasbourg). Le BMV est inoculé dans de jeunes plants d'orge de 8 ou 9 jours. Pour cela, chaque brin d'orge est frotté avec de la gaze imbibée d'une solution virale à 200 µg/ml de virus, contenant également une poudre abrasive, le carborundum (*AVOCADO®*). Le virus se multiplie dans les plants pendant une quinzaine de jours, période au bout de laquelle l'orge est coupée ras, et broyée au mixer dans une solution de stockage à 20 mM d'acétate de sodium (*Calbiochem®*), à pH 5,9. Le broyat est ensuite ajusté à pH 4,8 (Bockstahler et Kaesberg, 1962) et laissé pendant deux heures à 4°C pour induire la précipitation des protéines végétales. Une première centrifugation à basse vitesse (8 000 tours par minute, pendant 15 minutes)

permet d'éliminer la majorité des débris et protéines végétales, et le surnageant est ultra-centrifugé à 45 000 tours par minute pendant une heure et demie. Après dissolution du culot contenant le BMV et quelques débris dans la solution de stockage, à pH 5,9, une deuxième centrifugation à basse vitesse permet d'éliminer les dernières impuretés végétales. Le surnageant est ultra-centrifugé une nouvelle fois pour concentrer le virus. Enfin, le BMV est successivement filtré par des filtres de 0,8 et 0,22 μm (Millipore), et protégé des contaminations bactériennes par ajout de 0,1 ‰ d'azide de sodium. La concentration finale est déterminée par des mesures de densité optique à 260 nm, le coefficient d'extinction étant de 5,08 mg/ml/cm. Nous obtenons en moyenne 100 mg de virus pour 100 g de plantes infectées. Le virus peut ensuite être concentré dans des *Centricons*[®] (Millipore).

La pureté et l'intégrité des virus sont vérifiées par microscopie électronique (MET 201 Philips) en coloration négative (Figure I-1).

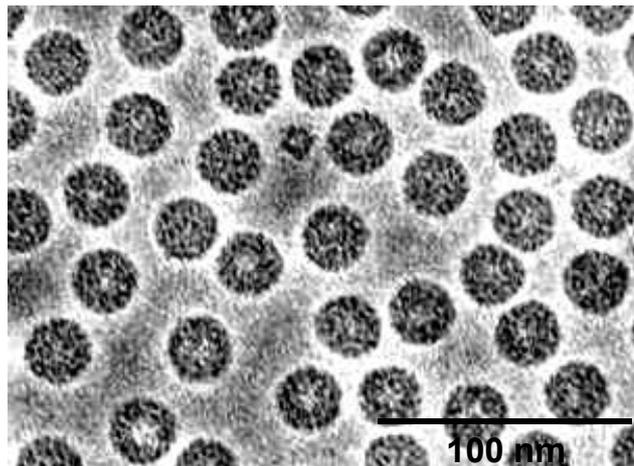


Figure I-1 Cliché de microscopie électronique du BMV. Coloration négative par l'acétate d'uranyle (1 %) d'un échantillon à 250 $\mu\text{g/ml}$ de BMV.

2) Propriétés du BMV

Le BMV est un virus icosaédrique T=3 (Finch et Bancroft, 1968), d'un diamètre d'environ 270 Å. Sa capsid, ou coque protéique, est composée de 180 protéines identiques ayant une masse de 20,3 kDa, et renferme un génome d'ARN simple brin d'environ 1 MDa. La masse totale d'une particule de BMV est de $4.6 \cdot 10^6$ Da. Les principales caractéristiques du BMV et de sa protéine de capsid sont reportées dans le Tableau I-1.

Virus de la Mosaïque du Brome (BMV)					
Famille : Bromoviridae, Genre : Bromovirus - Code décimal de l'ICTV : 10.0.3.0.003					
Masse moléculaire totale : 4,6 MDa					
Coefficient de sédimentation à pH acide : 87 S, à pH basique : 79 S					
Densité 1.35 g cm ⁻³ dans le CsCl (ICTV)					
Protéine de capsid :					
- Masse moléculaire : 20,4 kDa					
- Référence SWISS-PROT : P03602					
- Code PDB de la structure d'un trimère : 1js9 (3,4 Å de résolution)					
- Longueur de la séquence : 189 résidus					
- Séquence :					
MSTSGTGKMTAQRRAARRNRWTARVQPVIVEPLAAGQGKAIKAIAGYSISKWEASSDAITAKATNAMSITLPHELSSSEKNK ELKVGRLVLLWLGLLPSVAGRIKACVAEKQAQAEAAFQVALAVADSSKEVVAAMYTDAPFRGATLGDLLNLQIYLYASEAVPAKA VVVHLEVEHVRPTFDDFFTPVYR					
- Composition en acides aminés de la protéine de capsid :					
Ala (A)	33	17,46 %	Leu (L)	16	8,47 %
Arg (R)	12	6,35 %	Lys (K)	12	6,35 %
Asn (N)	4	2,12 %	Met (M)	4	2,12 %
Asp (D)	6	3,17 %	Phe (F)	5	2,65 %
Cys (C)	1	0,53 %	Pro (P)	7	3,70 %
Gln (Q)	7	3,70 %	Ser (S)	13	6,88 %
Glu (E)	11	5,82 %	Thr (T)	11	5,82 %
Gly (G)	10	5,29 %	Trp (W)	3	1,59 %
His (H)	3	1,59 %	Tyr (Y)	5	2,65 %
Ile (I)	8	4,23 %	Val (V)	18	9,52 %

Tableau I-1 : Caractéristiques du BMV. Taxonomie et caractérisation de la protéine de capsid.

Fonction des protéines codées par le génome du BMV

Dès les années 70, des expériences de centrifugation en gradient de densité ont révélé que le génome du BMV est tripartite (Figure I-1), car les virions se répartissent en trois groupes de densités différentes (Lane, 1974), difficiles à séparer expérimentalement. Les particules les plus lourdes et les plus légères contiennent chacune une molécule d'ARN, ARN1 et ARN2 respectivement, et les particules de densité intermédiaire contiennent deux molécules d'ARN, ARN3 et ARN4. Les trois types de virions sont nécessaires à l'infection.

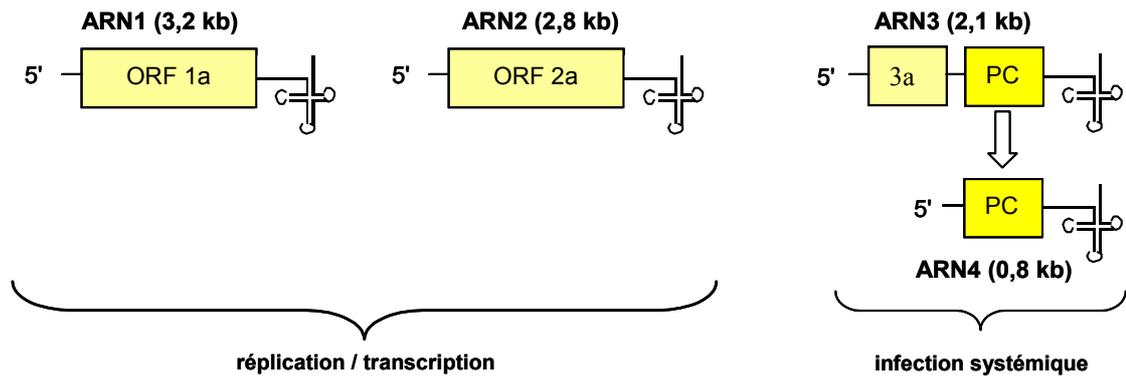


Figure I-1: Génome du Virus de la Mosaïque du Brome (d'après Ahlquist, 1992). Le génome du BMV est tripartite, et réparti dans 3 virions distincts. ARN4 provient de la transcription partielle d'ARN3. Ces deux fragments sont enfermés dans la même capside. Abréviations : ORF (« open reading frame », ou phase ouverte de lecture) ; PC : protéine de capside.

Le rôle des protéines 1a et 2a codées par ARN1 et ARN2 est de synthétiser un ARN complémentaire au génome, de polarité négative (Ahlquist, 1992). Cet ARN neo-synthétisé servira de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN génomiques positifs. La transcription débute en 3', grâce à l'existence d'une structure de type ARN de transfert servant d'origine de réplication (Figure I-1). Cette structure est également indispensable à la formation des capsides (Choi et coll., 2002). Le troisième fragment, ARN3, est porteur de deux ORF. La première, longue de 2,1 kbases, code pour une protéine de mouvement (32 KDa), responsable du mouvement « cellule à cellule » (« cell-to-cell movement »). La deuxième ORF (0,8 kbase) est un ARN subgénomique qui provient de la transcription partielle de l'ARN3 génomique. Ce fragment appelé ARN4 code pour la protéine de capside (20,3 kDa), qui est interchangeable *in vivo* avec celle du Cowpea Chlorotic Mottle Virus, un autre bromovirus très proche du BMV (Osman et coll., 1997).

Seul le fragment ARN3 n'est pas indispensable à la réplication du BMV.

La suite de ce paragraphe résume les propriétés d'assemblage et de dynamique structurale des capsides, dont la sensibilité aux conditions extérieures joue un rôle primordial dans la prolifération virale (voir pour revue Witz et Brown, 2001).

Auto-assemblage et stabilisation des capsides

In vitro, et en absence d'ARN, les capsides de BMV s'auto-assemblent à pH acide, sous leur structure T=3. La taille des capsides formées dépend de l'environnement physico-chimique

et de la vitesse de variation du pH. Le polymorphisme des capsides serait en fait relié à un polymorphisme des protéines de capsidite elles-mêmes, dépendant du milieu (Cuillel et coll., 1983).

Des expériences de diffusion des neutrons et des rayons X, et de diffusion quasi-élastique de la lumière, ont permis d'étudier les cinétiques d'assemblage de la coque protéique du BMV à partir des protéines en solution (Berthet-Colominas et coll., 1987). La construction *in vitro* de la capsidite s'effectue dans une durée de l'ordre de la seconde, grâce à l'association progressive d'unités d'assemblage. Ces expériences ont aussi montré que la conformation de la protéine à haut pH était appropriée pour l'assemblage de la capsidite ; la chute rapide du pH (« pH jump ») permet à la protéine de garder cette conformation, alors que la diminution progressive du pH par dialyse la modifie (Cuillel et coll., 1983).

Lorsque l'on utilise une solution contenant des protéines de capsidites et de l'ARN viral, on peut observer l'auto-assemblage de capsidites vides entre pH 5 et pH 6, alors que l'auto-assemblage de virions s'effectue à un pH supérieur à pH 6,5 (Pfeiffer et Hirth, 1974 ; Cuillel et coll., 1987). Enfin, la dissociation/réassociation de virus entiers est réversible à pH > 6,5, par augmentation puis diminution de la force ionique. Ces études de diffusion des neutrons laissent supposer un rôle initiateur de l'ARN pour la formation des capsidites, mettant en évidence la condensation de dimères de protéines autour de l'ARN, ce qui faciliterait ensuite les interactions entre sous-unités.

D'autres études penchent en faveur d'un motif protéique initiateur, auquel se fixerait ensuite l'ARN. Le Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) est le premier virus icosaédrique dont la réassociation *in vitro* de l'ARN et de la protéine de capsidite a produit des particules infectieuses (Bancroft et coll., 1967; Hiebert et coll., 1968). C'est aussi le premier Bromovirus dont la structure a été résolue (Speir et coll., 1995), à 3,2 Å de résolution, ce qui a permis d'établir un modèle de l'assemblage de sa capsidite. L'unité de base de l'assemblage reste un dimère non covalent. L'existence d'un tonneau β à 6 brins, très stable, formé par les extrémités N-terminales de 6 protéines, permet de supposer que les dimères forment entre eux un hexamère de dimères. L'addition à cet hexamère de l'ARN et d'autres dimères permettrait ensuite la formation de la capsidite complète. Dans ce modèle, la première étape d'assemblage de la capsidite est donc la formation d'un motif protéique particulier, suivi de la fixation de l'ARN.

La structure initiateur hexamérique est remise en cause par des études de diffusion de lumière et de chromatographie, qui ont montré que l'initiateur de l'assemblage de la capsidite du CCMV serait en fait un pentamère de dimères (Zlotnick et coll., 2000). Toutefois, les

expériences qui ont abouti à ce modèle ont été effectuées avec des capsides vides, contrairement aux expériences de cristallographie. Hexamères et pentamères de dimères sont représentés dans la Figure I-1.

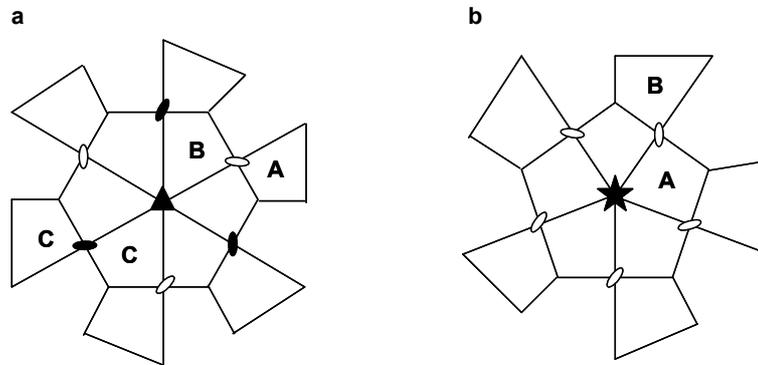


Figure I-1 : Intermédiaires d'assemblage de la capside. Les unités de base sont des dimères de protéines, C-C et A-B, qui sont reliées respectivement par un axe 2 (en noir) ou un pseudo-axe 2 (en blanc).

- Speir et coll. (1995) proposent que les dimères s'assemblent en hexamères de dimères. L'addition de l'ARN et d'autres dimères à cette structure permet l'assemblage des capsides.
- Pour Zlotnick et coll. (2000), les dimères s'assemblent en pentamères. L'addition de dimères à cette structure permet l'association de la capside T=3, tandis que l'association de pentamères conduit à des particules pseudo-T=2.

Dans les conditions physiologiques, les interactions ARN-protéines sont d'une importance extrême pour l'assemblage du BMV. Contrairement au Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV), dont la capside est stabilisée par de fortes interactions protéines-protéines, il ne se forme pas *in vivo* de capsides vides de BMV (Kaper, 1975). Toutefois, comme elles peuvent se former *in vitro* en l'absence d'ARN, on peut supposer qu'il existe dans les cellules infectées une collaboration précoce entre l'ARN et les protéines pour la formation des capsides dans les cellules hôtes (Cuillel et coll., 1987; Speir et coll., 1995), l'ARN protégeant les protéines de la dégradation.

Comme nous l'avons vu précédemment, à pH 5-6, les protéines virales s'auto-assemblent en capsides vides, même en présence d'ARN. Dès que le pH est supérieur à 6,5, ces capsides vides se dissocient, et on observe la formation de virions (Cuillel et coll., 1983). Les capsides sont donc stabilisées par l'ARN à un pH supérieur à 6,5.

Dans les virions, les interactions avec l'ARN protègent partiellement l'extrémité N-terminale de la digestion : la digestion de virions (ou virus entiers infectieux) par la trypsine provoque la suppression de 25 résidus de l'extrémité amino-terminale (N-terminale) de la

protéine de capsid. Dans le cas de protéines de capsid isolées, en l'absence d'ARN, la digestion par la trypsine supprime 63 résidus N-terminaux (Cuillel et coll., 1981), et la réassociation des protéines tronquées conduit à une structure $T = 1$. La nécessité de l'ARN et des extrémités N-terminales des protéines de capsid dans la formation de la structure $T=3$, moins stable qu'une structure à $T=1$, a ainsi pu être mise en évidence pour la première fois. Grâce à des expériences de conversion des interactions ARN-protéines en liaisons covalentes par l'APG (p-azidophenylglyoxal), il a été démontré que 80 résidus de la partie N-terminale des protéines de capsid sont impliqués dans la fixation de l'ARN (Sgro et coll., 1986).

Lorsque l'un des trois ARN génomiques est présent dans des cellules de levure, avec des protéines de capsid, les virions se forment normalement. En revanche, si seul l'ARN4 subgénomique codant pour la protéine de capsid est présent, les capsides ne sont plus composées que de 120 sous-unités, en fait 60 dimères arrangés avec un nombre de triangulation $T=1$ (Krol et coll., 1999). La taille et l'assemblage de la capsid sont donc reliés directement à l'ARN.

Dynamique structurale des capsides

In vitro, les capsides de plusieurs virus de plantes comme le CCMV (Bancroft et coll., 1967), le TBSV (Robinson et Harrison, 1982) ou le SBMV (Hsu et coll., 1976) gonflent dans un milieu à pH 7, avant de se désassembler. Ce phénomène a été mis en évidence pour la première fois avec le BMV, dont le coefficient de sédimentation passe de 87 S (pH 6), à 79 S (pH 7) (Incardona et Kaesberg, 1964). De plus, le génome et les protéines du BMV deviennent sensibles aux enzymes (trypsine, chymotrypsine et ribonucléases) à cette valeur de pH, et l'ARN devient accessible aux ribosomes (Brisco et coll., 1986).

Le gonflement de ces virus est lié au détachement d'ions calcium de sites spécifiques à la surface de la capsid virale (Durham et coll., 1977; Brisco et coll., 1985; Brisco et coll., 1986). Ces sites se situent au niveau des pseudo-axes 3, et sont composés de résidus chargés négativement, comme des résidus aspartate et glutamate (Speir et coll., 1995; Lucas et coll., 2002). Le détachement des ions Ca^{2+} dépendrait *in vivo* de la différence de concentration en calcium entre les cellules des vecteurs du virus (de 1 mM) et les cellules de plantes (1 μ M).

La variation du diamètre des particules virales en fonction du pH a pu être observée par des expériences de diffusion des neutrons (Jacrot et coll., 1977). A bas pH, le BMV a un

diamètre externe d'environ 270 Å. Le passage à pH basique provoque une augmentation de 10 % de sa taille, soit un diamètre d'environ 300 Å.

La structure de l'état gonflé du CCMV a été déterminée par cryomicroscopie (Speir et coll., 1995), à 28 Å de résolution, et a permis d'établir une théorie de la « dissociation co-traductionnelle » de la capsid e énoncée dans les années 80 (Wilson, 1985), c'est-à-dire que la particule virale se désassemble en même temps qu'a lieu la traduction de l'ARN en protéines. Le détachement des ions calcium des pseudo-axes 3 à pH 7 et la faible force ionique provoquent une répulsion entre les résidus chargés négativement du site de fixation calcique, et le gonflement de la capsid e. Le gonflement n'a pas lieu à plus faible valeur de pH, car parmi ces résidus, le glutamate 81 et l'aspartate 153 ont un pKa anormalement élevé, entre 7,2 et 8,5, et 5 et 6,8 respectivement, selon les chaînes (Bancroft, 1970; Tama et Brooks, 2002) (la valeur standard du pKa pour le glutamate et l'aspartate est de 4 environ). Cela est dû à la forte concentration locale des charges négatives, renforcée encore par la proximité des résidus phosphates de l'ARN, principalement localisé au niveau de cet axe. Le gonflement se traduit par la formation de pores de 20 Å de diamètre au niveau des pseudo axes 3, au travers desquels l'ARN est susceptible de s'échapper, devenant ainsi accessible aux enzymes de l'hôte. Les hexamères et les pentamères de protéines ne subissent pas de changement structural majeur, et se déplacent le long des axes 5 et 6 correspondants.

Le gonflement du CCMV, régulé au niveau des pseudo-axes 3, n'est apparemment pas indispensable à la prolifération virale. La mutation de la lysine 42, remplacée par une arginine, empêche le gonflement de la capsid e, mais les virus mutés sont presque aussi infectieux que les virus sauvages (Albert et coll., 1997). Le phénotype de ce mutant est l'absence de dissociation dans des conditions (pH 7,5 et 1M NaCl) où le virus sauvage se désassemble complètement en ARN et protéines. Si les pores formés au niveau des pseudo-axes 3 ne sont pas impliqués dans la libération de l'ARN, seuls les pentamères peuvent intervenir en subissant une modification structurale, car ils sont moins stables que les hexamères (Speir et coll., 1995). Albert et coll. proposent que les 5 extrémités N-terminales des pentamères, qui sont peu ordonnées par rapport à celles des hexamères, forment un pore pH-dépendant par lequel l'ARN peut passer. Toutefois, les études de Speir et coll. ont montré que le résidu 42 était impliqué dans la fixation de l'ARN. On ne peut donc pas savoir si la mutation protéique provoque une modification du mécanisme de répl ication de l'ARN, ou juste une stabilité plus importante de la capsid e au niveau des pseudo-axes 3.

3) Structure du BMV à basse résolution

La microscopie électronique a permis dès les années 1930 de déterminer la taille et la forme des particules virales, et également de distinguer le relief du virus (Figure I-1). La reconstruction du CCMV par Steven et coll. (Steven et coll., 1978) à partir de clichés de cristaux 2D obtenus par coloration négative a permis d'obtenir un modèle à 25 Å de résolution. Ce modèle mettait en évidence les 12 pentamères et 20 hexamères protéiques (capsomères) caractéristiques d'une symétrie $T = 3$. Toutefois, aucune information n'était donnée sur la structure interne des virus, notamment sur l'organisation de l'ARN, qui représente environ 20 % de la masse totale du BMV.

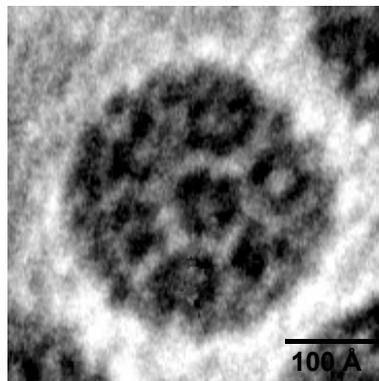


Figure I-1 : Capsomères du BMV. Coloration négative à l'acétate d'uranyle (1 %).

La structure du Virus de la Mosaïque du Brome a pu être déterminée à basse résolution par des études de diffusion des neutrons aux petits angles (Jacrot et coll., 1977; Zulauf et coll., 1983; Chauvin et coll., 1978), grâce à la méthode de variation de contraste schématisée dans la Figure I-2. La valeur des rayons de giration obtenus a d'abord permis de confirmer la présence d'un « trou central » ou lumen (Jacrot et coll., 1977), déjà observé par diffusion des rayons X (Anderegg et coll., 1963). Ensuite, l'utilisation d'eau lourde à des concentrations variables en deutérium, a permis d'obtenir la structure globale du virus.

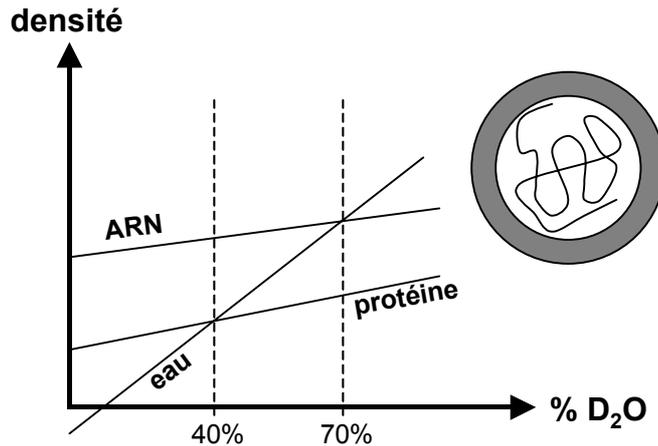


Figure I-2 : Principe de la méthode de variation de contraste. Les neutrons interagissent avec les noyaux des particules. La méthode de variation de contraste repose sur la contribution de la densité du solvant deutéré à la diffusion. Dans 40 % de D_2O , la diffusion de la protéine est la même que celle du solvant et le signal observé provient de l'ARN. Dans 70 % de D_2O , seule la protéine est observée. (d'après Jacrot, 1980)

Dans 40% d'eau deutérée (D_2O), le pouvoir diffusant des protéines est le même que celle du solvant, et le signal mesuré, provenant de l'ARN situé dans la capsid, correspond à celui d'une sphère plus petite que la capsid virale. Dans 70% de D_2O , le contraste provenant de l'ARN disparaît et seule la protéine est observée. Ces signaux, ainsi que ceux correspondant à d'autres variations de la concentration en deutérium (55, 100%), ont été comparés à différents modèles théoriques de diffusion correspondant à des sphères divisées en un nombre variable de couches. Cinq couches distinctes ont ainsi pu être mises en évidence. La première, d'une épaisseur de 32 Å, correspond aux protéines de capsid uniquement. La seconde, de 6 Å, correspond à un mélange de protéines et de solvant. La troisième couche est constituée de 10 % de protéines combinées à 90 % d'ARN. Les deux dernières ne sont constituées que d'ARN, de densité décroissante. Le lumen a un rayon de 25 Å.

La capsid du BMV peut être considérée comme une sphère d'un rayon de 133 Å à bas pH, et de 152 Å à haut pH (Figure I-3). La capsid a une épaisseur de 30 Å, constituée de la partie globulaire compacte des protéines de capsid. Ces protéines ont un bras flexible d'environ 20-25 Å de longueur, qui permet l'interpénétration protéines-ARN. A bas pH, cette interpénétration est faible, et elle augmente avec le pH.

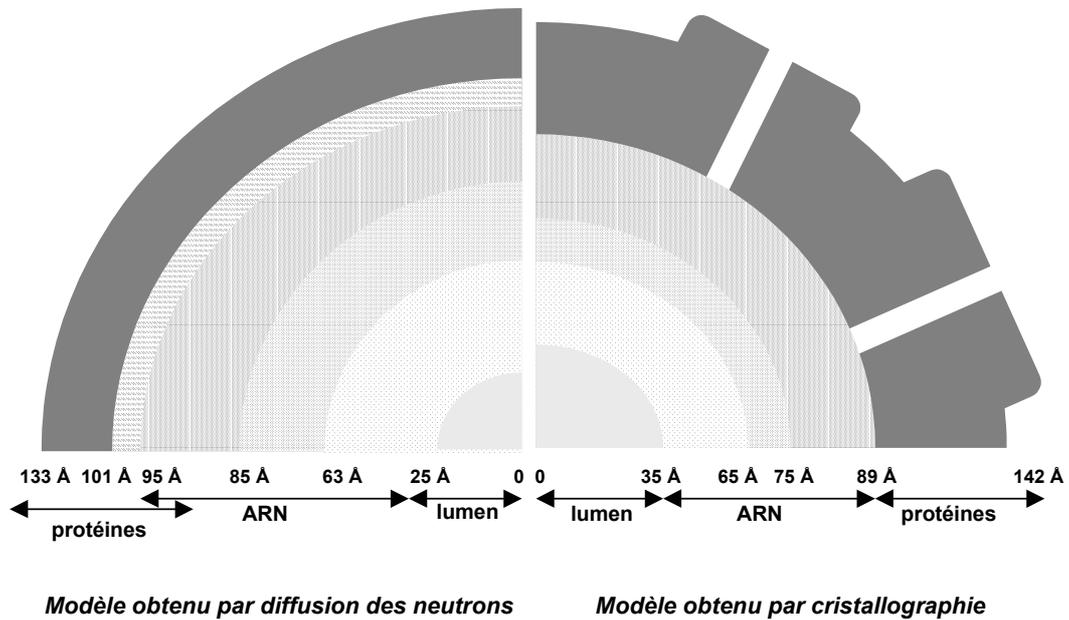


Figure I-3 : Structure du Virus de la Mosaïque du Brome d'après des études de diffusion aux neutrons (Zulauf et coll., 1983) et de cristallographie (Lucas et coll., 2002). L'ARN qui s'organise en couches de densités croissantes à partir du centre du virus, après le lumen, est protégé par la capsid protéique. Dans le modèle obtenu par diffusion des neutrons, l'ARN et les protéines de capsid s'interpénètrent, ce qui n'est pas le cas dans le modèle cristallographique.

II- STRUCTURE DU BMV A HAUTE RESOLUTION

La protéine de capsid du BMV présente 70% d'identité de séquence avec celle du CCMV, qui est le premier Bromovirus dont la structure ait été déterminée, à 3,2 Å de résolution (Speir et coll., 1995). L'homologie de séquence pouvait servir de base à la détermination d'un modèle du BMV, et la structure cristallographique du CCMV pouvait bien entendu faciliter une résolution de la structure cristallographique du BMV par remplacement moléculaire. L'étape limitante restait la cristallisation du BMV. Comme nous le verrons dans le Chapitre V, nous avons pu cristalliser le BMV, dans plusieurs conditions, mais nous n'avons pas pu exploiter nos cristaux. La structure du BMV à 3,4 Å de résolution est parue en mars 2002, dans un article de l'équipe de Mac Pherson (Lucas et coll., 2002), et a pour référence PDB 1js9. Nous allons d'abord décrire en détail la structure cristallographique du BMV, puis nous la comparerons au modèle que nous avons établi grâce à la modélisation par homologie de séquence. Enfin, nous présenterons les modèles du BMV sous sa forme compacte et sous sa forme gonflée obtenus grâce à la cryomicroscopie électronique.

II-A. Structure atomique du BMV, déterminée par Lucas et coll. (2002)

Le BMV et le CCMV sont des virus icosaédriques, d'un nombre de triangulation $T=3$, ce qui signifie que leur capsid est constituée de 180 protéines identiques qui s'auto-assemblent dans des conformations quasi-équivalentes.

La forte homologie de séquences existant entre les protéines de capsid du BMV et du CCMV leur confère des structures très semblables. Les caractéristiques structurales présentées ici correspondent donc pour la plupart aux deux virus. Les quelques différences observées entre les deux capsides seront également discutées ici.

Nous avons utilisé le logiciel InsightII© (Accelrys Inc.) pour visualiser les caractéristiques de la capsid du BMV présentées dans ce paragraphe.

1) Organisation de la capsid

Les études cristallographiques ont permis de retrouver les différentes couches de densité déjà définies par les études de diffusion des neutrons détaillées précédemment, avec toutefois quelques différences, notamment au niveau de l'organisation de l'ARN (Figure I-16). Le rayon interne de la coque protéique est de 89 Å, et son rayon externe de 142 Å (en tenant compte de l'épaisseur des capsomères). Le lumen a un rayon de 35 Å. Lucas et coll. ont pu distinguer trois couches de densités différentes à l'intérieur de la capsid correspondant à l'ARN, qui, ne possédant pas de symétrie icosaédrique propre, ne peuvent être observées qu'à travers des variations de densité. La première couche et la deuxième couche, de densités moyennes, s'étendent de 35 à 65 Å et de 65 à 75 Å à partir du centre du virus. La troisième, de 75 Å jusqu'à la face interne de la capsid, est beaucoup plus dense. Contrairement aux résultats obtenus par cristallographie sur le CCMV, et à ceux obtenus pour le BMV par diffusion des neutrons, aucune interpénétration de l'ARN à l'intérieur de la couche protéique n'a été observée. Il n'est pas exclu que l'utilisation de magnésium (0,1 M d'acétate de magnésium) dans les conditions de cristallisation ait provoqué une compaction de l'ARN et une diminution de l'interpénétration ARN-protéines, phénomène déjà observé, à plus faible concentration en magnésium, par des études de diffusion des neutrons (Chauvin et coll., 1978). Les ions Mg^{2+} sont connus pour favoriser et stabiliser le repliement de l'ARN en écrantant les résidus phosphates (Lindahl et coll., 1966).

Il existe à la surface des capsides des protubérances ou « capsomères », qui sont en fait des pentamères et des hexamères de protéines (Figure II-1 a et b). Ces motifs correspondent à l'assemblage quasi-équivalent des protéines de capsid autour des axes de symétrie icosaédrique. Les protéines qui s'assemblent en pentamères autour des axes d'ordre 5 sont appelées protéines A. Les protéines s'arrangeant en hexamères alternativement autour des axes d'ordre 3, sont appelées B et C (Harrison et coll., 1978) (Figure II-2). L'axe d'ordre 3 devient un pseudo axe 6, les protéines B et C ayant des structures très proches.

Les sous-unités B et C de deux capsomères adjacents sont reliées entre elles par les axes 2 icosaédriques, et les sous-unités A et B ou A et C de capsomères voisins sont reliées entre elles par des pseudo-axes 2, comme indiqué sur la Figure II-1 b. A, B et C sont reliées entre elles par un pseudo-axe 3. Les hexamères forment des pores de 6 Å de diamètre, et les pentamères des pores de 5 Å de diamètre.

Les études de diffraction effectuées sur des cristaux de BMV par Lucas et coll. (2002) ont permis de déterminer la structure de la protéine A des résidus 41 à 189, de la protéine B des résidus 25 à 189, et de la protéine C en entier, bien que les 25 premiers résidus soit désordonnés.

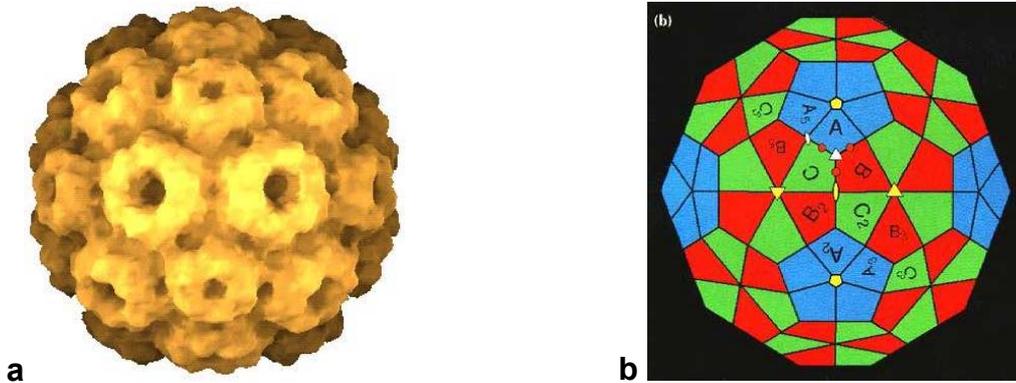


Figure II-1 : Structure de la capside du BMV et du CCMV.

- a) Capsomères du BMV (reconstruction tirée du site VIPER (Reddy et coll., 2001))
 b) Les protéines formant les pentamères autour des axes 5 icosaédriques sont appelées sous-unités A, les protéines formant les hexamères autour des axes 3 sont appelées B et C (Illustration tirée de Speir et coll., 1995). Les axes de symétrie icosaédriques sont représentés en jaune. Les pseudo axes 2 et 3 sont représentés en blanc.

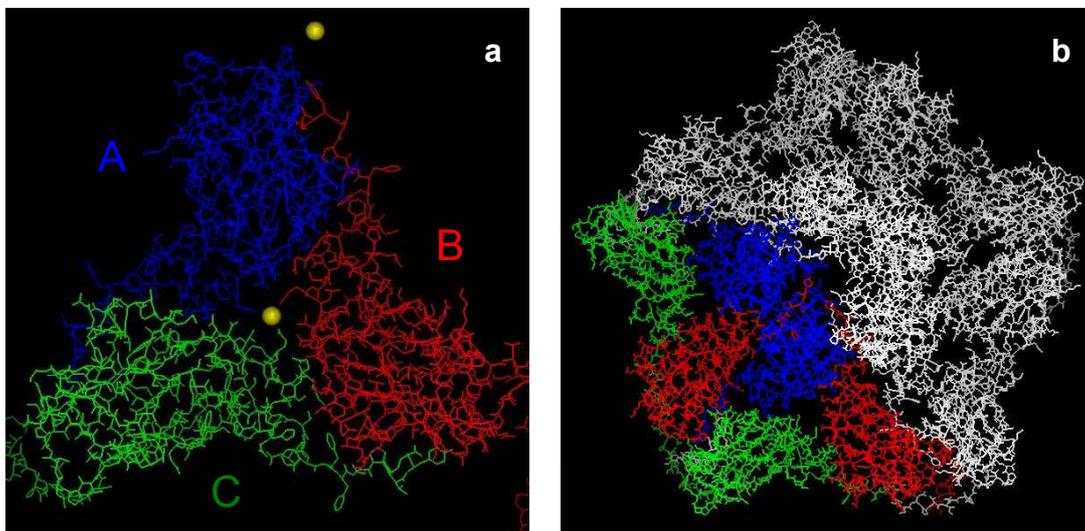


Figure II-2 : Structures atomiques

- a) Trimère ABC du BMV modélisé à partir des coordonnées du fichier PDB 1js9. Les cations divalents (ici des ions Mg^{2+}) sont représentés en jaune.
 b) 15-mère centré sur un pentamère.

Les protéines qui constituent la capsidite du BMV et du CCMV présentent la structure canonique d'un tonneau bêta en « gâteau roulé » (« jelly roll β barrel ») des virus icosaédriques (8 brins anti-parallèles). Ce motif est représenté dans la Figure II-3.



Figure II-3 : Structure canonique en tonneau β gâteau roulé des protéines de capsidite de virus icosaédriques. Le tonneau est constitué de 8 brins anti-parallèles. Les extrémités N et C-terminales des protéines s'étendent de part et d'autre du tonneau β , et participent à la stabilisation de la capsidite, par des interactions protéine-protéine et ARN-protéine.

2) Stabilisation de la capsidite

La stabilité de la capsidite est assurée par quatre types d'interactions.

Tout d'abord, les capsomères (hexamères et pentamères) apparaissent reliés entre eux au niveau de dimères non-covalents, par l'intermédiaire des extrémités C-terminales des protéines de capsidite, qui sont tangentes à la surface du virus. L'extrémité C-terminale d'une protéine appartenant à un capsomère passe à travers l'axe 2 ou le pseudo axe 2 le reliant à la protéine d'un capsomère voisin, et « envahit » celle-ci (Figure II-1). L'interpénétration est réciproque entre les deux protéines. Cet arrangement laisse supposer que ce sont ces dimères qui sont à l'origine de l'assemblage de la capsidite. De plus, en solution, la capsidite se dissocie en dimères (Pfeiffer et Hirth, 1974; Cuillel et coll., 1983). Pour les deux virus, les 10 derniers résidus C-terminaux sont maintenus par les résidus 36 à 52 des extrémités N-terminales.

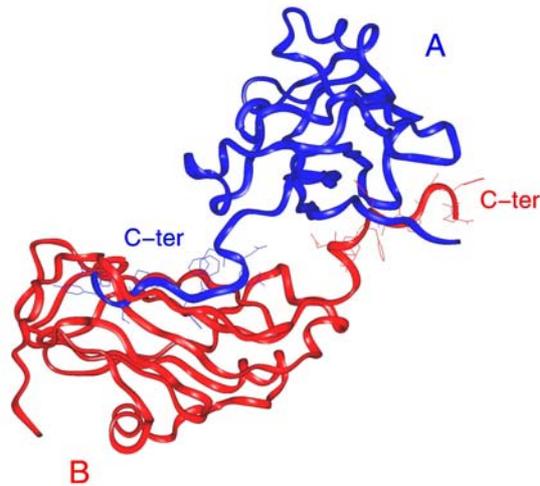


Figure II-1 : Dimère de protéines. Les dimères, non-covalents, sont l'espèce majoritaire obtenue après désassemblage de la capside. Leur stabilisation est assurée par l'interpénétration réciproque des extrémités C-terminales des deux protéines. Ces dimères sont les unités d'assemblage de la capside.

Ensuite, les extrémités N-terminales des six sous-unités B et C au niveau des pseudo-axes 6 s'arrangent en un tube composé de 6 feuillettes parallèles (« hexamère bêta »), composés des résidus 29 à 33 de chaque sous-unité, ce qui permet la mise en place et la stabilisation des hexamères (Figure II-2). C'est grâce à cet hexamère de brins bêta que les hexamères protéiques ne subissent pas de changement structural lors du gonflement du virus. Il n'existe pas de structure équivalente au niveau des axes 5.



Figure II-2 : Hexamère β formé par les extrémités N-terminales des sous-unités B et C. Les extrémités N-terminales des sous-unités B et C s'arrangent alternativement autour des axes 3, pour former un pseudo-axe 6, forment un hexamère β qui stabilise l'hexamère de protéines.

Comme le montre le Tableau II-1, les interactions protéine-protéine les plus fortes sont localisées au niveau des axes et pseudo-axes 2, grâce aux extrémités C-terminales des dimères, ce qui confirme le statut d'unité d'assemblage de ces dimères. Les surfaces enfouies sont également importantes au niveau des axes 3, grâce à la formation de l'hexamère β . Les

pentamères, comme nous l'avons déjà vu, sont plus faiblement stabilisés que les hexamères. Enfin, les interactions protéiques les plus faibles apparaissent au niveau des pseudo axes 3. Cet axe est impliqué dans le gonflement de la capsid. L'une des propriétés intrinsèques des capsides virales étant de pouvoir se désassembler rapidement, la présence d'ions divalents stabilise les pseudo-axes 3 et la capsid à pH acide, et leur départ et les faibles interactions protéiques au niveau de cet axe permet le gonflement.

	BMV	CCMV
dimères : axes 2	1589	1356
dimères : pseudo axes 2	1244-1270	1267-1290
trimères : pseudo axes 3	419-586	365-487
hexamères : axes 3 (pseudo 6)	899-1036	892-956
pentamères : axes 5	502-503	430-462

Tableau II-1 : Enfouissement des sous-unités à chaque interface, en Å² (d'après Lucas et coll., 2002). Les surfaces rendent compte des interactions entre protéines. Au niveau des pseudo-axes 3 et des axes 5, les surfaces enfouies sont deux à trois fois moins importantes qu'au niveau des axes 3 et des axes et pseudo axes 2. Les valeurs trouvées pour le CCMV sont globalement moins importantes que pour le BMV.

De l'intérieur, les interactions entre l'ARN chargé négativement et les extrémités N-terminales chargées positivement des protéines de capsid étaient déjà connues pour leur rôle initiateur et stabilisateur de la capsid. Dans le cas du CCMV, des fragments d'ARN ont pu être modélisés au niveau des pseudo axes 3 (Figure II-3 et Figure II-4), ce qui signifie qu'à cet endroit l'ARN est structuré grâce aux interactions avec les résidus protéiques. En plus d'autres résidus désordonnés, 13 résidus spécifiques sont impliqués dans la fixation de l'ARN. Ce sont : Glu 34, Lys 42, Lys 45, Thr 48, Lys 87, Arg 90, Arg 179, Asp 184, et particulièrement 5 résidus : Trp 47, Arg 82, Glu 140, Lys 143 et Tyr 181 (Speir et coll., 1995). Pour le BMV en revanche, l'absence de toute densité électronique correspondant à l'ARN empêche de savoir si les interactions ARN-protéines sont aussi spécifiques. Pourtant, dans la structure obtenue pour le BMV, tous les résidus composant la chaîne C du BMV ont pu être observés même légèrement désordonnés, alors que les extrémités N-terminales de A et B ne sont pas visibles. Les interactions de l'ARN avec la chaîne C sont peut-être plus spécifiques que pour les deux autres chaînes. La diffraction des neutrons à 16 Å de résolution par un cristal de TBSV (Timmins et coll., 1994), a montré que pour ce virus également la sous-unité C est plus impliquée que les autres sous-unités dans la fixation de l'ARN et l'assemblage de la capsid.

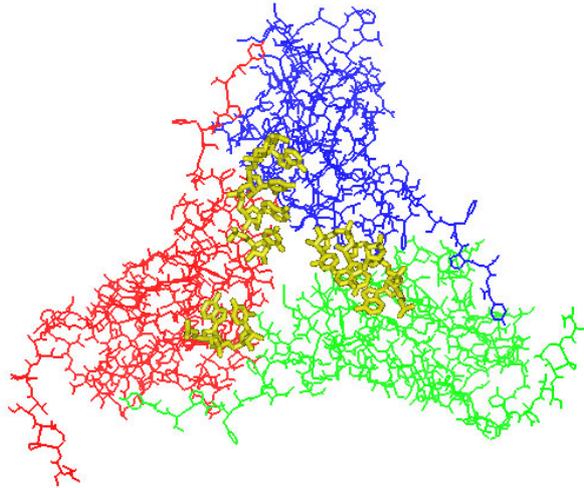


Figure II-3 : Représentation de fragments d'ARN au niveau du pseudo-axe 3 d'un trimère ABC du CCMV. La densité électronique correspondant à de l'ARN simple-brin (en jaune) a été modélisée arbitrairement en purine ou pyrimidine (Speir et coll., 1995). Aucune trace d'ARN n'a été observée pour le BMV.

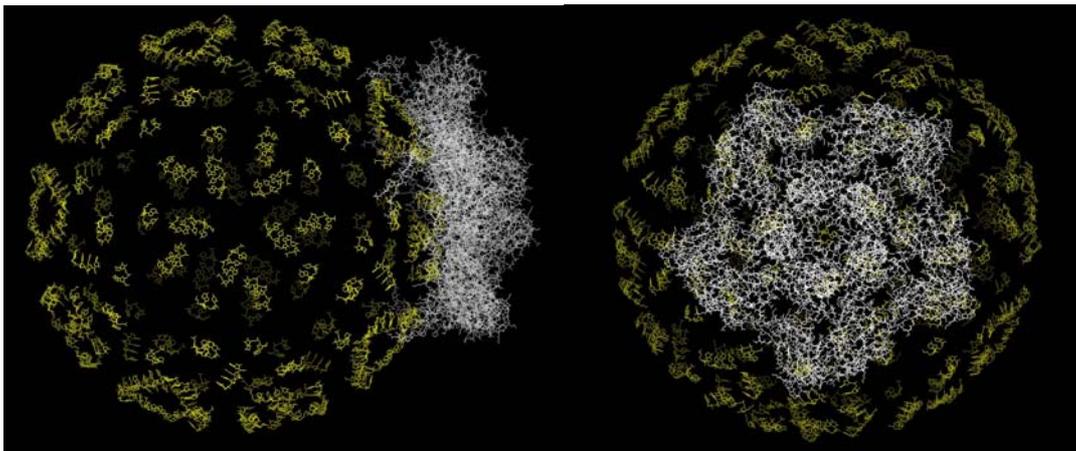


Figure II-4 : Représentation des fragments d'ARN dans le modèle du CCMV. L'ARN est nécessaire à l'auto-assemblage de la capsid, et tapisse son intérieur. Les deux images sont centrées sur un axe 5.

En surface, la capsid est stabilisée par la fixation d'ions divalents au niveau des pseudo-axes 3, grâce à des amas de résidus protéiques chargés négativement. Dans le cas du CCMV, les sites de fixation du calcium ont été seulement prédits, car les expériences de cristallisation ont été réalisées en présence d'un agent chélatant des ions divalents, l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), à pH 3,3. Les ions Ca^{2+} ont été modélisés aux interfaces des sous-unités A-B, B-C et C-A, fixés par les résidus Glu81, Gln85, et Glu148 de

la première protéine et les résidus Glu149 et Asp153 de la seconde. Il y aurait donc trois ions Ca^{2+} par trimère.

Lucas et coll. ont obtenu les cristaux de BMV en présence d'ions magnésium, qui ont les mêmes propriétés que les ions calcium pour la stabilisation de la capsid (Bancroft et coll., 1968). Ils ont utilisé 80 mM d'acétate de magnésium dans le tampon d'extraction du virus, et 0,1 M du même sel pour la cristallisation du virus. La présence d'ions Mg^{2+} a été localisée au niveau des pseudo-axes 3 ainsi qu'au niveau des axes 5 où ils bloquent le pore (Figure II-2 a). Les sites de fixation au niveau des pseudo-axes 3 sont composés des résidus Glu84, Thr145 et Asp148 de chacune des protéines A, B, et C (Figure II-5).

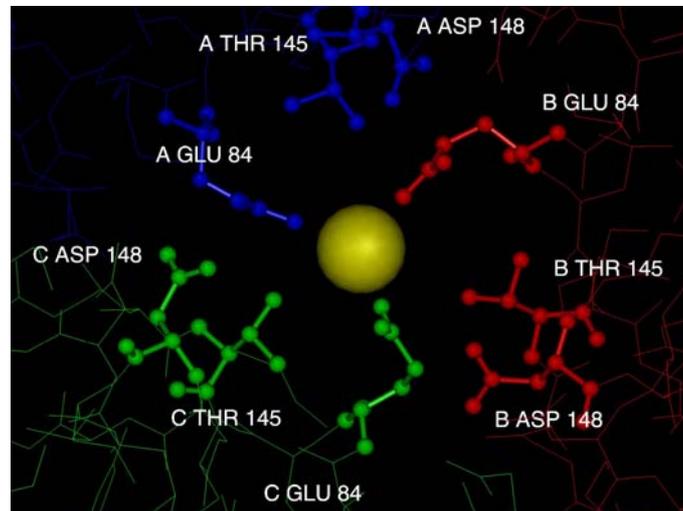


Figure II-5 : Site de fixation de l'ion Mg^{2+} au niveau d'un pseudo axe 3 de la capsid du BMV. Les ions divalents stabilisent la capsid à pH acide et leur détachement provoque le désassemblage de la capsid à pH basique.

Une des grandes différences entre les structures du BMV et du CCMV réside au niveau des interfaces entre sous-unités. Les interactions entre les protéines de capsid du BMV semblent plus importantes d'après le calcul de l'enfouissement des surfaces (Tableau II-1). Ce résultat et l'absence apparente d'interpénétration ARN-protéines a permis à Lucas et coll. d'ébaucher un nouveau mécanisme de formation des capsides : l'ARN se replierait d'abord indépendamment sous forme globulaire, et la capsid se formerait ensuite autour du génome par des interactions non spécifiques entre les résidus phosphates et les extrémités N-terminales. Les protéines se fixeraient d'abord de façon aléatoire à l'ARN, puis s'organiseraient par l'intermédiaire d'interactions spécifiques entre elles. Les 4 fragments

d'ARN composant le génome du BMV ayant des séquences trop dissemblables pour avoir des structures similaires, il ne peut exister d'interactions spécifiques avec les résidus protéiques. Les auteurs justifient donc ce mécanisme d'une part par l'absence d'interpénétration de l'ARN dans la capsid, et d'autre part par l'absence de capsides vides *in vivo*.

Ce nouveau modèle n'a toutefois pas été totalement validé. Lucas et coll. ne démontrent aucunement, par l'expérience ou les références bibliographiques, la possibilité d'une forme globulaire de l'ARN. De plus, ce nouveau modèle contredit plusieurs résultats ultérieurs concernant directement le BMV : la nécessité d'un assemblage « lâche » des protéines autour de l'ARN, puis leur redistribution grâce à des interactions spécifiques protéine-protéine, semble contraire à la capacité d'auto-assemblage *in vitro* des protéines en capsid à partir de dimères, l'espèce dominante obtenue après la dissociation de virions. En ce qui concerne le rôle initiateur de l'ARN, ce modèle rejoint toutefois l'hypothèse de Cuillel et coll. (1987) quant à la fixation initiatrice des protéines, mais sous forme de dimères, à l'ARN.

Les auteurs n'expliquent pas non plus comment l'interpénétration de l'ARN et de la capsid a pu être observée, pour le BMV, par diffusion des neutrons, dans plusieurs séries d'expériences (Zulauf et coll., 1983; Jacrot et coll., 1977). De plus, le génome du CCMV est lui aussi tripartite. Les interactions entre les résidus protéiques et l'ARN de ce virus ne devraient pas être plus spécifiques ou moins spécifiques que dans le cas du BMV. Speir et coll. ont pu distinguer par diffraction des rayons X des fragments d'ARN, au niveau des pseudo-axes 3. Sur les 13 résidus protéiques ordonnées impliqués dans la fixation de l'ARN, 8 sont parfaitement conservés entre les deux virus. Trois résidus chargés sont remplacés par des résidus similaires : Glu140 est remplacé par un résidu aspartate, Arg par une lysine, et Lys143 par une arginine. Deux sont totalement différents : le Try47 est remplacé une isoleucine, et Thr 48 par une alanine. L'absence d'ARN dans le modèle de Lucas et coll. serait plutôt dû à un manque de résolution, ou à un effet compactant des ions Mg^{2+} .

Enfin, les cristaux de CCMV ont été obtenus en présence d'agent chélatant. La capsid peut avoir été légèrement déstabilisée par l'absence d'ions divalents, ce qui expliquerait la différence qui existe entre les deux virus au niveau de l'enfouissement des surfaces entre les sous-unités.

II-B. Modélisation par homologie de séquences : principe et résultats

Grâce à la forte identité de séquences existant entre la protéine de capsid du BMV et celle du CCMV, nous avons pu établir un modèle du trimère ABC du BMV avant la détermination de sa structure atomique en mars 2002 par Lucas et coll., 2002 (code PDB 1js9).

1) Principe

La modélisation par homologie de séquences permet de prédire la structure tridimensionnelle d'une protéine dont seule la séquence est connue, en utilisant les coordonnées atomiques de protéines de séquences homologues pour lesquelles une structure a été déterminée expérimentalement.

Les structures atomiques peuvent être comparées entre elles grâce au calcul de l'écart quadratique moyen RMSD (pour « root mean square deviation ») entre atomes occupant des positions équivalentes dans deux structures différentes. Cet écart est calculé de la façon suivante:

$$RMSD = \sqrt{\left(\frac{1}{N} \sum_i [(x_i - x'_i)^2 + (y_i - y'_i)^2 + (z_i - z'_i)^2]\right)}$$

où N est le nombre de positions équivalentes dans chacune des structures comparées, (x_i, y_i, z_i) représentent les coordonnées cartésiennes de l'atome i (souvent le carbone α) de la première structure et (x'_i, y'_i, z'_i) celles de l'atome i lui correspondant dans la deuxième. Il existe une relation empirique entre RMSD et identité de séquence. Des séquences présentant de fortes similitudes ont des structures équivalentes d'un point de vue topologique.

Chothia et Lesk (Chothia et Lesk, 1986) ont démontré qu'un seuil de 25-30 % d'identité entre la séquence à modéliser et son support était nécessaire (Figure II-1), ce qui correspond à un RMSD de 2 Å.

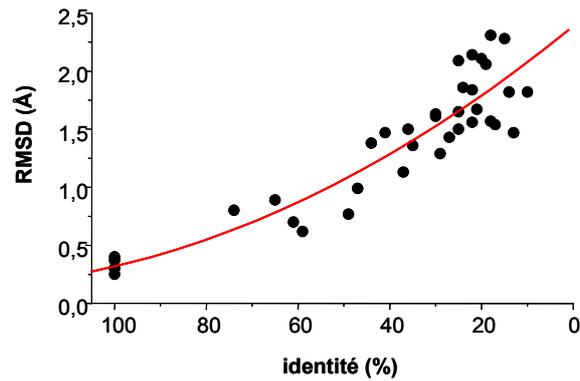


Figure II-1 : Relation entre RMSD et identité de séquence (d'après Chothia et Lesk, 1986), calculés pour les cœurs de 32 protéines homologues. Le RMSD et le pourcentage d'identité ont été calculés sur les atomes du squelette des cœurs.

Pour réaliser notre modèle, nous avons utilisé l'ensemble des programmes du CCP4 (Collaborative Computing Project Number <http://www.ccp4.ac.uk/>) et les paramètres par défaut du programme MODELLER (Sali et Blundell, 1993), qui requiert pour une performance satisfaisante 50 % d'identité entre la séquence à modéliser et la séquence support.

La première étape était donc de trouver une séquence dont la structure est déjà connue, présentant la plus forte homologie avec la séquence de la protéine de capsid du BMV. Nous avons effectué la recherche à partir des séquences protéiques répertoriées dans la Protein Data Bank à l'aide du programme BLASTP2 (Altschul et coll., 1990). Seule la séquence du CCMV, qui nous le savions déjà présente 70 % d'identité avec celle du BMV, répond à ce critère (Figure II-2).

La séquence du BMV, reportée dans le **Tableau I-1** et la Figure II-2, contient 189 résidus, soit un résidu de moins que celle du CCMV. Cette différence est due à des délétions aux positions 28 et 152, et à l'addition d'une arginine à l'extrémité C-terminale dans la séquence du BMV. Le résidu 28 est impliqué dans la formation des hexamères β . Le résidu 152 dans la séquence du CCMV est un résidu aspartate impliqué dans une hélice α , au niveau des pseudo axes 3.



Figure II-2 : Recherche d'homologie de séquence pour la protéine de capsid du BMV (référence SwissProt P03602). Cette séquence présente 70 % d'identité avec celle du CCMV (P03601, PDB 1cwp). Alignement visualisé grâce au programme BioEdit (Copyright© 1997-2001, Tom Hall, Department of Microbiology, NCSU).

2) Résultats

Nous avons utilisé les coordonnées atomiques du CCMV (code PDB 1cwp) pour réaliser notre modèle. Les valeurs du RMSD obtenues pour la comparaison des 3 chaînes de notre modèle et celles de son support sont inférieures à 0,75 Å (Tableau II-1). Parallèlement les valeurs des RMSD entre notre modèle et la structure du BMV (code PDB 1js9) montrent que nous avons obtenu un modèle tout à fait valide du BMV. La valeur des RMSD est 1,04 Å entre les chaînes A, 1,21 Å pour les chaînes B, et 1,10 Å pour les chaînes C.

	BMV_A	BMV_B	BMV_C	1CWP_A	1CWP_B	1CWP_C	1JS9_A	1JS9_B	1JS9_C
BMV_A	0	0,648818	0,799374	0,486066	0,595318	0,782105	1,04293	0,995978	1,1353
BMV_B	0,648818	0	1,10591	0,745179	0,757086	1,07868	1,21731	1,21828	1,44107
BMV_C	0,799374	1,10591	0	0,835192	0,935023	0,483386	1,3149	1,24678	1,10387
1CWP_A	0,486066	0,745179	0,835192	0	0,547248	0,72765	1,03781	1,09915	1,21969
1CWP_B	0,595318	0,757086	0,935023	0,547248	0	0,773327	1,16462	1,07487	1,28588
1CWP_C	0,782105	1,07868	0,483386	0,72765	0,773327	0	1,27327	1,17774	1,07342
1JS9_A	1,04293	1,21731	1,3149	1,03781	1,16462	1,27327	0	0,871014	0,951891
1JS9_B	0,995978	1,21828	1,24678	1,09915	1,07487	1,17774	0,871014	0	1,00229
1JS9_C	1,1353	1,44107	1,10387	1,21969	1,28588	1,07342	0,951891	1,00229	0

Tableau II-1 : Calcul des écarts quadratiques moyens (RMSD) sur les carbones α entre les sous-unités A, B, et C d'un même trimère et entre les sous-unités de trimères différents. Les sous unités de notre modèle sont appelées ici BMV_A, BMV_B et BMV_C. Les valeurs des RMS sont données en Å.

La Figure II-1 montre la superposition des traces de carbone α du CCMV (1cwp) en rouge, du BMV (1js9) en vert et de notre modèle du BMV en bleu.

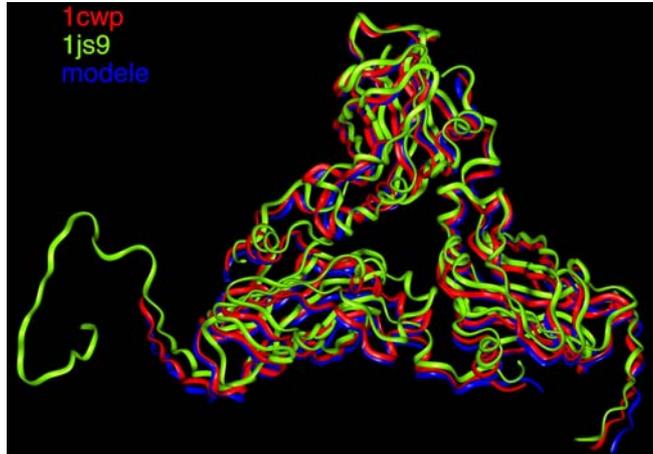


Figure II-1 : Superposition des trimères 1cwp, 1js9 et de notre modèle. La superposition est faite sur les carbones α .

3) Validation du modèle

Dans la protéine native, chacun des résidus composant la chaîne principale (c'est-à-dire le « squelette », composé des atomes communs à chaque résidu) est caractérisé par 3 angles dièdres : phi (Φ), psi (Ψ) et omega (ω) (voir la Figure II-1). La liaison peptidique étant plane et de conformation trans, ω est égal à 0.

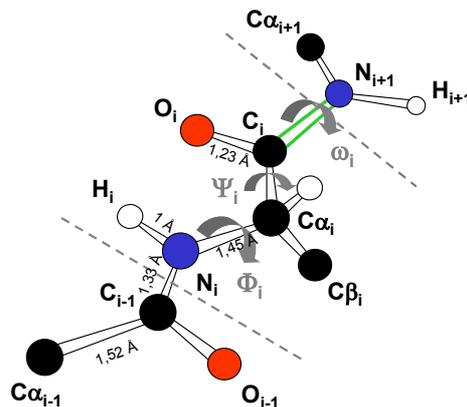


Figure II-1 : Conformation de la chaîne polypeptidique. La liaison peptidique (en vert) est plane ($\omega = 0$) et s'effectue entre le carbone C_i du groupement carboxyle du résidu i et l'azote N_{i+1} du groupement amine du résidu $i+1$. Les angles Φ et Ψ peuvent prendre différents ensembles de valeurs suivant le type des structures secondaires.

Ramachandran et Sasisekharan ont montré en 1968 (Ramachandran et Sasisekharan, 1968) que les valeurs des couples (Φ, Ψ) appartenait à des intervalles différents selon la nature des structures secondaires des protéines. Depuis, les valeurs permises ont été

répertoriées sur un ensemble représentatif de structures extraites de la PDB (Morris et coll., 1992). Les cartes (ou diagrammes) de Ramachandran permettent de visualiser les zones (Φ, Ψ) autorisées. Nous avons utilisé le programme PROCHECK (Laskowski et coll., 1993) pour évaluer la qualité de notre trimère ABC. Ce programme vérifie la qualité stéréochimique des modèles en analysant des paramètres concernant la géométrie globale de la structure mais aussi interne à chaque acide aminé. Nous avons ainsi obtenu les cartes de Ramachandran pour le CCMV (1cwp), pour notre modèle du BMV, et pour la structure réelle du BMV (1js9) (Figure II-2).

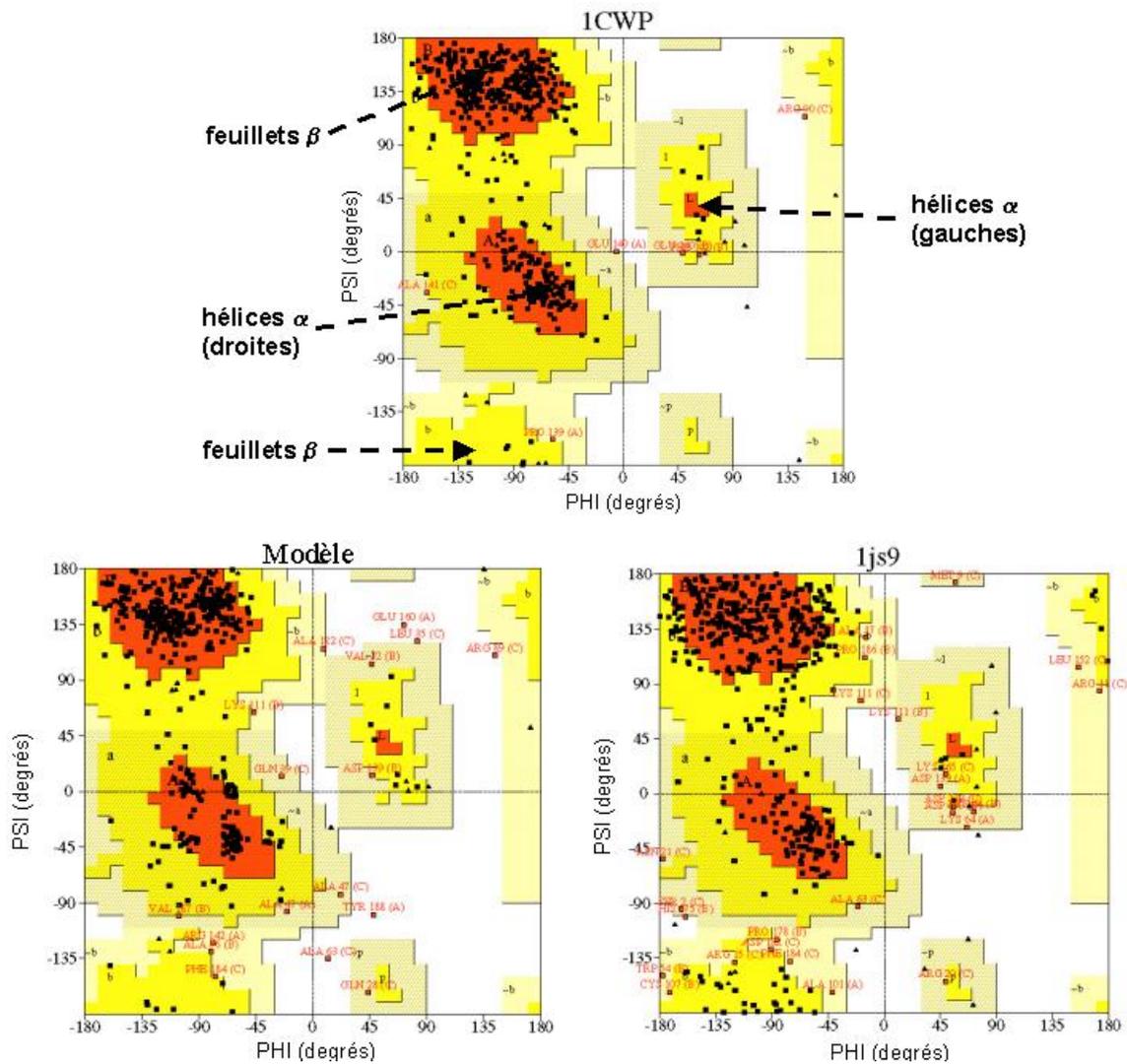


Figure II-2 : Cartes de Ramachandran calculées pour le CCMV (1cwp) (en haut), notre modèle du BMV (en bas à gauche) et le BMV par cristallographie (1js9) (en bas à droite). Les zones rouges correspondent aux combinaisons (Φ, Ψ) les plus fréquentes dans les structures protéiques. Elles forment deux grands ensembles de valeurs correspondant aux deux grands types de structure secondaire : hélices et brins. 80,6 % des résidus de notre modèle sont dans ces zones, contre 68,5 % pour 1js9. Dans le cas du CCMV, 84 % des résidus sont dans les zones favorables.

En tout, 98,8 % des résidus de notre modèle sont dans les zones favorables (en rouge dans la Figure II-2), autorisées (en jaune) et « généreusement » autorisées (en jaune pâle) par PROCHECK contre 99,8 % pour 1js9. Cinq résidus sont dans des zones non autorisées. Il s'agit de Glu 160 et Tyr 188 dans la chaîne A, et Leu 35, Ala 63 et Arg 89 dans la chaîne C. L'arginine 89 fait partie d'un brin β . Ces résultats nous confirment la très bonne qualité de notre modèle.

4) Attribution des structures secondaires

L'attribution des structures secondaires a ensuite été effectuée par le programme STRIDE (Frishman et Argos, 1995). Cette méthode complète un algorithme d'attribution automatique des structures secondaires plus ancien, DSSP (Kabsch et Sander, 1983), en étudiant à la fois l'énergie de liaisons hydrogènes spécifiques des structures répétitives et les angles dièdres des chaînes principales, plutôt que les liaisons hydrogènes uniquement. Les résultats obtenus apparaissent dans la Figure II-1.

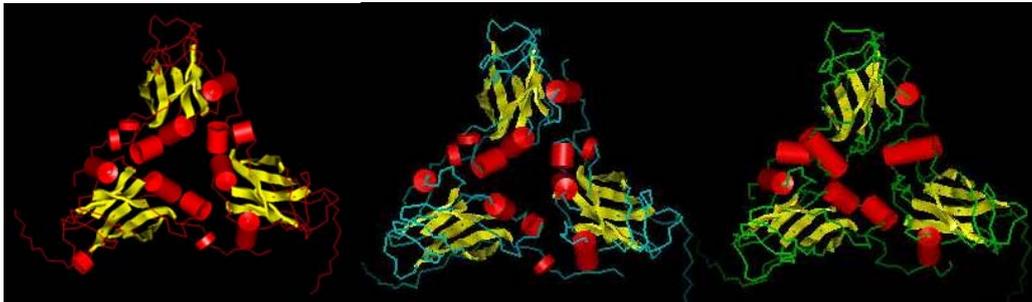


Figure II-1 : Comparaison entre les structures secondaires du CCMV (1cwp), du BMV (1js9) et de notre modèle du BMV. A gauche, structures secondaires de 1cwp. Au milieu, structures secondaires attribuées par STRIDE pour notre modèle. A droite, structures secondaires de 1js9.

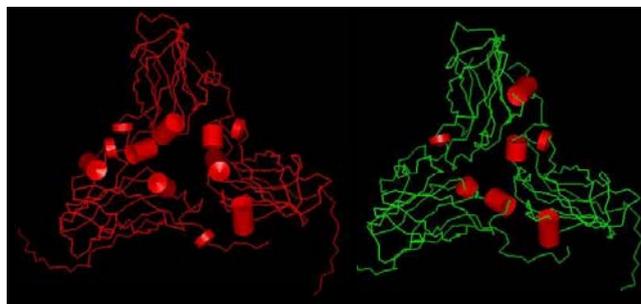


Figure II-2 : Différence entre les hélices attribuées par STRIDE pour 1cwp (à gauche) et 1js9 (à droite).

En observant la Figure II-1, on remarque que le nombre d'hélices diffère entre la structure de 1js9 et notre modèle. Pour vérifier si cette différence était due à une mauvaise détermination de notre modèle ou à un problème d'attribution des structures secondaires, nous avons utilisé STRIDE pour les coordonnées atomiques des fichiers 1cwp et 1js9 (Figure II-2).

La Figure II-26 et le Tableau II-1 rassemblent les structures secondaires attribuées par STRIDE pour 1cwp, 1js9 et notre modèle, ainsi que les structures définies dans les fichiers PDB par les auteurs. Les zones de faible identité de séquences entre les protéines de capsid du CCMV et du BMV sont localisées au niveau des boucles (voir l'alignement dans la Figure II-26). Les plus grandes différences (indiquées par un symbole jaune dans la Figure II-26) entre les chaînes A des trois modèles dans l'attribution des structures secondaires, correspondent à deux hélices. L'hélice 79-84, qui apparaît dans le fichier PDB 1js9 et dans notre modèle (80-84), n'a pas été trouvée par STRIDE pour 1js9. Une deuxième hélice, 146-151, présente dans notre modèle et dans les deux attributions pour 1cwp (147-153), est absente dans les deux attributions de 1js9. Toutefois, cette hélice, absente également dans la chaîne B, apparaît dans la chaîne C (voir le Tableau II-1). Il pourrait s'agir d'un problème de résolution des chaînes A et B. Il faut noter également que cette hélice se situe dans une région peu conservée entre les deux séquences. Compte tenu des faibles valeurs de RMSD obtenues pour chacune des sous-unités A, B et C de notre modèle et la structure cristallographique du BMV (code PDB 1js9), la différence dans la détermination et/ou dans la longueur des structures secondaires réside dans la variabilité des programmes utilisés pour réaliser les attributions, PROCHECK dans le cas du BMV et du CCMV, ou STRIDE pour notre modèle. Il a déjà été montré qu'à structure identique la variabilité des attributions suivant les programmes n'est pas négligeable (Colloc'h et coll., 1993).

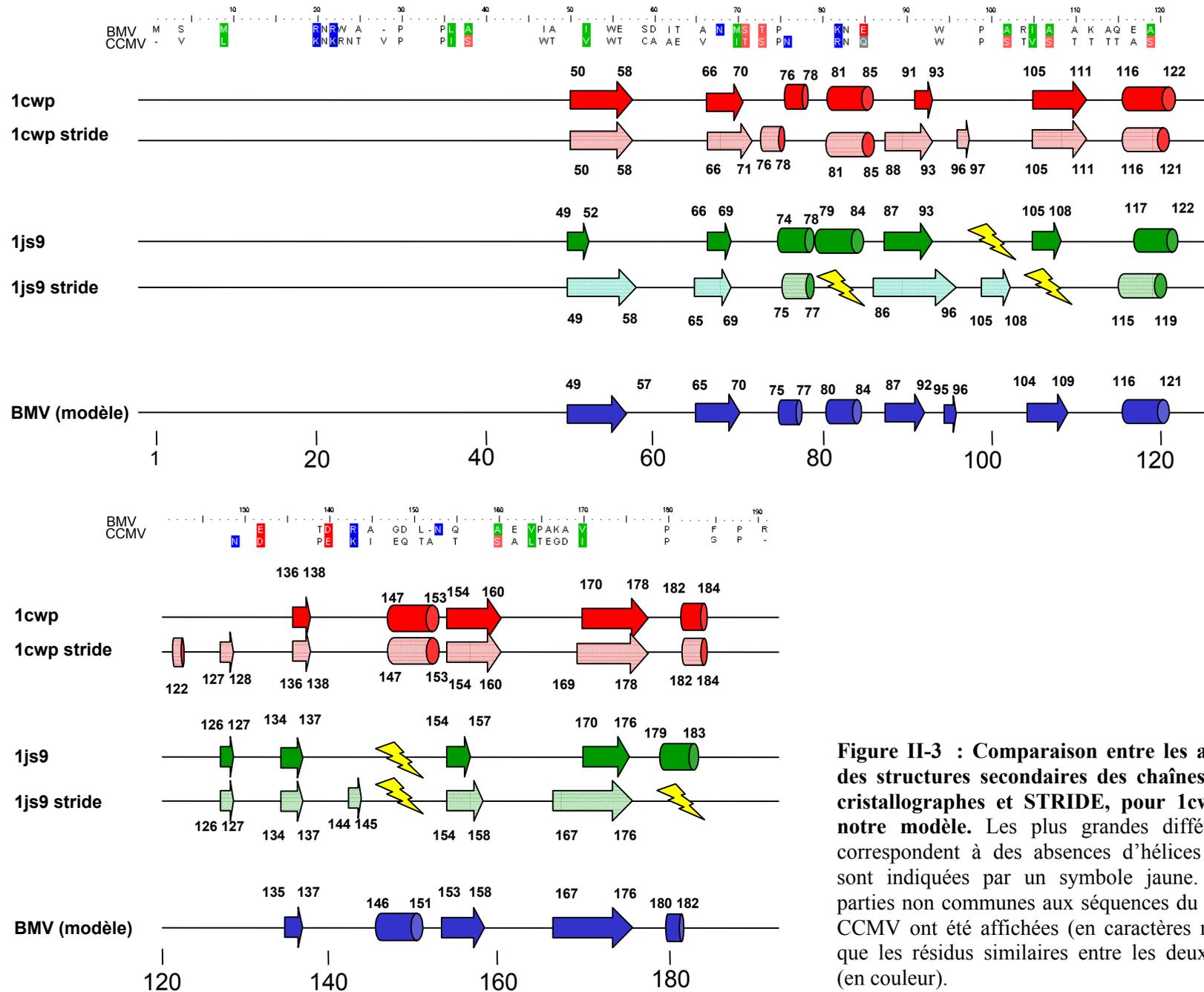


Figure II-3 : Comparaison entre les attributions des structures secondaires des chaînes A par les cristallographes et STRIDE, pour 1cwp, 1js9 et notre modèle. Les plus grandes différences, qui correspondent à des absences d'hélices pour 1js9, sont indiquées par un symbole jaune. Seules les parties non communes aux séquences du BMV et du CCMV ont été affichées (en caractères noirs), ainsi que les résidus similaires entre les deux séquences (en couleur).

Fichier PDB 1js9	1js9 par stride	Modèle par stride	Fichier PDB 1cwp	1cwp par stride
<p><u>HELICES</u> <i>chaîne A</i> (1 PRO 74-SER 78) 2 SER 79-GLU 84 3 ALA 117-ALA 122 (4 THR 179-PHE 183)</p> <p><i>chaîne B</i> (5 PRO 74-SER 78) 6 SER 79-GLU 84 (7 ALA 115-VAL 121)</p> <p><i>chaîne C</i> 8 SER 79-GLU 84 (9 ALA 115-VAL 121) (10 GLY 147-ASN 151)</p>	<p><u>HELICES</u> <i>chaîne A</i> (1 HIS 75-LEU 77) (2 ALA 115-PHE 119)</p> <p><i>chaîne B</i> (3 HIS 75-LEU 77) 4 GLU 80-GLU 84 (5 ALA 115-GLN 120)</p> <p><i>chaîne C</i> (6 HIS 75-LEU 77) 7 GLU 80-GLU 84 (8 ALA 117-GLN 120) (9 ASP 148-LEU 150)</p>	<p><u>HELICES</u> <i>chaîne A</i> (1 HIS 75-LEU 77) 2 GLU 80-GLU 84 3 GLU 116-VAL 121 4 LEU 146-ASN 151 (5 PHE 180-ASP 182)</p> <p><i>chaîne B</i> (6 HIS 75-LEU 77) (7 LYS 81-GLU 84) (8 ALA 115-GLN 120) 9 LEU 146-LEU 150</p> <p><i>chaîne C</i> (10 LYS 81-LYS 83) 11 ALA 117-VAL 121 12 LEU 146-LEU 150 (13 PHE 180-ASP 182)</p>	<p><u>HELICES</u> <i>chaîne A</i> 1 ASN 76-LEU 78 2 GLU 81-GLN 85 3 ALA 116-VAL 122 4 LEU 147-ASP 153 5 PHE 182-ASP 184</p> <p><i>chaîne B</i> 6 ASN 76-SER 79 7 GLU 81-GLN 85 8 ALA 116-VAL 122 9 LEU 147-ASP 153</p> <p><i>chaîne C</i> 10 SER 38-GLN 40 11 GLU 81-GLN 85 12 ALA 116-VAL 122 13 LEU 147-ASP 153 14 PHE 182-ASP 184</p>	<p><u>HELICES</u> <i>chaîne A</i> (1 ASN 76-LEU 78) 2 GLU 81-GLN 85 (3 ALA 116 - GLN 121) 4 VAL 122- VAL 122 5 LEU 147-ASP 153 (6 PHE 182 - ASP 184)</p> <p><i>chaîne B</i> (7 ASN 76 - LEU 78) (8 ARG 82 - GLN 85) (9 ALA 116 -GLN 121 10 LEU 147 - ASP 153</p> <p><i>chaîne C</i> (1 ALA 117 -GLN 121) 2 LEU 147-ALA 151 (3 PHE 182- ASP 184</p>
<p><u>FEUILLETS</u> <i>chaîne A</i> TYR 49-SER 52 THR 66-MET 69 VAL 87-TRP 93 LYS 105-VAL 108 ALA 126-ASP 127 ALA 134-TYR 137 ILE 154-TYR 157 HIS 170-VAL 176</p> <p><i>chaîne B</i> ILE 51-LYS 53 ALA 56-SER 57 THR 66-SER 70 VAL 90-LEU 96 ILE 104-GLU 110 ALA 126-ASP 127 ALA 134-TYR 137 LEU 152-ALA 158 VAL 167-GLU 174</p> <p><i>chaîne C</i> TYR 49-SER 52 THR 66-ALA 68 VAL 87-TRP 93 ILE 104-VAL 108 ALA 126-ASP 127 ALA 134-TYR 137 ILE 154-ALA 158 HIS 170-VAL 176</p>	<p><u>FEUILLETS</u> <i>chaîne A</i> TYR 49 -SER 58 A ALA 65 -MET 69 A LYS 86 -LEU 96 A LYS 105 -VAL 108 A ALA 126 -ASP 127 A ALA 134 -TYR 137 A ALA 144 -THR 145 A ILE 154 -ALA 158 A VAL 167 -VAL 176 A</p> <p><i>chaîne B</i> ILE 51 -SER 57 B ALA 65 -SER 70 B ARG 89 -LEU 96 B ILE 104 -GLU 110 B ALA 126 -ASP 127 B LEU 152 -ALA 158 B VAL 167 -GLU 174 B</p> <p><i>chaîne C</i> TYR 49 - SER 57 THR 66 - SER 70 C VAL 87 - LEU 96 C ILE 104 - VAL 108 C ALA 126 - ASP 127 C ALA 134 - TYR 137 C GLN 153 - ALA 158 C VAL 167 - VAL 176 C</p>	<p><u>FEUILLETS</u> <i>chaîne A</i> TYR 49-SER 57 ALA 65-SER 70 VAL 87-LEU 92 GLY 95-LEU 96 ILE 104-ALA 109 ALA 135-ASP 137 GLN 153-ALA 158 VAL 167-VAL 176</p> <p><i>chaîne B</i> TYR 49-ALA 56 ALA 65-SER 70 LYS 86-GLY 95 ILE 104-ALA 109 ALA 126-ASP 127 ALA 134-TYR 137 ALA 144-THR 145 GLN 153-ALA 158 VAL 168-VAL 176</p> <p><i>chaîne C</i> TYR 49-GLU 55 ALA 68-SER 70 LYS 86-LEU 96 LYS 105-ALA 109 ALA 126-ASP 127 ALA 134-TYR 137 ALA 144-THR 145 GLN 153-TYR 155 VAL 167-VAL 176</p>	<p><u>FEUILLETS</u> <i>chaîne A</i> TYR 50-SER 58 VAL 66-ILE 70 VAL 91-LEU 93 VAL 105-GLU 111 ALA 136-TYR 138 LEU 154-SER 160 ILE 170-VAL 178</p> <p><i>chaîne B</i> TYR 50-ALA 57 VAL 66-THR 71 VAL 91-GLY 96 VAL 105-GLU 111 ALA 136-TYR 138 LEU 154-SER 160 ILE 170-VAL 178</p> <p><i>chaîne C</i> TYR 50-SER 58 VAL 66-THR 71 VAL 91-LEU 97 VAL 105-GLU 111 ALA 135-TYR 138 LEU 154-SER 160 VAL 169-VAL 178</p>	<p><u>FEUILLETS</u> <i>chaîne A</i> TYR 50 -SER 58 VAL 66 -THR 71 VAL 88 -LEU 93 GLY 96 -LEU 97 VAL 105 -GLU 111 ALA 127 -ASP 128 ALA 136 -TYR 138 LEU 154 -SER 160 VAL 169 -VAL 178</p> <p><i>chaîne B</i> TYR 50 -ALA 57 VAL 66 -THR 71 LYS 87 -GLY 96 VAL 105 -GLU 111 ALA 127 -ASP 128 ALA 136 -TYR 138 ILE 145 -THR 146 LEU 154 -SER 160 ILE 170 -VAL 178</p> <p><i>chaîne C</i> TYR 50 - SER 58 VAL 66 - THR 71 LYS 87 - LEU 97 VAL 105 - GLU 111 ALA 127 - ASP 128 ALA 136 - TYR 138 ILE 145 - THR 146 LEU 154 - SER 160 VAL 169 - VAL 178</p>

Tableau II-1 :Structures secondaires attribuées par STRIDE et/ou reportées dans la PDB. Les hélices 3_{10} sont indiquées entre parenthèses, les autres hélices sont des hélices α . Les feuillets β sont antiparallèles.

Après avoir déterminé la structure du BMV sous sa forme compacte, nous nous sommes intéressés à sa forme gonflée. Il n'existe pas à ce jour de structure atomique d'un virus T = 3 sous cette forme. Un modèle du CCMV gonflé à 25 Å de résolution a été obtenu par reconstruction tridimensionnelle à partir de clichés de cryomicroscopie électronique (Speir et coll., 1995). Nous avons voulu essayer cette méthode avec le BMV.

II-C. Structure de la forme gonflée du BMV à 30 Å de résolution

Comme nous l'avons vu précédemment, la particularité des virus icosaédriques de plantes est de subir un gonflement lors de leur entrée dans le cytoplasme des cellules qu'ils infectent (Hsu et coll., 1976; Bancroft et coll., 1967; Incardona et Kaesberg, 1964; Robinson et Harrison, 1982). Ce phénomène, qui est à l'origine du désassemblage du virus, est provoqué par le détachement des ions calcium qui stabilisent la capsid.

Le mécanisme de gonflement du CCMV a fait l'objet de nombreuses études (Bancroft et coll., 1967; Albert et coll., 1997; Speir et coll., 1995; Tama et Brooks, 2002; Fox et coll., 1998). La reconstruction tridimensionnelle de ce virus sous sa forme gonflée, grâce à la cryomicroscopie électronique (Fox et coll., 1998; Speir et coll., 1995), a montré que les capsomères gardent leur structure propre, mais subissent une translation le long des axes 5 et des pseudo-axes 6, ce qui provoque la formation de pores de 20 Å de diamètre au niveau des pseudo-axes 3. L'ARN apparaît principalement localisé au niveau de ces axes.

Bien que la cryomicroscopie électronique ne permette pas d'accéder à la structure atomique des virus, cette technique permet d'observer la densité électronique correspondant à l'ARN viral, qui n'ayant pas de structure ordonnée ne peut être observé par cristallographie des rayons X (Cheng et coll., 1994; Baker et Cheng, 1996; Fox et coll., 1998; Tsuruta et coll., 1998; Wikoff et coll., 1997). Le deuxième intérêt de cette technique, dans le cas du CCMV ou du BMV, est de pouvoir étudier leur structure dans l'état gonflé. En effet, les particules virales présentent une grande hétérogénéité de diamètre à pH 7,5. Cet effet a déjà été observé dans le cas du CCMV (J. E. Johnson, communication personnelle), ce qui expliquerait l'impossibilité de cristalliser le virus gonflé.

Nous avons pu obtenir des modèles du BMV sous sa forme compacte et sous sa forme gonflée à une résolution de 30 Å à partir de clichés de cryomicroscopie électronique. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Nicolas Boisset (LMCP, Paris) pour la cryomicroscopie, et avec Célia Plisson et Patrick Bron (ICM, Rennes) pour la reconstruction

tridimensionnelle. Ces modèles ont pu nous donner des informations complémentaires sur l'organisation de l'ARN viral dans la capsid lors du changement de structure du BMV.

1) La cryomicroscopie électronique

Présentation de la méthode

L'observation des macromolécules biologiques par microscopie électronique, jusqu'à la fin des années 80, reposait principalement sur la technique de coloration négative par des métaux lourds, qui permet l'obtention d'un contraste élevé entre les molécules et le solvant. Nous avons par exemple utilisé l'acétate d'uranyle pour vérifier la pureté de nos échantillons de BMV, et la résolution de nos clichés nous a permis d'observer les capsomères du virus. Toutefois, cette technique présente l'inconvénient majeur d'assécher les échantillons, ce qui provoque la perte de la structure native des molécules.

La cryomicroscopie électronique associée à la reconstruction d'images tridimensionnelles permet d'obtenir la structure de complexes fonctionnels à haute résolution, soit directement, soit associée à la cristallographie par diffraction des rayons X, pour l'attribution des phases. Contrairement à la RMN et à la cristallographie, c'est une méthode qui permet d'observer des molécules individuelles dans leur état natif. En effet, la congélation ultra rapide à -180°C des échantillons permet de préserver la structure des molécules dans un environnement aqueux, et de pouvoir observer des changements de conformation (fixation d'anticorps, dénaturation) dus à des interactions entre protéines, ou à des variations physico-chimiques. De plus, la température d'observation des grilles (idéalement à -180°C également) permet une résistance à l'irradiation environ cinq fois supérieure à celle obtenue lors de la coloration négative. Toutefois, les prises de vue doivent être effectuées avec une dose réduite d'électrons, et les images obtenues sont donc peu contrastées et ont un faible rapport signal/bruit. Le contraste dépend de la différence de phase entre le faisceau direct et le faisceau diffusé, qui peut être modulée en fonction de la mise au point (défocus). L'image obtenue est une projection de la structure de l'objet, modulée par un terme dépendant des caractéristiques optiques du microscope. Ce terme est la fonction de transfert de contraste (FTC), qui décrit la formation de l'image par le microscope et qui prend en compte les effets de la mise au point, l'aberration de sphéricité, la cohérence du faisceau électronique, etc... Les

oscillations de la FTC provoquent des pertes locales d'information, qui peuvent être compensées en combinant des images prises à différentes défocalisations.

Préparation et observation des échantillons

Nous avons voulu observer le virus sous sa forme compacte à pH 5,9, dans une solution à 20 mM d'acétate de sodium, et le BMV sous sa forme gonflée à pH 7,5, dans un tampon Tris 20 mM, 30 mM d'EDTA. Des échantillons à une concentration de 1,5 mg/ml de BMV ont été déposés sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone à « trous » (Jahn, 1995). Les grilles ont été congelées dans l'éthane liquide, ce qui empêche la formation de cristaux de glace et maintient l'eau de l'échantillon dans un état amorphe métastable (« glace vitreuse ») (Dubochet et coll., 1982). L'observation des grilles a été réalisée sur un microscope électronique à transmission LEO 912 OMEGA, au Service de Microscopie Electronique de l'IFR 83 (Biologie Intégrative, CNRS-UPMC). Les prises de vue ont été effectuées à une dose de 13 électrons par Å^2 , avec un défocus variant de 800 à 1500 nm. Les négatifs obtenus ont été numérisés avec un pas d'échantillonnage carré de 2,54 Å de côté.

2) Principe de la reconstruction des virus icosaédriques par Transformée de Fourier Polaire (TFP)

L'image bidimensionnelle (2D) obtenue par microscopie est reliée à l'objet tridimensionnel (3D) par le théorème des projections centrales : l'image fournie par un microscope électronique est une projection 2D de l'échantillon, et la transformée de Fourier de cette projection est une section centrale de la transformée de Fourier tridimensionnelle de l'échantillon orientée perpendiculairement à l'axe de projection. Si le nombre d'images orientées différemment est suffisant, on peut remplir l'espace de Fourier et obtenir par transformée de Fourier inverse une représentation 3D de la densité électronique de la molécule. La reconstruction tridimensionnelle de macromolécules identiques présentant des orientations (ϕ, θ, ω) différentes peut s'effectuer en déterminant les positions relatives de leurs éléments de symétrie. Les particules icosaédriques ont une symétrie élevée : 12 centres d'ordre 5, 20 centres d'ordre 3 et 30 centres d'ordre 2, ce qui facilite la détermination de la position des éléments de symétrie dans les particules isolées, et réduit également le nombre d'images nécessaires à la reconstruction.

La reconstruction des particules icosaédriques par la méthode de la Transformée de Fourier Polaire (TFP) repose sur un modèle 3D de référence, dont les projections 2D sont produites sur un ensemble d'orientations pour obtenir une banque d'images sur la moitié seulement d'une unité asymétrique (soit $1/120^{\text{ème}}$ de la capsid). Nous avons utilisé les projections du modèle $T = 3$ calculées à 20 Å de résolution par James Conway (IBS, Grenoble) sur son modèle du virus de l'Hépatite B (Conway et coll., 1997). Le modèle a été modifié par Célia Plisson (ICM, Rennes) pour l'adapter au BMV (changement du rayon externe en fonction de l'état du BMV, suppression des spicules et du volume central) (Figure II-1).

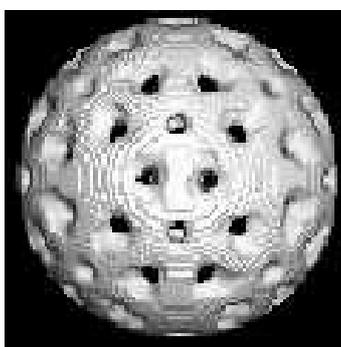


Figure II-1 : Modèle de référence $T = 3$. Ce modèle de base a été obtenu à partir du modèle du virus de l'Hépatite B obtenu par J. Conway (Conway et coll., 1997).

Les coordonnées cartésiennes (x,y) des projections sont converties en coordonnées polaires (r,γ) , ce qui subdivise les données en une série d'anneaux de rayons r , partant de $r = 0$ jusqu'à la valeur du rayon externe. Chacune des projections « polaires » subit une transformée de Fourier le long de la direction azimutale (γ) , ce qui permet de construire la banque de « transformées de Fourier polaires » dont les modules sont invariants par rotation dans le plan de projection.

Les images des virus sélectionnés sur les clichés de cryomicroscopie et dont la FTC a été corrigée subissent elles aussi une transformée de Fourier polaire (TFP), et les résultats obtenus sont comparés aux données de la banque. Un fichier de sortie indique, pour chaque particule, les coordonnées (x,y) de son centre, son orientation (θ,φ,ω) déduite de la comparaison aux projections du modèle, ainsi que 3 coefficients de corrélation (pftcc, prjcc, cmpcc), indices de confiance de l'orientation de la particule. Seules les particules présentant un coefficient de corrélation supérieur à un certain seuil arbitrairement choisi sont conservées, et un premier modèle est reconstruit à partir de ces particules. Un autre cycle est lancé à partir de ce nouveau modèle, en le confrontant aux TFP d'autres virus sélectionnés, pour affiner le

modèle. Nous avons utilisé pour les différentes étapes de la reconstruction, représentées dans la Figure II-2, les programmes *x3dPreprocess* (1.8.2n), *SumPS* (1.2.7s), *CTFzero* et *CTFMIX* de James Conway (Conway et Steven, 1999), et les programmes *EMPFT* et *EM3DR* de Timothy S. Baker (Baker et Cheng, 1996; Fuller et coll., 1996). Les données ont ensuite été traitées avec *SPIDER* (Frank et coll., 1996).

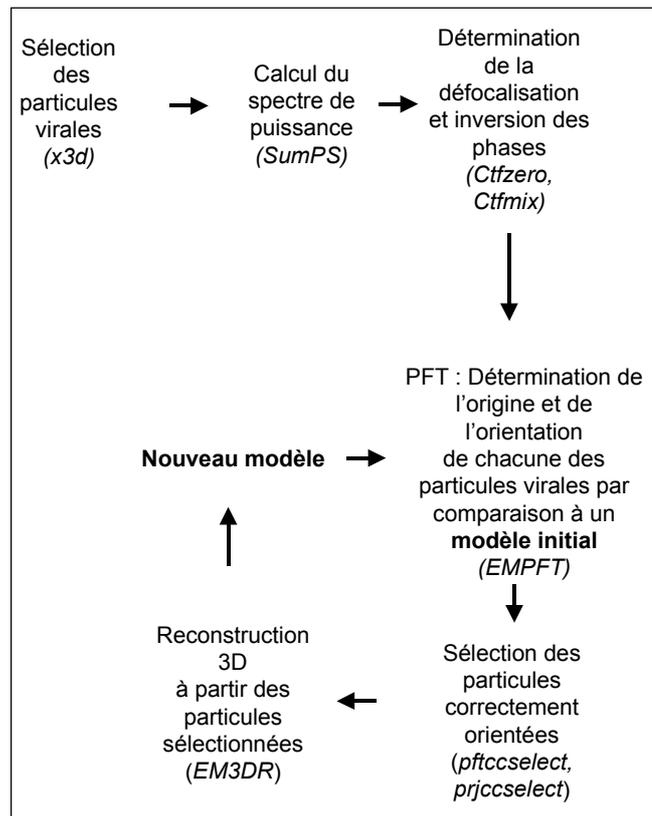


Figure II-2 : Reconstruction du BMV par Transformée de Fourier Polaire. Cette méthode a pour principe de confronter les TFP des particules numérisées sélectionnées à une banque de TFP établie à partir d'un modèle initial connu.

3) Reconstruction du BMV

Sur 6296 particules sélectionnées pour le virus sous sa forme compacte, et 1767 pour sa forme gonflée, seulement 511 et 137 respectivement ont pu être utilisées pour construire les deux modèles obtenus après 3 cycles d'affinement. La différence de nombre entre les deux formes du BMV s'explique d'une part par la distribution très peu dense des virus à pH 7,5, mais également par l'hétérogénéité de taille des particules à ce pH (Figure II-1), pour lequel nous n'avons sélectionné que celles dont le diamètre était compris entre 302 et 304 nm, d'après les données de diffusion des neutrons établies par Jacrot et coll (Jacrot et coll., 1977).

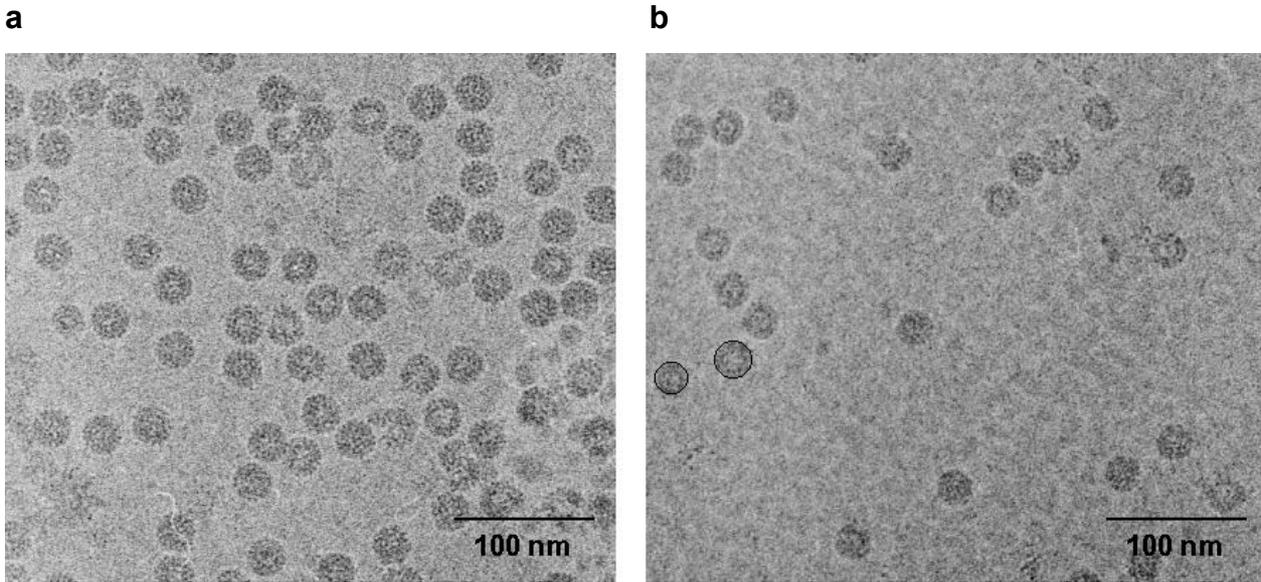


Figure II-1 : Clichés de cryomicroscopie (grandissement x 40 000) du BMV sous sa forme compacte à pH 5,9 (a) et sous sa forme gonflée à pH 7,5 (b). La concentration initiale était de 1,5 mg/ml de BMV dans les deux cas, mais les particules virales apparaissent plus dispersées à pH 7,5, et de tailles hétérogènes (les différences de tailles sont désignées par des cercles).

Les reconstructions obtenues pour les deux formes du virus (Figure II-2) nous permettent d'observer le gonflement, d'environ 8 %, du BMV à pH 7,5 en présence d'EDTA. La reconstruction du virus sous sa forme gonflée met en évidence l'écartement des capsomères entre eux et la formation de pores au niveau des pseudo-axes 3. Le centre du virus est creux dans les deux cas, et le diamètre du lumen passe de 60 à 80 Å environ à pH 7,5. Nous retrouvons donc ici les caractéristiques du CCMV et du BMV gonflés.

Le résultat le plus intéressant est peut-être la présence d'une deuxième couche de densité électronique sous la capsid protéique. La forme de cette densité varie avec l'état du virus.

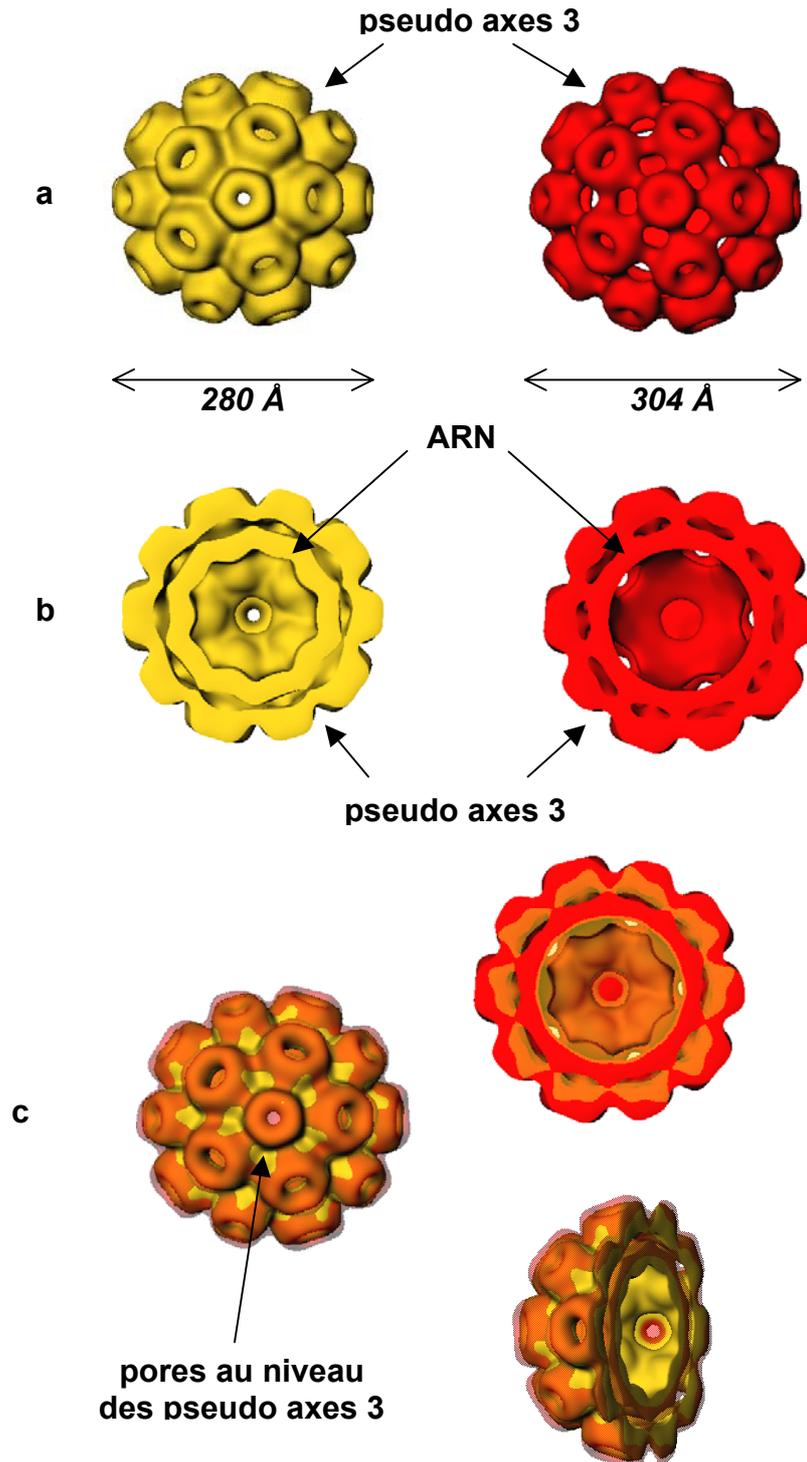


Figure II-2 : BMV sous sa forme compacte et sous sa forme gonflée. Les reconstructions sont centrées sur un axe 5. (a, b) La forme gonflée (en rouge) se distingue de la forme compacte (en jaune) par une augmentation d'environ 8% du diamètre, par l'existence de pores au niveau des pseudo-axes 3, et par l'obstruction des pores des pentamères par l'ARN. Ces différences sont très visibles lorsque les deux modèles sont superposés (c).

Il a été démontré pour plusieurs virus icosaédriques $T = 3$ comme le Flock House Virus (Cheng et coll., 1994), le Cucumber Mosaic Virus (Wikoff et coll., 1997) et enfin le CCMV (Fox et coll., 1998) que la présence d'une masse centrale de densité électronique correspondait à l'ARN viral. Nous avons voulu comparer plus précisément nos modèles avec les modèles obtenus par Fox et coll. à 25 Å de résolution pour le CCMV, qui sont représentés dans la Figure II-3.

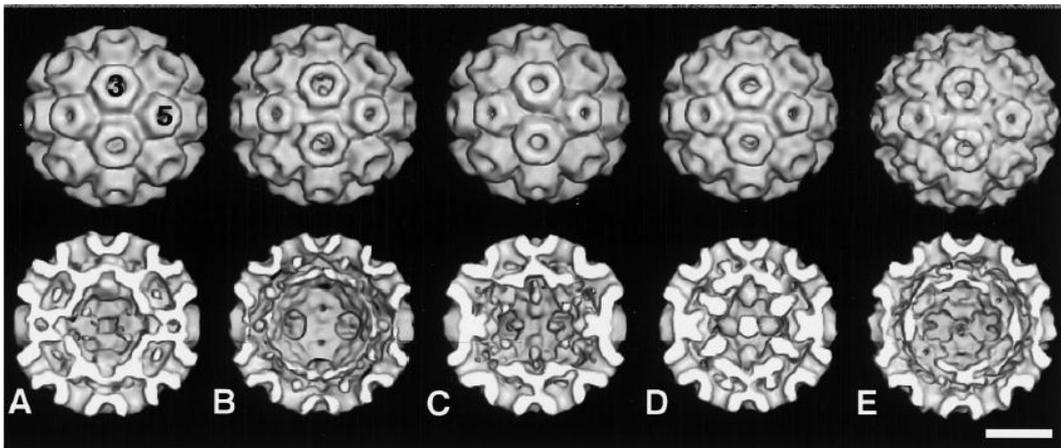


Figure II-3 : Reconstruction tridimensionnelle du CCMV à 25 Å de résolution (Illustration tirée de l'article de Fox et coll., 1998). Les reconstructions A et B correspondant respectivement au CCMV natif (mélange des 3 types de capsides), et au CCMV vide. Les reconstructions C, D et E correspondent à des capsides contenant respectivement l'ARN1, l'ARN2 et les ARN 3 et 4. On remarque une différence dans la répartition des différents ARN. La barre correspond à 10 nm.

La reconstruction de capsides vides de CCMV (Figure II-3 B) ne présente aucune densité artificielle. Les « deuxièmes couches » observées dans les autres modèles correspondent donc à l'ARN viral. La densité correspondant à l'ARN est différente selon la nature du fragment (ARN1, ARN2 ou ARN3+ARN4). On peut supposer que la densité visible dans le modèle A, obtenu à partir d'un mélange des trois types de capsides, correspond à la moyenne des densités observées pour les 4 fragments. C'est cette moyenne que nous devons observer avec nos reconstructions du BMV.

Lorsque le BMV est sous sa forme compacte, l'ARN suit les contours des formes internes des capsomères (Figure II-2b). Lorsque le BMV est sous sa forme gonflée, la deuxième couche semble se réorganiser, et se plaquer un peu plus contre la capsid,

principalement au niveau des pseudo-axes 3 (Figure II-2 b), mais également au niveau des axes 5, dont elle bouche le pore (Figure II-2 c).

Il existe deux théories quant à la façon dont l'ARN est traduit et libéré dans le cytoplasme (désassemblage co-translationnel) : soit il sort par les pores de 20 Å formés au niveau des pseudo-axes 3 lors du gonflement de la capsid (Speir et coll., 1995), soit il sort au niveau des axes 5, car il a été démontré que le gonflement de la capsid (donc les pores au niveau des pseudo-axes 3) n'était pas indispensable à la prolifération virale (Albert et coll., 1997), et les pentamères sont les structures les moins stables à ce pH.

Nos résultats semblent aller dans le sens d'Albert et coll. En effet, l'ARN pourrait bien sortir au niveau des axes 5, car nous y retrouvons avec la forme gonflée du BMV une densité électronique qui n'existait pas sous la forme compacte du virus. De plus, la présence même de l'ARN confirme la nécessité d'un désassemblage co-translationnel : en l'absence des protéines de l'hôte, l'ARN ne sort pas de la capsid.

Le modèle du virus sous sa forme compacte obtenu par homologie de séquences à partir de la structure cristallographique du CCMV est de très bonne qualité, comme le montrent les valeurs des RMSD calculées entre notre modèle du BMV et la structure du BMV répertoriée dans la PDB. Le modèle du virus gonflé obtenu par reconstruction tridimensionnelle à partir de clichés de cryomicroscopie nous a renseigné sur la répartition de l'ARN dans la capsid.

Nous allons maintenant nous intéresser au comportement des particules virales en solution, en tant que macromolécules de grande taille, en fonction de différents paramètres physico-chimiques, et mettre en relation la nature des interactions en solution et la cristallisation du BMV. Nous présenterons d'abord la théorie des forces d'interaction entre macromolécules en solution, les notions de solubilité et de cristallisation des protéines, et la technique de diffusion des rayons X aux petits angles.

III- INTERACTIONS ENTRE MACROMOLECULES EN SOLUTION

La compréhension des interactions entre macromolécules biologiques est la clé de mécanismes comme l'oligomérisation, la formation de complexes ligand-substrat, de l'auto-assemblage des capsides virales, du repliement des protéines..., mais également de phénomènes physico-chimiques comme les séparations de phase ou la cristallisation des protéines.

La solubilité des macromolécules est directement reliée à la nature des interactions en solution. Augmenter ou diminuer la solubilité équivaut à augmenter ou diminuer les interactions répulsives, et la cristallisation des protéines a lieu dans un régime attractif, ou très faiblement répulsif (George et Wilson, 1994; Muschol et Rosenberger, 1995; Ducruix et coll., 1996; Guilloteau, 1991; Tardieu et coll., 2002 ; Yau et Vekilov, 2000a; Velez et coll., 1998; Vivarès et Bonneté, 2002). La variation de paramètres physico-chimiques tels que le pH, la présence et la concentration de sels ou de polymères, peuvent induire des interactions attractives en solution.

La technique de diffusion des rayons X aux petits angles et l'analyse des interactions entre particules pour établir des conditions de cristallisation presque systématique, qui est la thématique principale du groupe d'A. Tardieu (LMCP, Paris), permet de limiter le nombre d'essais de cristallisation.

Les notions abordées dans ce chapitre sont présentées dans les ouvrages de J. Israelachvili (1992) et A. Gerschel (1995) pour les interactions intermoléculaires, et dans les ouvrages de A. Guinier et G. Fournet (1955) et H. Brumberger (1993) pour la diffusion des rayons X aux petits angles.

III-A. Les interactions intermoléculaires

Les macromolécules en solution exercent entre elles des actions réciproques, appelées interactions intermoléculaires, qui sont exprimées sous la forme de force intermoléculaire (F) ou de potentiel d'interaction (U) (ou encore énergie potentielle intermoléculaire). La force dérive du potentiel : $F(r) = -\text{grad } U(r)$, r étant la distance entre les macromolécules. Dans le cas de macromolécules sphériques, $F(r)$ ne dépend pas de leur orientation, mais uniquement de r .

Un potentiel d'interaction positif, correspondant à une force répulsive, tend à repousser deux molécules, tandis qu'un potentiel négatif, correspondant à une force attractive, tend à les rapprocher.

Les forces d'interaction entre macromolécules peuvent être de très courte portée, comme les répulsions entre nuages électroniques appelées forces répulsives de volume exclu, ou de moyenne portée, comme les interactions de Van der Waals et les interactions électrostatiques. Ces trois types d'interactions dépendent du pH, de la température et de la composition du solvant, et constituent ce que l'on appelle le modèle Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (Derjaguin, 1940; Verwey et coll., 1948), dans lequel le solvant est considéré comme continu, et où les ions sont ponctuels et n'interviennent que dans la force ionique. D'autres interactions interviennent en solution, comme les liaisons hydrogènes et l'hydratation. Enfin, l'ajout d'agents précipitants comme les sels ou les polymères peuvent induire des effets d'attractions supplémentaires, respectivement l'effet Hofmeister et l'attraction de déplétion.

Dans la suite, nous ne considérerons que le cas de solutions de particules sphériques monodisperses de rayon R , le BMV pouvant être assimilé à une sphère.

1) Forces répulsives de volume exclu ou de « sphères dures »

Les forces répulsives de volume exclu, appelées encore répulsions stériques, traduisent l'impossibilité pour les nuages électroniques de deux molécules de s'interpénétrer. Cela se traduit par une répulsion infinie lorsque la distance r entre les deux molécules est inférieure ou égale au diamètre d'une particule, et par une répulsion nulle au-delà de cette distance. C'est le potentiel de sphères dures, qui exprime l'indéformabilité des molécules. Le potentiel intermoléculaire, de très courte portée, peut s'écrire comme suit, où D est le diamètre de la sphère dure :

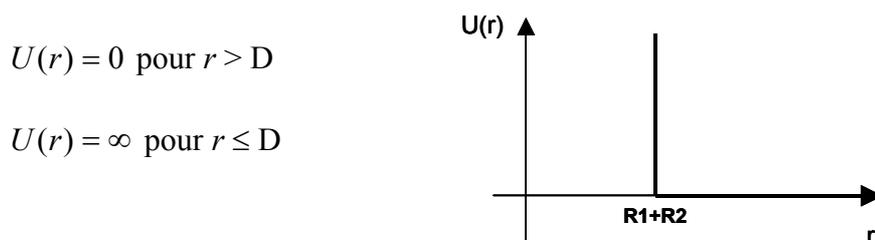


Figure III-1 : Potentiel de sphères dures. La répulsion est infinie lorsque la distance entre deux molécules est inférieure à la somme de leurs rayons.

Le potentiel de sphères dures peut s'écrire également sous la forme: $U(r) = (R/r)^n$, où R est le rayon de la molécule et n est un entier. Lorsque $n = \infty$, on retrouve le potentiel de sphères dures. Pour $n = 12$, on retrouve la partie répulsive du potentiel de Lennard-Jones qui ne prend en compte que les interactions de sphères dures et de Van der Waals.

2) Forces électrostatiques

Les interactions électrostatiques les plus importantes sont les interactions charge/charge, appelées interactions coulombiennes, de longue portée. L'énergie potentielle d'interaction est donnée par la relation suivante :

$$U(r) = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r} \quad \text{Eq. III-1}$$

où q_1 et q_2 sont deux charges distantes de r et considérées identiques dans le cas d'une solution monodisperse, et où ϵ_0 est la constante diélectrique du vide (~ 1) et ϵ celle du solvant. Lorsque les deux charges sont de même signe, l'énergie potentielle est positive et les interactions sont répulsives. Lorsque les charges sont de signes opposés, les interactions sont attractives.

Dans le cas d'une solution monodisperse de macromolécules biologiques, l'énergie potentielle sera donc répulsive, car ces macromolécules ont toutes la même charge moyenne effective, répartie uniformément à leur surface.

Dans un solvant sans charges, le potentiel coulombien a une très longue portée ($1/r$), mais en solution aqueuse, il est écranté par la présence des contre-ions du solvant. Les ions peuvent être considérés sans dimension et n'interviennent alors que par l'intermédiaire de la constante d'écrantage κ (Debye et Hückel, 1923 ; Russel et coll. ; 1989).

Le potentiel coulombien écranté s'écrit :

$$\frac{U(r)}{k_B T} = \frac{Z_2 L_B}{r} \frac{e^{-\kappa(r-D)}}{(1 + \frac{\kappa D}{2})^2} \quad \text{Eq. III-2}$$

$$\text{avec } \kappa = \lambda_D^{-1} = (8\pi L_B N_A I)^{1/2} \quad \text{Eq. III-3}$$

où $D = 2R$, L_B est la longueur de Bjerrum, et I la force ionique $I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2$ (où c_i et Z_i sont respectivement la concentration et la charge de l'ion i du sel).

3) Forces de Van der Waals

Les forces attractives de van der Waals entre atomes ou petites molécules sont des interactions attractives variant en $1/r^6$. Elles sont de type dipôle/dipôle, et regroupent les interactions dipôle permanent/dipôle permanent (potentiel d'orientation ou de Keesom), les interactions de type dipôle induit/dipôle permanent (potentiel de Debye ou d'induction), et enfin les interactions de type dipôle induit/dipôle induit, qui dérivent essentiellement des forces de dispersion de London existant entre deux molécules apolaires et qui constituent la contribution la plus importante des forces attractives :

$$U(r) = -\frac{3h\nu}{4(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2} \frac{\alpha^2}{r^6} \quad \text{Eq. III-1}$$

où h est la constante de Planck, ν la fréquence d'ionisation de la molécule et α la polarisabilité des molécules.

Avec des macromolécules en solvant aqueux, il faut intégrer le potentiel sur leur volume (Mahanty et Ninham, 1976) :

$$U(r) = -\frac{A}{12} \left(\frac{1}{(x^2-1)} + \frac{1}{x^2} + 2 \ln\left(1 - \frac{1}{x^2}\right) \right) \quad \text{Eq. III-2}$$

avec $x = r/\sigma$. A grande distance, on retrouve l'expression en $1/r^6$ (Israelachvili, 1992) :

$$U(r) \approx -\frac{1}{r^6} \quad \text{Eq. III-3}$$

Lorsque le solvant est pris en compte, il faut remplacer la polarisabilité par la différence entre la polarisabilité de la molécule et celle du solvant, ou « excès de polarisabilité » :

$$A = \frac{3kT(\epsilon_P - \epsilon_S)^2}{4(\epsilon_P + \epsilon_S)^2} + 3h\nu \frac{(n_P^2 - n_S^2)^2}{16(\sqrt{2})(n_P^2 + n_S^2)^{\frac{3}{2}}} \quad \text{Eq. III-4}$$

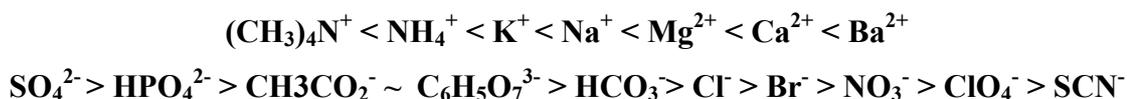
A est la constante de Hamaker. Les indices P et S correspondent respectivement à la protéine et au solvant, n est l'indice de réflexion, et ϵ est la constante diélectrique. La constante de Hamaker est considérée comme étant identique d'une protéine à l'autre, égale à 2,86 kT (Malfois et coll., 1996), sous réserve que les protéines soient compactes.

Dans le cas de macromolécules non compactes, le volume exclu (ou volume incompressible) contient à la fois la molécule et du solvant. L'indice de réfraction et la

constante diélectrique du volume sont proches de ceux du solvant ; l'attraction de Van der Waals devient négligeable, tandis que le potentiel de sphère dure augmente. Le potentiel résultant est donc seulement répulsif.

4) Effet Hofmeister

Dès 1888, Hofmeister a classé les ions en fonction de leur capacité à précipiter les euglobulines. Les anions ainsi que les cations, qui ont un effet inférieur aux anions, sont classés suivant leur effet, en ce qu'on appelle les « séries Hofmeister » :



Les sels sont des agents de cristallisation très utilisés (Arakawa 1985). La solubilité des protéines varie selon le type d'anion monovalent en suivant l'ordre inverse de la série Hofmeister à un pH inférieur au pI de la protéine, et selon l'ordre direct à un pH supérieur au pI (Riès-Kautt et Ducruix, 1989; Carbonnaux et coll., 1995).

La diffusion des rayons X aux petits angles a mis en évidence que la cristallisation des protéines était reliée à la création d'interactions attractives par les sels. Dans le modèle DLVO, l'addition de sels n'a pour effet que d'écranter les charges des protéines. En fait, ce modèle n'est pas valable à haute force ionique ($>0,1$ M). Des études effectuées sur le lysozyme d'œuf de poule dès la fin des années 80 par l'équipe d'Annette Tardieu (Bonneté et coll., 1999; Tardieu et coll., 1999 ; Guilloteau, 1991) ont montré que l'addition de sels monovalents (NaCl, NaNO₃, NaSCN, AcNa) à pH 4,5 faisait progressivement passer les interactions entre protéines d'un régime répulsif à un régime attractif, trop important pour être dû à des interactions de Van der Waals. L'efficacité des anions à induire des interactions attractives suivait l'ordre inverse de la série Hofmeister. Cet effet, observé pour d'autres petites protéines comme les γ -cristallines (Finet, 1999) a été appelé « effet Hofmeister ». L'efficacité des anions à induire des interactions attractives suit l'ordre direct de la série Hofmeister lorsque la protéine est étudiée à un pH supérieur à son pI.

Muschol et Rosenberger (1995) ont confirmé les résultats obtenus par rayons X avec des expériences de diffusion quasi-élastique de la lumière sur le lysozyme, prouvant que les

changements de signaux observés correspondaient à un changement des interactions en solution et non à la formation d'agrégats.

L'effet Hofmeister reste toujours mal compris. De plus, il est relié à la taille des protéines en solution. Avec de grosses protéines comme l'urate oxydase (128 kDa) (Bonneté et coll., 2001), l'ATCase (306 kDa) (Budayova et coll., 1999) et les α -crystallines (800 kDa) (Finet, 1999), l'addition de sels provoque une diminution des interactions répulsives, sans parvenir à un régime globalement attractif.

5) *Attraction de déplétion*

L'addition de polyéthylène glycol (PEG) à une solution colloïdale induit une attraction entre colloïdes (Asakura et Oosawa, 1958; Poon et coll., 1996; Ye et coll., 1996; Lekkerkerker, 1997). Les propriétés des systèmes colloïdaux servent de base pour la compréhension de nombreux systèmes biologiques (Lekkerkerker, 1997 ; Mahadevan et Hall, 1990; Atha et Ingham, 1981; Bonneté et coll., 2001; Budayova et coll., 1999; Finet et Tardieu, 2001; Kulkarni et coll., 2000; Vivarès et Bonneté, 2002).

Asakura et Oosawa (1958) considéraient l'effet des polymères comme un potentiel de volume exclu. Le « mécanisme de déplétion » de Lekkerkerker (Lekkerkerker, 1997) considère les protéines (globulaires) comme des sphères de rayon R , et le polymère comme une sphère de rayon r_g (Figure III-1). Le centre de gravité des molécules de polymère ne peut pénétrer dans la couche d'épaisseur r_g entourant les protéines. Lorsque les particules sont éloignées les unes des autres, une pression osmotique uniforme est exercée sur elles. Lorsque les mouvements browniens les rapprochent, les molécules de polymère ne peuvent plus s'insérer entre les particules (région appelée zone de déplétion, correspondant à région hachurée sur la Figure III-1), et la pression osmotique, déséquilibrée, pousse les protéines les unes vers les autres pour réduire le volume d'exclusion. C'est le phénomène d' « attraction de déplétion ».

La portée de l'attraction est reliée à la taille et à la concentration du polymère. L'énergie correspondant à l'interaction de déplétion s'écrit (Asakura et Oosawa, 1958) :

$$\begin{aligned}
 U(r) &= \infty \text{ (provenant du potentiel de sphères dures) pour } r < R \\
 U(r) &= -\Pi_p V_{\text{déplétion}} \quad \text{pour } R < r < R + r_g \\
 U(r) &= 0 \quad \text{pour } r > R + r_g
 \end{aligned}$$

Eq. III-1

où r est la distance entre deux centres de colloïdes, Π_p est la pression osmotique exercée par les polymères, et $V_{\text{déplétion}}$ est le volume de la zone de déplétion.

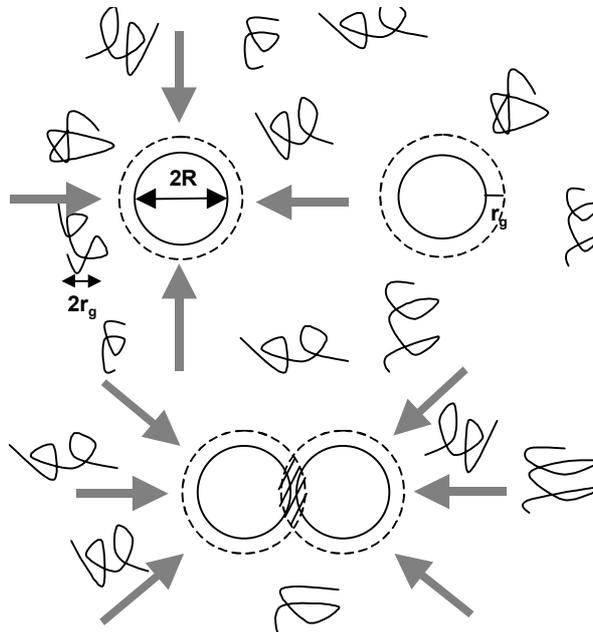


Figure III-1 : Mécanisme de déplétion. Les centres de gravité des molécules de polymère, de rayon r_g , ne peuvent entrer dans la région située entre les particules de rayon R , appelée zone de déplétion.

Les qualités précipitantes et non-dénaturantes du polyéthylène glycol (PEG), de formule $(-\text{CH}_2\text{OCH}_2-)_n$, ont été, et sont encore utilisées dans un but de purification des protéines et des virus (Hebert, 1963; Lucas et coll., 2001, ...). Pour les mêmes raisons, c'est un des agents cristallisants les plus utilisés.

6) Autres types d'interactions

Les autres types d'interactions qui sont mentionnés dans ce paragraphe interviennent dans les contacts entre les macromolécules, et semblent négligeables à grande distance. Elles sont mises en évidence dans les études cristallographiques.

Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires se forment sous l'effet d'interactions attractives, dues à des forces d'association. La notion de liaison hydrogène s'applique à une interaction de type principalement électrostatique, établie entre un groupement donneur de

protons (SH, NH, et OH) et des atomes électronégatifs voisins (O, N...). Les liaisons hydrogènes ($10-40 \text{ kJ mol}^{-1}$) sont vingt fois plus faibles que les liaisons covalentes, mais plus stabilisatrices que les interactions de Van der Waals ($1-4 \text{ kJ mol}^{-1}$).

L'hydratation : effets hydrophile et hydrophobe

L'hydratation consiste en une réorganisation de molécules d'eau à la surface d'une particule.

En présence d'un composé hydrophile, les molécules d'eau forment des liaisons hydrogènes entre elles et les macromolécules, sous l'influence de forces coulombiennes et de polarisation, créant à la surface des macromolécules une couche dite d'hydratation. Cette couche a une densité moyenne supérieure de 10 % à la densité du solvant (Svergun et coll., 1998). L'effet hydrophile peut être assimilé à une force répulsive entre macromolécules, provoquée par la structure de l'eau à leur voisinage.

Le terme d'hydrophobicité traduit la faible solubilité d'un composé dans un solvant aqueux, et l'effet hydrophobe apparaît comme une force attractive : les molécules neutres non polaires présentent une faible affinité pour l'eau car elles ne peuvent établir avec elle ni liaison hydrogène, ni interaction électrostatique. Elles ne présentent donc pas de couche d'hydratation, ce qui permet leur rapprochement, suffisant pour établir des liaisons attractives de type van der Waals. Les molécules d'eau, qui ne peuvent interagir avec la macromolécule hydrophobe, forment un réseau de liaisons hydrogènes entre elles, autour de la macromolécule (clathrates).

La nature attractive ou répulsive des interactions entre macromolécules en solution varie selon leur charge nette, qui dépend de la composition du solvant. Les interactions varient également selon la compacité des macromolécules : des molécules oligomériques sont moins compactes que les protéines globulaires monomériques. La diminution de la compacité provoque l'augmentation de la fraction de volume exclu de la protéine, c'est-à-dire une augmentation du potentiel de sphères dures, répulsif. Parallèlement, la contribution des interactions de Van der Waals, à courte portée,

diminue. C'est pourquoi dans le cas d'études de grosses macromolécules non compactes, les interactions de Van der Waals ne sont pas observables, et peuvent être négligées.

L'addition de sels provoque l'écrantage des charges et induit également des interactions attractives (effet Hofmeister). Cet effet est plus ou moins important selon le pH de la solution, le pI de la protéine et la nature des sels. Enfin, l'ajout d'un polymère non chargé induit une attraction de déplétion, dépendante de la taille du polymère.

III-B. Diagrammes de phases et cristallisation des macromolécules biologiques

La solubilité des macromolécules est directement reliée à la nature attractive ou répulsive des interactions en solution, la solubilité étant la concentration à laquelle les macromolécules se trouvent à un état d'équilibre thermodynamique entre la phase liquide et la phase solide. L'augmentation progressive des interactions attractives permet le passage d'un état liquide à un état solide, qui peut être amorphe ou cristallin. Cristalliser une protéine est un moyen d'accéder à sa structure.

La cristallographie reste la seule méthode permettant de déterminer la structure de grosses macromolécules. Plus de 80 % des structures répertoriées dans la Protein Data Bank (PDB) proviennent de la diffraction des rayons X. Pourtant, toutes les étapes de cristallisation ne sont pas maîtrisées, les conditions de cristallisation des protéines ne pouvant être définies de façon systématique. La cristallisation dépend des propriétés intrinsèques des macromolécules, comme leur repliement, leur charge ou leur hétérogénéité, et le processus de cristallisation lui-même dépend du pH, de la température et de la composition du solvant.

1) Solubilité des macromolécules

L'arrangement des macromolécules de façon périodique, à l'origine du phénomène de diffraction des rayons X, résulte d'une transition de phase : la molécule passe d'un état de soluté à un état solide, le cristal. La Figure III-1 représente le diagramme de phase d'une macromolécule en fonction de sa propre concentration et de celle d'un agent cristallisant.

Au niveau de la courbe de solubilité, le cristal et la solution sont en équilibre thermodynamique. La courbe de solubilité délimite la zone de sous-saturation de la zone de sursaturation. Dans la zone sous-saturée, la phase est soluble et les cristaux se redissolvent. Dans la zone sursaturée, la phase stable est solide (cristalline ou amorphe).

La zone de sursaturation est elle-même divisée en deux parties par la courbe de supersaturation : la zone de nucléation, qui permet la formation de noyaux de nucléation, et la zone métastable, qui permet la croissance de ces noyaux en cristaux, mais pas leur nucléation. L'arrêt de la croissance cristalline a lieu lorsque le système atteint son point d'équilibre, qui correspond dans le diagramme de phase à la courbe de solubilité.

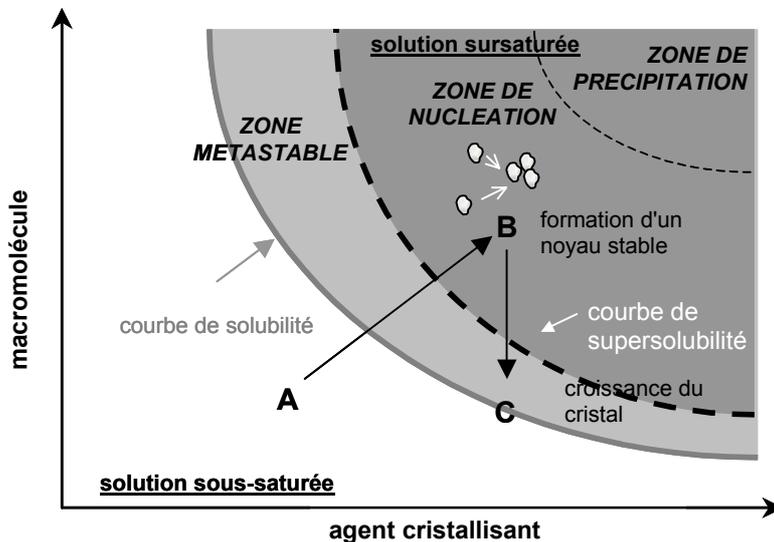


Figure III-1 : Diagramme de phases représentant la concentration en macromolécules en fonction de la concentration en agent cristallisant (d'après Ducruix et Giégé, 1992). La courbe de solubilité sépare la zone sous-saturée et la zone sursaturée, divisée elle-même en deux zones (métastable et nucléation/précipitation). Dans la zone sous-saturée, aucune nucléation ou croissance cristalline après ensemencement ne peut avoir lieu. Dans la zone métastable, la nucléation peut avoir lieu après une période très longue.

Le polyéthylène glycol (PEG) est un agent précipitant qui a la particularité d'induire une séparation de phase, la première étant enrichie en polymère, et la seconde en protéines (Finet et Tardieu, 2001 ; Tardieu et coll., 2002) (Figure III-2).

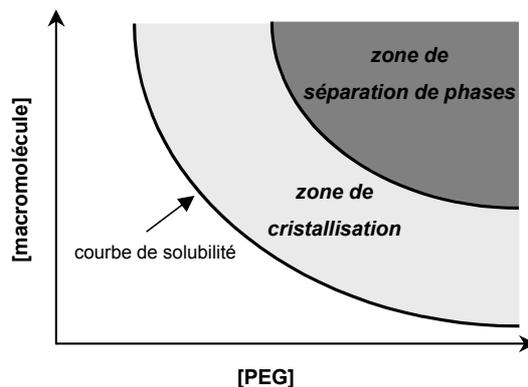


Figure III-2 : Diagramme de phase obtenu en présence de PEG. La séparation de phase a lieu entre une phase enrichie en PEG, et une phase enrichie en protéine.

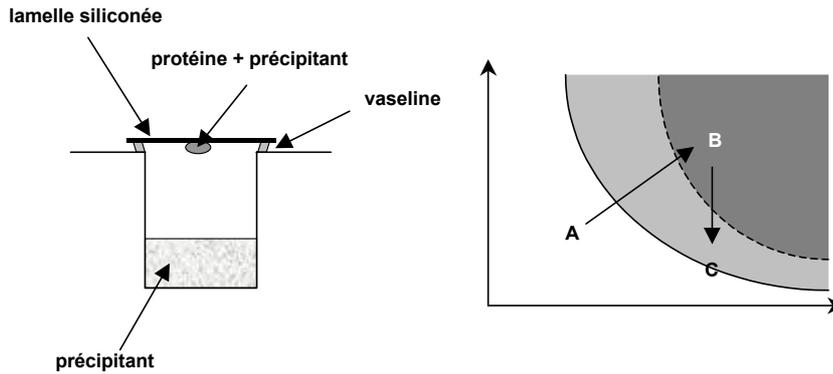
2) Méthodes de cristallisation

Le pouvoir diffractant d'un cristal dépend de la qualité de l'empilement des macromolécules, mais également de leur homogénéité. Les premiers facteurs limitants de la cristallisation sont donc la pureté de l'échantillon et la monodispersité des macromolécules, qui sont très sensibles aux protéases ou aux nucléases. Les contaminants peuvent interférer avec les molécules en cours de cristallisation et déranger leur agencement et leur cohésion. Enfin, les conditions de cristallisation doivent être compatibles avec la structure tridimensionnelle de la protéine.

Nous avons utilisé deux méthodes pour la cristallisation du BMV, qui sont détaillées dans la Figure III-1 :

- la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue, qui est la méthode la plus couramment utilisée en cristallisation, et qui est basée sur une augmentation progressive de la concentration en agent cristallisant dans la goutte de cristallisation. La concentration en agent précipitant est deux fois plus élevée dans le réservoir que dans la goutte au début de l'expérience.
- la technique du « microbatch », où la macromolécule est immédiatement en condition de sursaturation.

Diffusion de vapeur - goutte suspendue



Technique du micro-batch

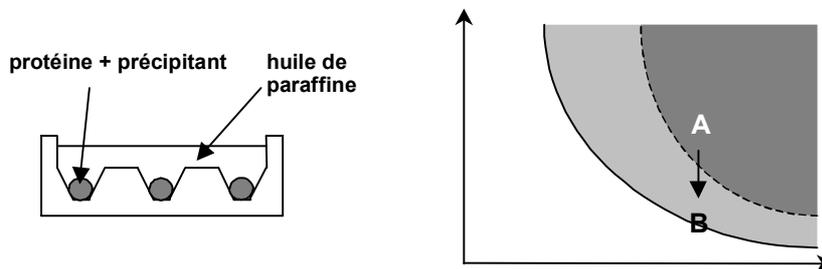


Figure III-1 : Méthodes de cristallisation employées.

- Diffusion de vapeur : La concentration en agent précipitant est plus élevée dans le puits que dans la goutte. Le volume de la goutte se réduit par évaporation et diffusion de l'eau, et sa concentration en agent précipitant et en protéine augmente. Le système tend vers l'équilibre (A→B). Au point B, les cristaux apparaissent, et appauvrissent le milieu en protéine, ramenant la concentration vers la courbe de solubilité (B→C). Nous avons utilisé des boîtes de 24 puits *Linbro*®.
- Microbatch : Les concentrations en protéine et en agent précipitant sont constantes. Dans la zone de sursaturation des cristaux peuvent apparaître, qui lorsqu'ils croissent appauvrissent la solution en protéines (A→B) . Nous avons utilisé des boîtes de 72 puits *Microbatch Hampton Research*®.

3) Nucléation

La nucléation est le processus par lequel les macromolécules en solution se rapprochent les unes des autres pour former, après un temps plus ou moins long, un agrégat stable ayant une structure répétitive. La croissance de cet agrégat, appelé noyau de nucléation ou noyau critique, est à l'origine du cristal (Figure III-1). Le phénomène de nucléation nécessite une sursaturation supérieure à celle nécessaire pour la croissance cristalline.

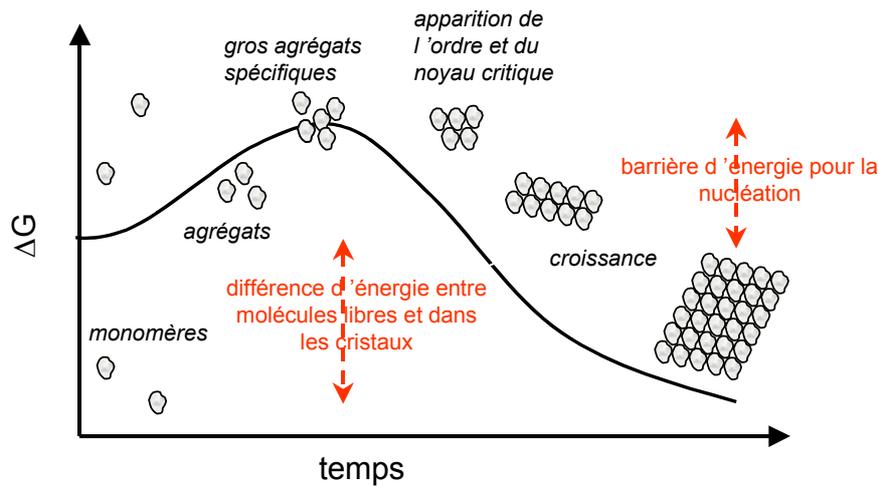


Figure III-1 : Nucléation et croissance cristalline (d'après McPherson, 1998). Dans des conditions de sursaturation, les molécules libres en solution ont un état énergétique plus haut que celui des molécules cristallisées. Le passage d'une forme à l'autre nécessite la formation d'un noyau critique ayant une énergie élevée. La hauteur de la barrière d'énergie qui doit être passée détermine la vitesse du processus.

La croissance des cristaux de macromolécules obéit aux mêmes règles que celles des petites molécules (Boistelle et Astier, 1988). La force motrice de cristallisation est la différence de potentiel chimique entre la solution sursaturée et la solution saturée. En notant C la concentration avant toute cristallisation dans la zone sursaturée et C_s la concentration à l'équilibre, c'est-à-dire la solubilité, cette différence s'écrit :

$$\Delta\mu = k_B T \ln(C / C_s) \quad \text{Eq. III-1}$$

où k_B est la constante de Boltzmann et T la température absolue. La sursaturation σ peut s'écrire de la façon suivante (Boistelle et Astier, 1988; ten Wolde et Frenkel, 1997) :

$$\sigma = \ln \beta = \frac{\Delta\mu}{k_B T} \quad \text{avec} \quad \beta = \frac{C}{C_s} \quad \text{Eq. III-2}$$

La formation de noyaux peut avoir lieu lorsque la valeur de σ est suffisamment élevée. La nucléation est appelée homogène lorsqu'elle a lieu librement dans le solvant, et hétérogène lorsqu'elle a lieu sur un substrat solide.

La formation d'un noyau de nucléation nécessite une énergie libre d'activation :

$$\Delta G = -\frac{V}{\Omega} k_B T \sigma + S\gamma \quad \text{Eq. III-3}$$

où Ω est le volume de la molécule dans le cristal, et γ l'énergie libre d'interface entre le noyau et la solution. $S\gamma$ représente l'énergie dépensée pour la création de la surface du noyau.

En considérant que le noyau est sphérique, l'équation III-11 devient :

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3\Omega} k_B T \sigma + 4\pi r^2 \gamma \quad \text{Eq. III-4}$$

La probabilité qu'un noyau puisse générer un cristal dépend de sa taille. Ainsi, la formation d'un noyau critique de forme sphérique, composé d'un minimum de particules, est caractérisé par la valeur de son rayon critique R_c , dépendant lui-même de la saturation du milieu. Plus la sursaturation est élevée, et plus le rayon du noyau est petit. Le noyau aura tendance à se dissoudre s'il perd une molécule, ou au contraire à croître s'il en gagne une :

$$R_c = \frac{2\Omega\gamma}{k_B T \sigma} \quad \text{Eq. III-5}$$

et l'énergie d'activation devient : $\Delta G_c = \frac{1}{3}(4\pi R_c^2 \gamma)$, soit le tiers de l'énergie nécessaire à la création de sa surface.

Des simulations informatiques ont introduit la notion de point métastable critique dépendant d'une température critique T_c où la barrière d'énergie est la plus faible pour la nucléation (Talanquer et Oxtoby, 1998; ten Wolde et Frenkel, 1997; Oxtoby, 1998). Autour de ce point, le noyau critique consisterait en l'association désordonnée de plusieurs molécules, et la cristallinité apparaîtrait au cours de la croissance. Lorsque l'on s'éloigne de T_c , la barrière d'énergie augmente, mais si la nucléation a lieu, les noyaux ont la même organisation que les futurs cristaux.

Récemment, des expériences de microscopie à force atomique sur la formation de cristaux d'apoferritine, une protéine de 130 Å de diamètre, ont montré que les noyaux critiques n'étaient pas de forme sphérique mais de forme plane, constitués de quelques rangées de molécules, ayant le même arrangement que dans le cristal (Yau et Vekilov, 2000b; Yau et Vekilov, 2001).

4) Croissance cristalline

Une fois le noyau critique formé, la cinétique de croissance du cristal est directement reliée à la sursaturation du milieu. La microscopie à force atomique (ou AFM, pour Atomic Force Microscopy), est maintenant l'outil le plus utilisé pour étudier les cinétiques de croissance des cristaux macromoléculaires en temps réel et l'incorporation de défauts dans le

système cristallin. Cette technique est non destructive, contrairement aux méthodes utilisant les rayons X. Elle est fondée sur la mesure des forces d'interaction entre une pointe atomique et les atomes à la surface du cristal.

Quatre mécanismes de croissance sont fréquemment observés (Mc Pherson, 1999, McPherson et coll., 2000) :

- Nucléation bidimensionnelle : des noyaux bidimensionnels (« îlots ») se forment à la surface du cristal, et croissent de façon latérale pour former des terrasses. Ce mécanisme est prédominant à haute sursaturation.
- Croissance en spirale : la croissance en dislocation spirale a lieu à faible sursaturation. Elle se fait à partir des défauts présents à la surface du cristal.
- Croissance « normale » : la croissance se fait par l'addition aléatoire de macromolécules isolées à la surface du cristal, à grande sursaturation.
- Addition de noyaux tridimensionnels : ce type de croissance correspond à l'adsorption de noyaux tridimensionnels sur la surface, et conduit souvent à des défauts dans le cristal. Elle a lieu à moyenne et haute sursaturation.

La stabilité des cristaux est assurée par des liaisons impliquant la reconnaissance de petites portions des surfaces des macromolécules. Ces liaisons sont faibles, de type liaisons hydrogènes, contacts de van der Waals, empilement des cycles aromatiques (« stacking ») et ponts salins, selon le pH et la composition du solvant. Les espaces entre molécules sont comblés par les molécules de solvant, qui représentent entre 20 et 80 % du cristal, ce qui explique la fragilité des cristaux.

En général, la croissance d'un cristal ne se fait pas suivant un seul mécanisme. L'AFM a montré que différents mécanismes peuvent être utilisés sur différentes faces, ou il peut y avoir compétition entre plusieurs mécanismes sur une même face (Malkin et coll., 1995a). L'équipe de McPherson s'est particulièrement intéressée à la croissance des cristaux de virus, dont la forme, la grande taille et la simplicité des géométries d'assemblage en font des modèles idéaux d'études par AFM. La croissance des cristaux de virus se fait par nucléations bi- et tridimensionnelles (pour le STMV, Malkin et coll., 1995b). Il semblerait que dans le cas de grosses macromolécules comme les virus, la nucléation soit préférentiellement tridimensionnelle (McPherson et coll., 2000). Elle proviendrait soit de l'adsorption de microcristaux déjà formés en solution, soit de la sédimentation à la surface du cristal de gouttelettes hypersaturées en virus. Le réseau de la surface existante guiderait l'arrangement des virus de la goutte. L'équipe de Mc Pherson favorise la seconde hypothèse, car

l'arrangement cristallin est parfait, et l'adsorption de microcristaux introduit généralement des défauts dans les cristaux.

III-C. La diffusion des rayons X aux petits angles

L'étude des interactions entre particules virales en solution a été réalisée par diffusion des rayons X aux petits angles. La théorie de la diffusion des rayons X présentée ci-après s'inspire principalement de l'article de P. Vachette et Svergun (Vachette et Svergun, 2000) et de la thèse de S. Finet (Finet, 1999).

1) Principe

Les rayons X sont diffusés par les électrons des molécules en solution. Seuls les électrons diffusent les rayons X en raison de leur très petite masse. Nous n'avons considéré que la diffusion élastique, c'est-à-dire une diffusion sans changement de la longueur d'onde λ ni aucun échange d'énergie entre le photon et l'électron.

Le vecteur de diffusion \vec{s} est défini par la relation suivante : $\vec{s} = \vec{s}_1 - \vec{s}_0$, où \vec{s}_0 est le vecteur du faisceau incident et \vec{s}_1 est le vecteur de l'onde diffusée (Figure III-1). Le module de \vec{s} peut s'écrire :

$$s = |\vec{s}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \cong \frac{2\theta}{\lambda} \quad \text{Eq. III-1}$$

où 2θ est l'angle de diffusion et λ la longueur d'onde du faisceau incident.

L'amplitude du signal diffusé correspond à la transformée de Fourier de la distribution de la densité électronique $\rho(r)$ de la particule :

$$F(s) = \int_{V_r} \rho(r) e^{-2\pi i r \cdot s} dV_r \quad \text{Eq. III-2}$$

où V_r est le volume de l'échantillon.

L'intensité diffusée $I(s)$ par une seule particule est appelée le « facteur de forme » de la particule.

$$I(s) = F(s)^2 \quad \text{Eq. III-3}$$

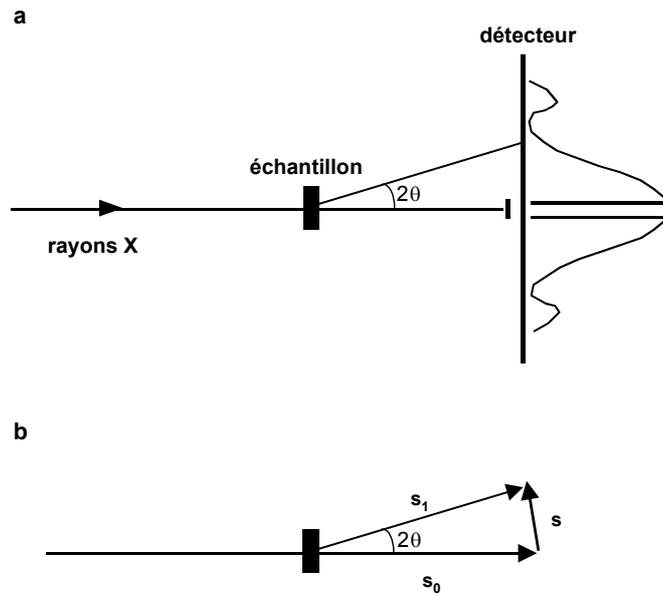


Figure III-1 : Principe de la diffusion des rayons X aux petits angles (d’après Vachette et Svergun, 2000).

(a) Dispositif expérimental.

(b) Diffusion des rayons X par l’échantillon. s_0 est le vecteur du faisceau incident ($s_0 = 1/\lambda$), s_1 le vecteur diffusé par l’échantillon, et \bar{s} le vecteur de diffusion ($|\bar{s}| = 2 \cdot \sin\theta/\lambda \approx 2\theta/\lambda$).

Le signal obtenu provient en fait du contraste de la densité électronique $\Delta\rho(r)$ entre la particule ($\rho(r)$) et le solvant (ρ_0) (Figure III-2). Cette diffusion n’est significative qu’aux petits angles. Au-delà, le rapport signal/bruit est trop faible.

$$\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho_0 \tag{Eq. III-4}$$

$$F(s) = \int_{V_r} \Delta\rho(r) e^{-2\pi i r \cdot s} dV_r \tag{Eq. III-5}$$

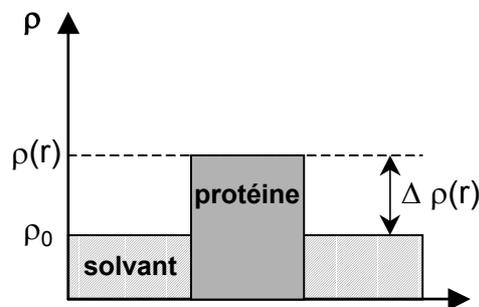


Figure III-2 : Contraste de densité électronique $\Delta\rho(r)$ d’une protéine dans un solvant de densité constante ρ_0 .

Les (macro)molécules biologiques étant faites d'atomes légers, c'est à dire de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote, elles produisent un faible contraste de densité électronique et ont donc un faible pouvoir diffusant. De plus, les molécules en solution subissent les lois du mouvement Brownien, c'est-à-dire qu'elles peuvent prendre toutes les orientations (isotropie). Le signal observé est donc la moyenne sphérique de l'intensité diffusée. C'est cette intensité, moyennée sphériquement par rapport à l'angle solide Ω , qui est accessible expérimentalement :

$$I(s) = \langle I(s) \rangle = \frac{2}{s} \int_0^{\infty} r p(r) \sin(2\pi r s) . dr \quad \text{Eq. III-6}$$

où $p(r)$ est la distribution de paire ou fonction de distribution des distances r entre deux atomes. Pour des particules homogènes ayant une densité constante, $p(r)$ est l'histogramme des distances entre toutes les paires de points de l'échantillon.

$$p(r) = \frac{2}{r} \int_0^{\infty} s . I(s) \sin(2\pi r s) ds \quad \text{Eq. III-7}$$

La fonction de Patterson $P(r)$ est reliée à $p(r)$ de la façon suivante :

$$P(r) = \frac{1}{r^2} p(r) \quad \text{Eq. III-8}$$

2) *Facteur de forme et facteur de structure*

Diffusion par une solution idéale

Dans le cas d'une solution « idéale », c'est-à-dire en absence d'interactions, et « monodisperse », c'est-à-dire composée de particules identiques (monomériques ou oligomériques), chaque particule diffuse les rayons X de façon indépendante. L'intensité diffusée par l'échantillon est la somme des contributions de chacune d'elles :

$$I(s) = N . i(s) \quad \text{Eq. III-1}$$

où N est le nombre de particules dans l'échantillon et $I(s)$ le facteur de forme de la particule.

Diffusion par une solution de particules

Dans le cas de solutions concentrées monodisperses, il faut tenir compte des interférences entre les ondes diffusées par les macromolécules. L'échantillon peut être décrit comme étant le produit de convolution de la particule par la distribution spatiale des particules en solution. L'intensité $I(c,s)$ diffusée par une solution concentrée sera le produit du facteur de forme idéal $I(s)$ (le signal diffusé par une particule unique), modulé par un terme d'interférence qui dépend de la distribution des particules en solution, appelé « facteur de structure » ou $S(c,s)$ (Figure III-1) :

$$I(c,s) = I(s).S(c,s) \quad \text{Eq. III-1}$$

La distribution des molécules dépend de la nature, attractive ou répulsive, des interactions en solution (Figure III-1). Dans le cas d'interactions répulsives, les particules sont réparties de façon uniforme, et l'intensité près de l'origine ($\theta \approx 0^\circ$) décroît avec l'augmentation de la concentration. Dans le cas d'interactions attractives, on observe des fluctuations dans la répartition des molécules, ce qui conduit à une augmentation de $I(c,0)$ avec l'augmentation de la concentration.

Expérimentalement, on peut approcher d'une solution idéale en la diluant à l'infini, et obtenir le facteur de forme $I(0,s)$. L'équation III-23 s'écrit alors (Tardieu, 1994) :

$$I(c,s) = I(0,s).S(c,s) \quad \text{Eq. III-2}$$

Le facteur de structure est la transformée de Fourier de la moyenne sphérique de la fonction de distribution de paire $p(r)$, qui traduit la probabilité de trouver deux particules séparées par la distance r . Il est obtenu par la division de l'intensité diffusée par le facteur de forme. La valeur de $S(c,s)$ tend vers 1 aux grands angles. Aux très petits angles, il est inférieur à 1 si les interactions en solution sont répulsives, et supérieur à 1 si les interactions sont attractives (Figure III-1).

Il faut noter que lorsque la concentration en macromolécules augmente, seul le facteur de structure est modifié ; le facteur de forme reste constant. Lorsque les conditions physico-chimiques sont modifiées, on peut alors observer une modification du

facteur de forme provenant de modifications structurales des molécules (dénaturation, oligomérisation, ...).

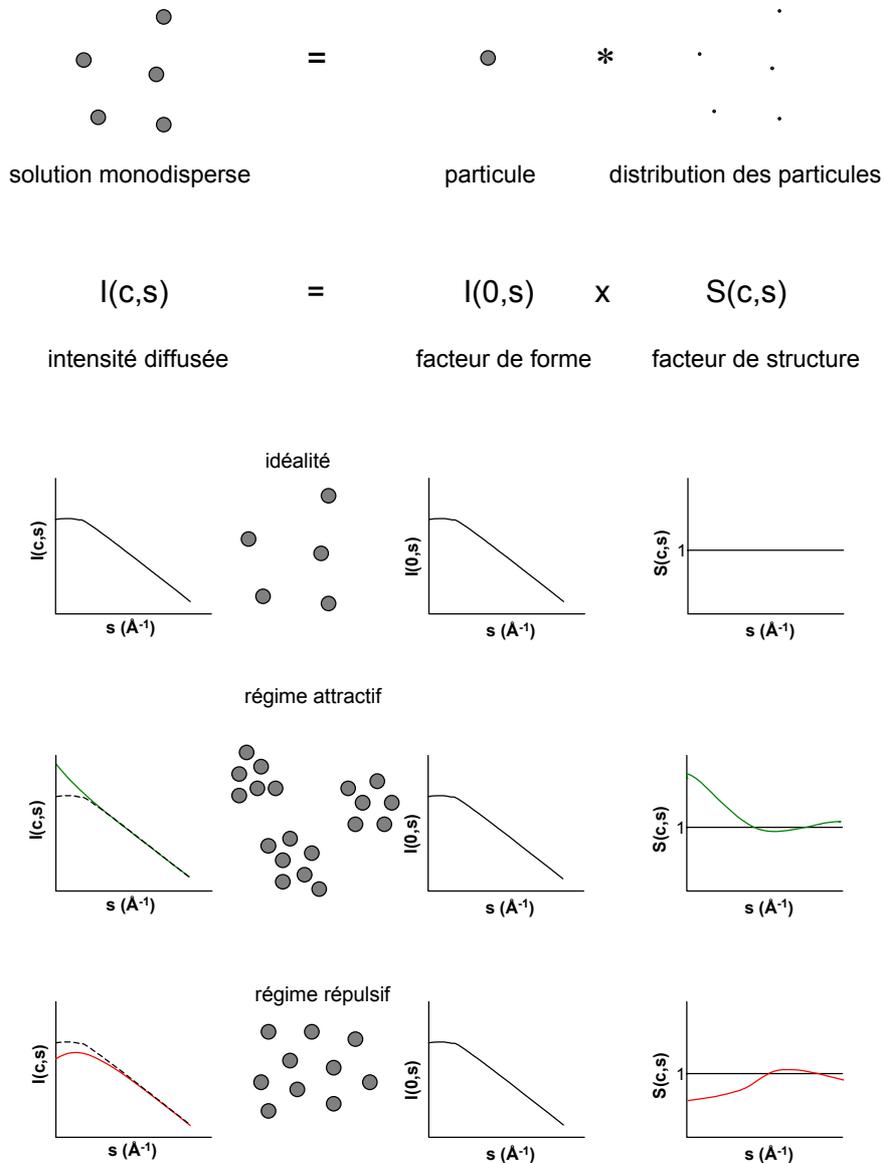


Figure III-1 : Composition du signal de l'intensité diffusée par une solution de molécules. La forme du signal de l'intensité diffusée $I(c,s)$ est le produit du facteur de forme d'une molécule unique $I(0,s)$ par le facteur de structure $S(c,s)$ qui caractérise la répartition des molécules en solution, et qui rend compte de la nature des interactions. $S(c,s)$ tend vers 1 aux grands angles. Aux très petits angles, il est inférieur à 1 si les interactions en solution sont répulsives, et supérieur à 1 si les interactions sont attractives.

Calcul de modèles de diffusion théoriques

La forme sphérique du BMV permet de comparer les facteurs de forme déterminés expérimentalement avec des signaux théoriques calculés pour la diffusion de sphères.

Dans le cas d'une sphère pleine de rayon R , la densité électronique ρ_u est uniforme. Dans ce cas, l'équation III-18 devient :

$$F(s) = \frac{2}{s} \int_0^R \rho_u r \sin(2\pi r s) . dr \quad \text{Eq. III-1}$$

En posant $U=2\pi R s$ on trouve

$$F(s) = \frac{2\rho_u}{4\pi^2 s^3} (\sin U - U \cos U) \quad \text{Eq. III-2}$$

$$F(s) = 3F(0)(\sin U - U \cos U) / U^3 \quad \text{Eq. III-3}$$

où $F(0) = \frac{4}{3} \pi R^3 \rho_u$.

Des études de diffusion des rayons X et des neutrons ont révélé que le BMV est composé de couches plus ou moins denses de protéines, de protéines complexées à l'ARN, ou d'ARN seul, entourant un centre « creux » (Anderegg et coll., 1963 ; Jacrot et coll., 1977; Zulauf et coll., 1983). La détermination de la structure du BMV par cristallographie confirme encore cette structure creuse (Lucas et coll., 2002).

La diffusion des rayons X ne permet pas de distinguer le signal des protéines de celui de l'ARN, mais rend compte de l'absence de matière au centre des particules virales. Le BMV ne doit donc pas être modélisé comme une sphère pleine, mais comme une sphère creuse, caractérisée par les valeurs de son rayon externe R_{ext} et de son rayon interne R_{int} . En utilisant l'équation III-16, nous avons pu modéliser l'intensité théorique $I(s)_{\text{théo}}$ diffusée par une sphère creuse de la façon suivante:

$$I(s)_{\text{theo}} = (F_{\text{ext}}(s) - F_{\text{int}}(s))^2 \quad \text{Eq. III-4}$$

où $F_{\text{ext}}(s)$ correspond à une sphère de rayon R_{ext} modélisant la capsid virale, et $F_{\text{int}}(s)$ correspond à une sphère de rayon R_{int} modélisant le lumen.

Diffusion par un échantillon constitué de deux phases

Lorsqu'un échantillon est composé de deux espèces, l'intensité diffusée devient :

$$I(c, s) = \sum_i \sum_j \sqrt{c_i c_j} \sqrt{I_i(0, s) . I_j(0, s)} . S_{ij}(s) \quad \text{Eq. III-1}$$

où i et j correspondent aux deux espèces, et $S_{ij}(s)$ sont les facteurs de structure partiels (Guinier et Fournet, 1955).

L'intensité à l'origine est proportionnelle à la masse moléculaire des objets en solution. Dans les expériences où les deux espèces en solution sont le BMV et le PEG, la contribution du PEG au signal de diffusion peut donc être négligée, car le virus est de 230 à 1500 fois plus gros que le PEG, et on retrouve l'équation III-23.

Les échantillons précipités de BMV obtenus par ajout de PEG sont composés de deux phases contenant du virus : une phase liquide de volume V_{liquide} enrichie en PEG, contenant une faible concentration de BMV sous sa forme soluble, et une phase solide de volume V_{solide} contenant le virus précipité, appauvrie en PEG. L'équation III-29 s'écrit alors :

$$I(c, s) = \left(\frac{c_s V_{\text{liquide}}}{V}\right) \cdot I(0, s) \cdot S_s(c_s, s) + \left(\frac{c_c V_{\text{solide}}}{V}\right) \cdot I(0, s) \cdot S_c(c_c, s) \quad \text{Eq. III-2}$$

où c_s et c_c sont les concentrations en virus dans leur état soluble et cristallin respectivement, avec $cV = c_s V_{\text{liquide}} + c_c V_{\text{solide}}$. Les deux phases évoluent au cours du temps. On considérera que $S_s(c_s, s)$ est égal à 1, excepté aux plus petits angles.

Dans le cas du BMV, l'échantillon précipité en présence de PEG est microcristallin. $S_c(c_c, s)$ correspond au facteur de structure du microcristal. Les maxima d'intensité diffractée peuvent être comparés à des fonctions de Dirac δ_{hkl} convolués par le facteur de forme FF_{cristaux} des microcristaux. L'intensité $I(c, s)$ s'écrit alors :

$$I(c, s)_{(t)} = (c_s V_{\text{liquide}}(t)/V) \cdot I(0, s) + \alpha(t) (\delta_{hkl} * FF_{\text{cristal}}(t)) |F|^2(hkl) (cV - c_s V_{\text{liquide}}(t)/V_{\text{solide}}) \cdot I(0, s) \quad \text{Eq. III-3}$$

où α est le pouvoir diffractant des microcristaux, qui varie en fonction de leur taille.

Diffraction des rayons X

Pour qu'il y ait diffraction des rayons X par un cristal, il faut que les ondes réfléchies sur les plans parallèles passant par les nœuds du réseau cristallin (ou « plans réticulaires ») interagissent de façon constructive. La différence de marche entre les plans doit être un multiple de la longueur d'onde λ du rayon incident. Cette condition est appelée loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \text{Eq. III-1}$$

où θ est l'angle d'incidence du faisceau incident par rapport aux plans réticulaires, et n est un entier (Figure III-1).

L'intensité diffractée dans une direction (h,k,l) est directement reliée au facteur de structure F_{hkl} du cristal :

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2 \quad \text{Eq. III-2}$$

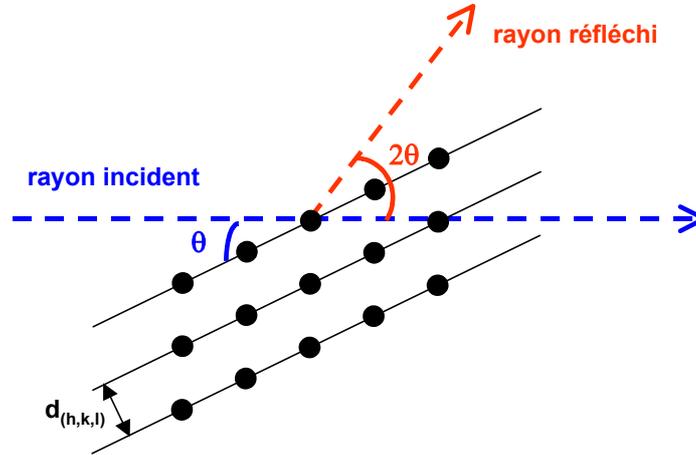


Figure III-1 : Diffraction des rayons X. Les plans réticulaires d'un cristal, séparés par une distance d , sont indexés par h , k et l (indices de Miller). L'angle de diffraction, défini comme l'angle entre le faisceau incident et le faisceau diffracté, est égal à 2θ .

La norme du vecteur de diffusion \vec{s} d'une réflexion correspond à la résolution de la réflexion. Les coordonnées de \vec{s} dans le réseau réciproque sont les indices de Miller de la famille de plans réticulaires qui lui est associée. La loi de Bragg relie la résolution s à la distance d des plans réticulaires et à l'angle de diffusion 2θ , et permet d'indexer les pics de diffraction. On a la relation :

$$s = \frac{1}{d} = \sqrt{\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}} \quad \text{Eq. III-3}$$

lorsque le système est orthorombique ou cubique (angles de la maille $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) et où a , b et c sont les longueurs des côtés de la maille cristalline.

3) Dispositif expérimental

Ligne D24 au LURE, Orsay

La totalité des expériences présentées dans le Chapitre IV a été effectuée au Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique (LURE), à Orsay, en collaboration avec Javier Perez et Patrice Vachette.

L'anneau de stockage DCI, alimenté par un accélérateur linéaire, le LINAC, a une énergie de 1,85 GeV. La ligne D24, qui restitue une énergie de 6,5 à 10 KeV, est dédiée à la diffusion des rayons X aux petits angles. Sur cette ligne le monochromateur (un cristal de germanium) permet de sélectionner une longueur d'onde de 1,488 Å (raie d'absorption K du nickel), et focalise le faisceau dans le plan horizontal. Le détecteur est un compteur à gaz (Xe 90 %, C₂H₆ 10 % sous une pression de 2 bars). Le rayonnement parasite autour du faisceau monochromatique est éliminé grâce à un système de fentes horizontales et verticales. L'appareillage est sous vide entre le monochromateur et le détecteur, et les échantillons sont injectés dans un capillaire en quartz thermostaté par circulation d'eau et sous vide conçu au LURE (Dubuisson et coll., 1997) qui peut être rincé et séché *in situ*. Le signal est traité par un montage électronique CAMAC relié à un PC, qui pilote également l'expérience.

Pour éviter la saturation du détecteur, nous avons réduit la taille du faisceau en ajoutant une fente verticale de 2 mm d'épaisseur aux plus grandes concentrations de virus, pour lesquelles le signal diffusé est le plus fort. Aux concentrations plus faibles, nous avons utilisé une fente de 4 mm.

Selon les expériences, la distance entre l'échantillon et le détecteur était de 2,641 m ou de 1,891 m. Le domaine de s accessible était d'environ 1.10^{-3} à $4,5 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$.

a) Traitement des données brutes

L'enregistrement des données de l'intensité diffusée par un échantillon consiste en l'acquisition de plusieurs spectres de même durée, qui sont ensuite normés par rapport à l'intensité transmise, et moyennés pour obtenir une meilleure statistique. Cette méthode permet de détecter une dégradation éventuelle de l'échantillon au cours du temps. Dans le cas d'échantillons très concentrés, le temps d'acquisition totale peut être n fois inférieur au temps d'acquisition d'un échantillon n fois moins concentré. Par exemple, pour certaines expériences, le temps d'exposition total pour un échantillon à 40 mg/ml de BMV était de 30 s (1 x 30 s), et de 240 s (8 x 30 s) pour un échantillon à 5 mg/ml.

Le signal correspondant au tampon, enregistré séparément, est ensuite soustrait à l'intensité moyennée du signal de diffusion de l'échantillon, qui correspond à l'intensité diffusée par la protéine et le solvant (voir la Figure III-2). On ne garde ainsi que la contribution des protéines au signal. Il faut prendre également prendre en compte l'absorption

de l'intensité incidente d'un solvant très concentré en sel ($> 0,5 \text{ M}$) lors d'expériences de diffusion.

La mesure de l'intensité diffusée par des échantillons faiblement concentrés permet d'accéder aux facteurs de forme des protéines, et la mesure à partir d'échantillons de plus en plus concentrés permet de déterminer la nature des interactions en solution. La diminution de l'intensité diffusée lorsque la concentration en protéines augmente est caractéristique d'interactions répulsives ; si l'intensité augmente avec la concentration, les interactions sont globalement attractives.

La normalisation des données est faite soit en divisant les données par leur propre concentration en virus dans le cas des séries en concentration (5 à 40 mg/ml), soit en les normalisant par rapport à un facteur de forme constant (en général le facteur de forme obtenu à pH 4, sans ajout d'agent précipitant) dans le cas de séries à concentration constante en virus, mais obtenues dans des conditions physico-chimiques différentes.

b) Extrapolation à l'origine

Un cache, ou « beamstop », est utilisé pour éviter au détecteur d'être exposé au faisceau direct des rayons X non diffusés. Les valeurs de l'intensité diffusée tout près de l'origine (jusqu'à $0,001 \text{ \AA}^{-1}$) ne sont donc pas accessibles expérimentalement. L'extrapolation de l'intensité à l'origine $I(0,0)$ peut nous permettre d'accéder à trois données :

- la valeur du rayon de giration R_g .
- la nature des interactions en solution grâce à la détermination du second coefficient du viriel.
- la valeur de la masse moléculaire des particules en solution, car

$$I(0,0) = m(1 - \rho_0 \Psi)^2 \quad \text{Eq. III-1}$$

où m est le nombre moyen d'électrons par particule, ρ_0 la densité électronique en \AA^3 et Ψ le volume spécifique partiel de la molécule en $\text{\AA}^3/\text{électron}$. La masse moléculaire du BMV est déjà connue ($4,5 \cdot 10^6 \text{ Da}$).

Guinier et Fournet ont montré que dans le cas de solutions diluées idéales l'intensité $I(0,s)$ peut être développée près de l'origine par l'expression suivante (Guinier et Fournet, 1955) :

$$I(0,s) = I(0,0) \exp\left(-\frac{4}{3} \pi^2 R_g^2 s^2\right) \quad \text{Eq. III-2}$$

où R_g est le rayon de giration de la particule, défini comme étant la moyenne quadratique des distances de tous les points de la particule à son centre de gravité, pondérée par la masse électronique de chaque élément de volume. On utilisera une représentation linéaire, ou «tracé de Guinier », $\ln I(s) = f(s^2)$, pour déterminer $I(0,0)$ par extrapolation, et R_g à partir de la pente. Dans le cas de particules sphériques, l'approximation de Guinier est valable pour $2\pi R_g s < 1$.

Pour calculer les valeurs de $I(0,s)$, nous avons effectué une approximation linéaire des tracés de $\frac{1}{I(c,s)} = f(c)$ (« tracé de Zimm ») pour les 16 premières valeurs de s . Nous n'avons utilisé que les données obtenues avec les échantillons à 5 et 10 mg/ml, car aux plus hautes concentrations l'effet des interactions est trop important. Les valeurs obtenues ont été utilisées pour le tracé de Guinier. Nous avons déterminé le facteur de forme pour chaque condition en complétant les valeurs de $I(0)$ et les 16 valeurs de $I(0,s)$ avec les signaux diffusés par les échantillons contenant 40 mg/ml de BMV, à partir de $s = 0,0035 \text{ \AA}^{-1}$, où le rapport signal/bruit aux plus grands angles est le meilleur.

Dans le cas de solutions concentrées et en présence d'interactions attractives ou faiblement répulsives, $I(c,0)$ peut être déterminée de la façon suivante par extension de l'équation III-36 :

$$I(c,s) = I(c,0) \exp\left(-\frac{4}{3} \pi^2 R_{ga}^2 s^2\right) \quad \text{Eq. III-3}$$

où R_{ga} est le rayon de giration apparent, qui dépend à la fois de la forme de la particule et des interactions.

L'équation III-23 peut s'écrire :

$$I(c,0) = I(0,0).S(c,0) \quad \text{Eq. III-4}$$

c) Coefficient du viriel

La pression osmotique Π d'une solution dépend de la distribution des molécules. En l'absence d'interactions, $\Pi = \rho kT$, où ρ est la densité en molécules, k est la constante de Boltzmann, et T la température absolue. Dans le cas d'interactions en solution, la pression osmotique peut se développer suivant les puissances de la densité de particules ρ par cm^3 .

$$\Pi / \rho kT = 1 + B_2 \rho + B_3 \rho^2 + \dots \quad \text{Eq. III-1}$$

où B_2 est le second coefficient du viriel, B_3 le troisième coefficient etc... Le coefficient B_2 permet de déterminer de façon directe la nature des interactions en solution : s'il est positif, les interactions sont répulsives. S'il est négatif, les interactions sont attractives.

On écrit généralement ρ en fonction de la concentration c (en g.cm^{-3}) grâce à la relation $\rho = cN_a / M$ (M est la masse moléculaire en Da, et N_a le nombre d'Avogadro) :

$$\Pi / cRT = 1 + A_2Mc + A_3Mc^2 + \dots \quad \text{Eq. III-2}$$

avec R la constante des gaz parfaits, et $A_2 = B_2N_a/M^2$ (en mol.ml.g^{-2}).

La valeur du facteur de structure à angle nul, $S(c,0)$ obtenu par diffusion des rayons X permet d'accéder à la valeur de A_2 , car il est relié à la pression osmotique :

$$S(c,0) = (RT / M)(\partial\Pi / \partial c)^{-1} \quad \text{Eq. III-3}$$

$$\frac{1}{S(c,0)} = 1 + 2B_2\rho = 1 + 2MA_2c \quad \text{Eq. III-4}$$

Grâce à des expériences de diffusion de la lumière, George et Wilson (George et Wilson, 1994) ont défini un domaine de B_2 pour lequel la cristallisation des protéines peut avoir lieu compris entre -10^{-4} et $-8.10^{-4} \text{ mol.ml.g}^{-2}$. Ils ont pour cela étudié, pour des conditions de cristallisation variées, des protéines de tailles différentes allant du lysozyme (14,6 kDa) ($B_2 = -3.10^{-4} \text{ mol.ml.g}^{-2}$) au Virus Satellite de la Mosaïque du Tabac (STMV) ($8,4.10^6 \text{ Da}$).

Pour le STMV, B_2 était très faiblement négatif, d'une valeur de $-1,8.10^{-4} \text{ mol.ml.g}^{-2}$

Ligne ID2, à l'ESRF (Grenoble)

Nous avons obtenu du temps de faisceau sur la ligne ID2, à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble. Cette ligne est caractérisée par sa haute brillance, qui est de 10^{13} photons/seconde au niveau de l'échantillon pour une taille de faisceau de 0.3 mm par 0.8 mm. L'énergie est de 12.5 KeV, ce qui correspond à longueur d'onde λ de 1 Å. De plus, et ce qui était le plus intéressant dans le cadre de nos études, cette ligne est équipée d'un appareillage de mélange rapide ou « stopped-flow » (Bio-Logic™). Cet appareil est composé de trois seringues, contenant le tampon de dilution (20 mM AcNa, pH 5,9), le

polyéthylène glycol, et le virus. Un logiciel (Bio-Logic™) permet de piloter le stopped-flow de l'extérieur, afin de mélanger des volumes précis de chaque seringue et d'obtenir les premiers signaux quelques millisecondes seulement après le mélange. Le volume des échantillons était de 80µl, excepté aux plus petites concentrations en virus où le volume était doublé. Les données ont été enregistrées dans un domaine de s compris entre $1.17 \cdot 10^{-3}$ to $3.50 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$. Le pas entre deux canaux était de $0.0865 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$.

La séquence d'acquisition suivait la formule :

$$x_i = x_{i-1} + dt \cdot dc^{i-1} + lt \cdot lc^{i-1} \quad \text{Eq. III-1}$$

où x est le temps après le mélange, x_{i-1} est égal à dt_0 , dt est le temps de pause, lt est le temps d'acquisition, dc le coefficient du temps de pause et lc le coefficient du temps d'acquisition. La valeur $x_0 = dt_1 + lt$ était, selon les échantillons, de 0.006 seconde (délai correspondant à l'ouverture de l'obturateur rapide de faisceau (ou FBS, pour fast beam shutter)) ou de 0.010 seconde.

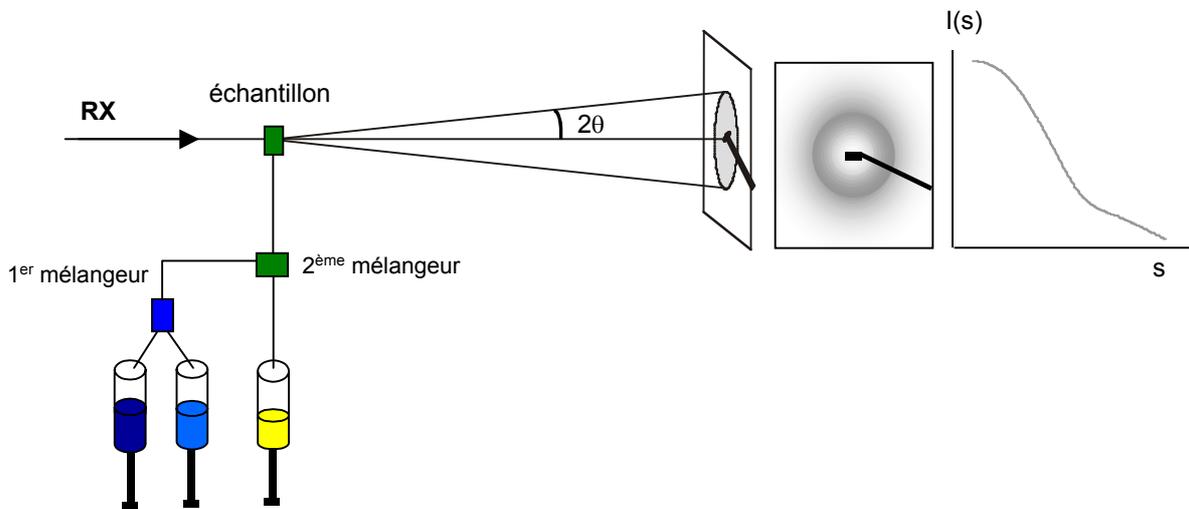


Figure III-1 : Couplage de l'appareillage de diffusion des rayons X aux petits angles et d'un appareil à mélange rapide (« stopped-flow »). Les trois seringues sont pilotées indépendamment. L'acquisition des données est synchronisée à l'arrivée du mélange (échantillon) dans la cuve, qui est un capillaire en quartz (diamètre d'1,5 mm, épaisseur de 10 µm).

Le montage DXPA utilise un système de détection rapide à haute résolution (caméra CCD (FReLON, pour Fast Read-out and Low Noise camera)) couplé à un amplificateur d'image de rayons X (XRII), qui permet d'enregistrer des signaux à deux dimensions (2D)

(Narayanan et coll., 2001; Finet et Narayanan, 2002). Les quatre étapes du traitement des données nécessaires pour obtenir les valeurs d'intensité absolue (données 1D), c'est-à-dire la soustraction du fond du CCD, la correction de la distorsion spatiale, la correction des inhomogénéités spatiales et l'intégration azymuthale des données brutes sont décrites dans l'article de T. Narayanan (2001) (Narayanan et coll., 2001). Les signaux des tampons correspondants ont été soustraits des signaux 1D.

Des mesures de diffusion effectuées sur de la poudre d'argent ont montré que les limitations de l'appareillage (le rapport $\delta\lambda/\lambda$, la collimation du faisceau et la résolution spatiale du détecteur) sont négligeables devant la largeur des pics observés avec les échantillons de BMV.

IV- INTERACTIONS ENTRE PARTICULES VIRALES EN SOLUTION

La diffusion des rayons X aux petits angles (DXPA) est une méthode qui a permis de caractériser les évolutions de taille, de forme et surtout de comportement de protéines en solution de natures et de tailles aussi variées que l'inhibiteur de la trypsine bovine (6,5 kDa), le lysozyme (14,3 kDa), les γ cristallines (21 kDa), l'urate oxydase (128 kDa), l'aspartate transcarbamylase (306 kDa) et les α cristallines (800 kDa), en fonction des conditions physico-chimiques. L'originalité du travail présenté ici réside dans le fait que jamais les interactions entre macromolécules biologiques aussi grosses qu'un virus entier n'avaient encore été étudiées par DXPA. De plus, les propriétés intrinsèques du Virus de la Mosaïque du Brome en font un sujet d'étude idéal de par sa facilité de production, de par sa grande masse ($4,6 \cdot 10^6$ Da), donc de son haut pouvoir diffusant même à faible concentration, et de par sa forme sphérique. La collaboration avec le groupe d'A. Tardieu avait pour but de caractériser le comportement du virus en solution, en comparant ses propriétés à celles des protéines en solution, puisque le BMV est entouré d'une capsid protéique, mais également à celles de colloïdes, le BMV étant proche d'une sphère dont la taille (13,4 nm de diamètre) est celle d'un petit colloïde, les colloïdes étant des particules de 10 à 1000 nm de diamètre, de nature organique ou inorganique, en suspension dans un milieu continu.

Les expériences de diffusion des rayons X devaient aussi nous mettre sur la voie de conditions de cristallisation du BMV. En effet, la cristallisation des protéines en solution se fait généralement dans des conditions attractives. L'augmentation progressive des interactions attractives permet de passer d'un état liquide à un état solide (amorphe ou cristallin).

Une grande partie des résultats présentés dans ce chapitre a été publiée dans l'article *Spherical plant viruses : interactions in solution, phase diagrams and crystallization of brome mosaic virus* - Acta Cryst. (2001). D57, 1799-1812 - M. Casselyn, J. Perez, A. Tardieu, P. Vachette, J. Witz et H. Delacroix. (Casselyn et coll., 2001)

IV-A. Effets du pH et des sels sur les interactions en solution

La variation du pH influe sur les interactions entre protéines en solution, en modifiant la charge nette des molécules, et donc les répulsions coulombiennes. L'utilisation de sels permet d'écranter les charges en surface et d'ajouter un potentiel attractif, ou effet Hofmeister.

Le BMV a une masse moléculaire de $4,6 \cdot 10^6$ Da. Sa protéine de capsid, d'une longueur de 189 résidus, comprend 27 résidus basiques, et 17 résidus acides. La résolution de la structure du BMV a montré que la surface interne de la capsid du BMV est fortement chargée positivement, principalement à l'extrémité N-terminale des protéines qui contient sept arginines et une lysine. Néanmoins, les charges positives des résidus basiques internes de la capsid sont masquées par les interactions avec les résidus phosphates de l'ARN. La surface externe de la capsid présente quelques charges négatives (acides glutamiques et aspartiques) autour des pseudo-axes 3, et autour des axes icosaédriques d'ordre 5, mais ces résidus sont impliqués dans la fixation des ions calcium, concourant ainsi à la stabilité de la capsid (voir le Chapitre II).

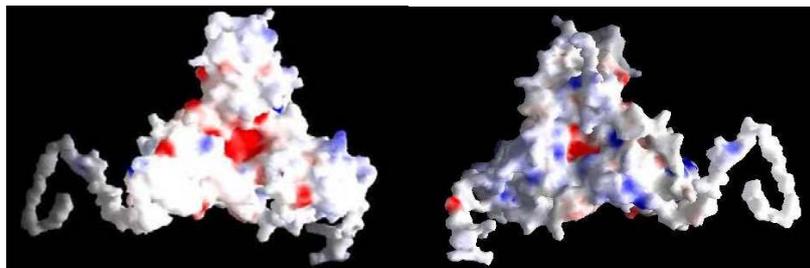


Figure IV-1 : Représentation des charges d'un trimère ABC du BMV. La surface externe du virus (à gauche) présente peu de résidus chargés. Les zones colorées en rouge au niveau du pseudo axe 3 correspondent au résidus acides, glutamate et aspartate, impliqués dans la fixation du calcium. La surface interne du virus (à droite) est porteuses de nombreux résidus basiques, en bleu, impliqués dans la stabilisation de l'ARN. Ces surfaces ont été construites grâce au logiciel GRASP (v1.2-1994 ©Columbia University (Nicholls et coll., 1991)).

1) *Effet du pH*

Quatre valeurs de pH ont été étudiées : 4, 5, 5,9 (pH de stockage, où le BMV est stable et ne s'agrège pas) et 7,5, en présence de 20 mM d'acétate de sodium, pour des concentrations en virus allant de 5 à 40 mg/ml. Au-delà de pH 7 le BMV subit un gonflement au niveau des pseudo-axes 3, qui initie le désassemblage de la capsid. Pour éviter ce phénomène, nous avons ajouté dans les échantillons à pH 7,5 une faible quantité de chlorure de calcium (3 mM), mais cependant suffisante pour saturer les sites de fixation de ces ions divalents.

L'évolution du signal de diffusion près de l'origine est caractéristique de la nature des interactions en solution. La Figure IV-1 représente les signaux diffusés pour un échantillon contenant 40 mg/ml de BMV, à chaque pH. Une première observation générale est que les interactions entre particules virales en solution sont répulsives quelle que soit la valeur du pH, comme l'indique la forme du signal à l'origine. De plus, la répulsion diminue avec l'augmentation du pH. Cela signifie que la valeur du pI est supérieure à 7,5, et que le BMV peut être considéré comme une macromolécule « basique ».

La diminution des interactions répulsives est reliée, dans le cas des protéines, aux déprotonations successives des acides aspartiques, acides glutamiques et des histidines qui ont des valeurs standard de pKa de 3,9, 4,3 et 6 respectivement. Les résidus chargés négativement à la surface du BMV sont pour la plupart engagés dans la fixation des ions divalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) responsables de la stabilité de la capsid, et ne participent donc pas à la charge nette. De plus, certains de ces résidus ont un pKa anormalement élevé, proche ou supérieur à 7 (Bancroft, 1970; Tama et Brooks, 2002). Ce phénomène est dû à la forte concentration locale des charges négatives, renforcée encore par la proximité des résidus phosphates de l'ARN, principalement localisés au niveau du pseudo axe 3.

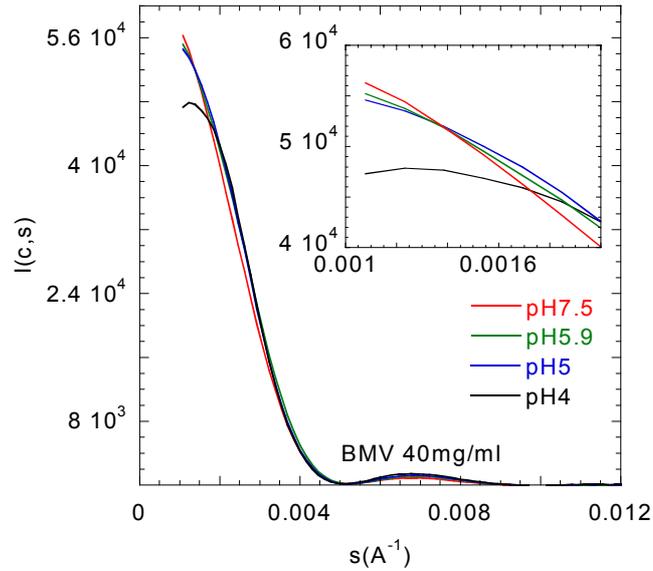


Figure IV-1 : Modification du signal diffusé avec l'augmentation du pH. La valeur absolue de la pente du signal à l'origine augmente, ce qui révèle une diminution des interactions répulsives reliée à l'augmentation du pH.

Le calcul des valeurs du second coefficient du viriel A_2 permet également de caractériser la nature des interactions en solution. Les valeurs de A_2 déterminées grâce au calcul des facteurs de structure pour chaque pH sont reportées dans le Tableau IV-1. Lorsque les interactions sont attractives, le coefficient est négatif. Ici, A_2 est positif dans tous les cas mais se rapproche de 0 avec l'augmentation du pH, ce qui prouve la diminution de la répulsion.

pH	A_2
pH 4	2.10^{-6}
pH 5	$1,26.10^{-6}$
pH 5,9	$1,37.10^{-6}$
pH 7,5	$7,17.10^{-7}$

Tableau IV-1 : Variation des valeurs du second coefficient du viriel A_2 (mol.ml.g⁻²) en fonction du pH de la solution. Les valeurs du second coefficient du viriel A_2 sont positives, mais se rapprochent de 0 avec l'augmentation du pH, ce qui indique une diminution de la répulsion entre particules.

2) Effet des sels

L'addition de sels est une méthode couramment utilisée en cristallisation des protéines pour écranter les charges et induire des interactions attractives entre molécules, et leur effet en fonction de leur nature et de leur concentration a été étudié par diffusion des rayons X (Bonneté et coll., 1999; Budayova et coll., 1999; Muschol et Rosenberger, 1995; Tardieu et coll., 1999). Nous avons utilisé deux sels différents, situés aux deux extrémités de la série Hofmeister : l'acétate de sodium (AcNa), qui entre dans la composition de notre solution de stockage du virus, et le nitrate de sodium (NaNO_3).

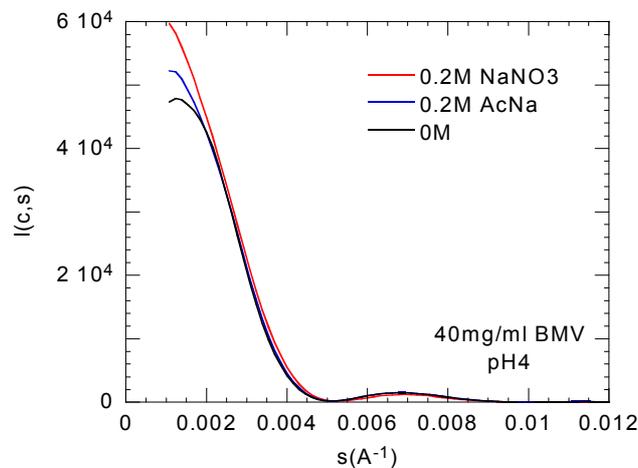


Figure IV-1 : Effet de 0,2 M d'acétate de sodium (AcNa) et de nitrate de sodium (NaNO_3) sur les interactions entre particules virales en solution. Les interactions répulsives diminuent de façon plus visible avec le NaNO_3 qu'avec l'AcNa, comme le révèle l'augmentation de l'intensité diffusée près de l'origine, mais sans aboutir à des interactions attractives.

L'addition de chacun de ces deux sels a permis de réduire les interactions répulsives en solution, sans toutefois atteindre des interactions attractives. Le NaNO_3 a eu plus d'effet que l'acétate de sodium. L'effet de ces sels a donc suivi l'ordre inverse de la série des anions d'Hofmeister, ce qui est normal en dessous du pI, et qui montre que l'effet Hofmeister est toujours présent dans le cas de macromolécules de la taille de BMV.

Dans une autre série d'expériences, nous avons choisi d'étudier le nitrate de sodium plus en détail (Figure IV-2). Nous avons pu voir que l'augmentation progressive de la concentration en NaNO_3 provoquait une diminution des interactions répulsives, comme le montre la variation de l'intensité diffusée à l'origine dans la Figure IV-2 et les valeurs correspondantes de A_2 dans le Tableau IV-1.

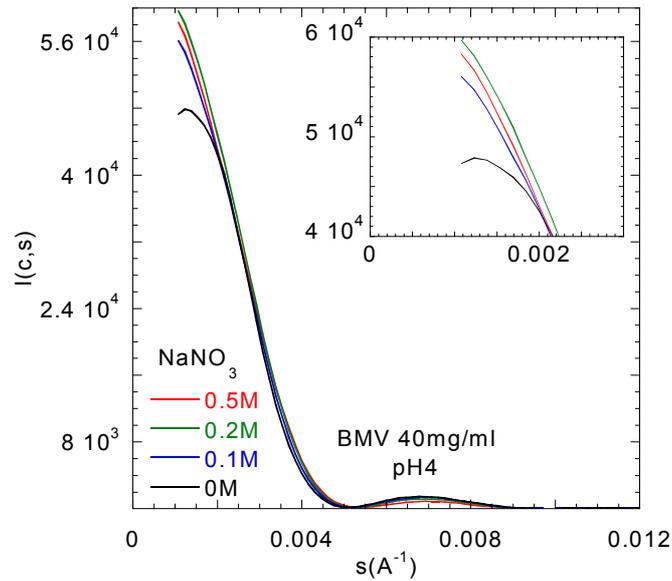


Figure IV-2 : Effet de l'augmentation progressive de la concentration en NaNO₃.

La croissance du signal près de l'origine lorsque la concentration en sels augmente est caractéristique d'une diminution des interactions répulsives. La zone d'interactions (près de l'origine) représentée dans l'insert montre que 0,5 M de NaNO₃ n'est pas plus efficace que 0,2 M pour réduire les interactions répulsives, ce qui traduit un effet de saturation.

Concentration en NaNO ₃	A ₂
0 M	2.10 ⁻⁶
0,1 M	9,3.10 ⁻⁷
0,2 M	4,5.10 ⁻⁷
0,5 M	6,1.10 ⁻⁷

Tableau IV-1 : Variation du second coefficient du viriel (mol.ml.g⁻²) avec l'augmentation de la concentration en NaNO₃. Les valeurs du second coefficient du viriel A₂ restent positives malgré l'augmentation de la concentration en sel.

L'augmentation de l'intensité diffusée aux petits angles en fonction de la valeur du pH, ou de la nature et de la concentration des sels en solution, indique une légère diminution des interactions répulsives.

L'utilisation de sels monovalents, situés aux deux extrémités de la série Hofmeister, n'a pu aboutir à la production d'interactions attractives entre les particules de BMV. Le nitrate a tout de même été plus efficace que l'acétate, ce qui indique que l'effet Hofmeister (Tardieu et coll., 2002) est toujours valable dans le cas du BMV, sans

avoir autant d'effet que pour les petites protéines. Ce phénomène a déjà été observé dans le cas de grosses protéines ou assemblages protéiques, comme l'urate oxydase (Vivarès et Bonneté, 2002), l'aspartate transcarbamylase (Budayova et coll., 1999) et les alpha cristallines (Finet et Tardieu, 2001). Les sels seuls sembleraient donc être des agents de cristallisation inefficaces dans le cas de grosses macromolécules, alors qu'ils sont très efficaces dans le cas de petites protéines compactes comme le BPTI (Lafont et coll., 1997) ou le lysozyme (Bonneté et coll., 1999) qui cristallise très facilement par ajout de sels.

IV-B. Effets du pH et des sels sur la structure du virus

1) *Observation des signaux de diffusion*

Les courbes de diffusion sont maintenant représentées sous leur forme logarithmique. Les courbes apparaissent parfaitement superposées aux plus grands angles à l'intérieur d'une série en concentration de BMV, à pH constant ou à concentration en sel constante (Figure IV-1).

Le premier fait remarquable est le décalage du premier minimum vers les plus grandes valeurs de s avec l'augmentation du pH ou dès la présence de 0,1 M de nitrate de sodium (NaNO_3) (Figure IV-1, Figure IV-2). Ensuite, il apparaît un décalage du 2^{ème} maximum vers le bas (Figure IV-2). Ces deux effets sont très prononcés avec l'augmentation de la concentration en nitrate de sodium (Figure IV-2). Les variations observées correspondent à un changement du facteur de forme du virus lui-même, et non plus uniquement à une variation des interactions entre particules virales en solution en fonction des conditions physico-chimiques traduisible par le facteur de structure.

L'ajout de 0,2 M d'acétate de sodium en revanche semble n'influer que sur les interactions entre virus (Figure IV-3).

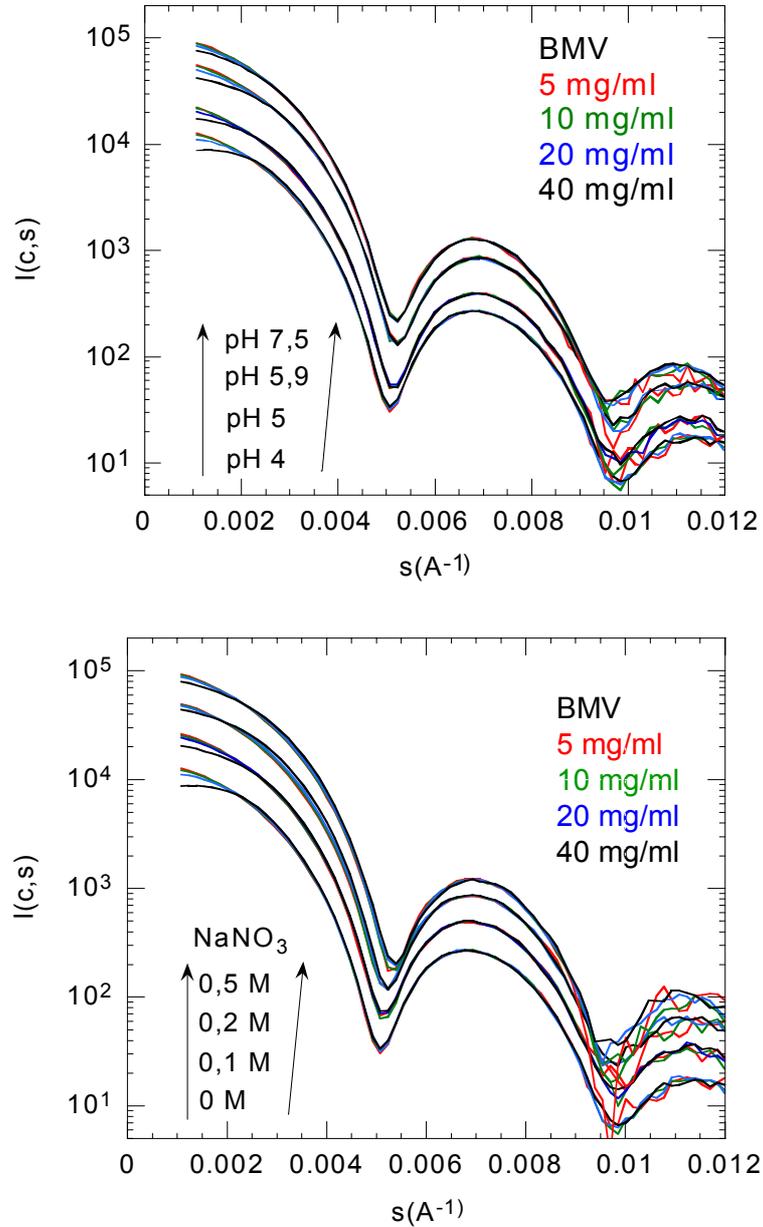


Figure IV-1 : Représentation logarithmique des séries en concentration de virus à au différentes valeurs de pH (en haut) et aux différents concentrations en $NaNO_3$ (en bas). Les séries ont été affectées d'un coefficient pour éviter le chevauchement des courbes. Dans une même série (c'est-à-dire même pH ou même concentration en sel), les courbes sont parfaitement superposées aux plus grands angles, après la « zone d'interactions ». Entre chaque série, on observe un décalage du premier minimum vers la droite avec l'augmentation du pH ou de la concentration en $NaNO_3$.

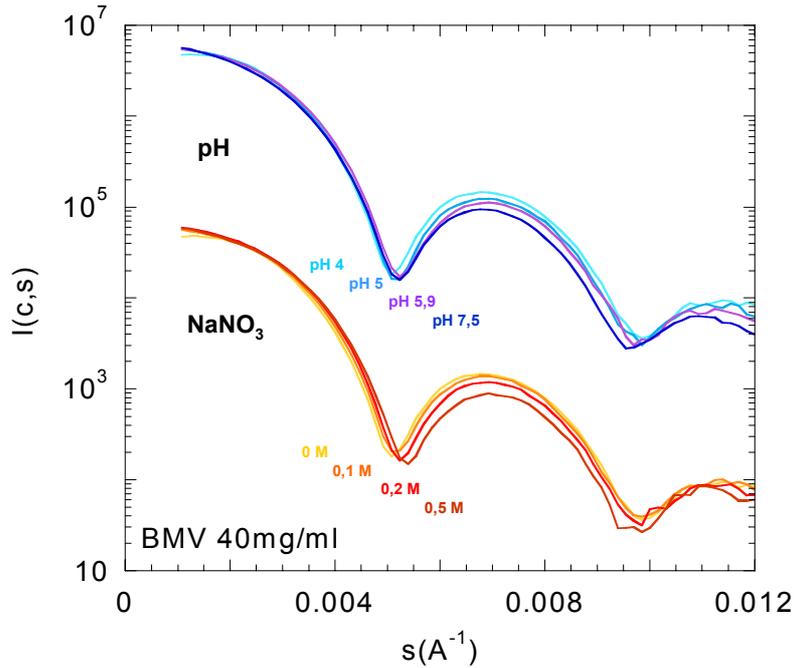


Figure IV-2 : Effet de l'augmentation du pH et du sel sur la structure du virus. Le décalage du premier minimum vers les plus grands angles et du premier lobe vers le indique une modification de la contribution du facteur de forme du virus au signal de l'intensité diffusée. La position du minimum varie de $0,00507$ à $0,00524 \text{ \AA}^{-1}$ avec l'augmentation du pH La position du minimum varie de $0,00507$ à $0,00538 \text{ \AA}^{-1}$ avec l'augmentation de la concentration en NaNO_3 .

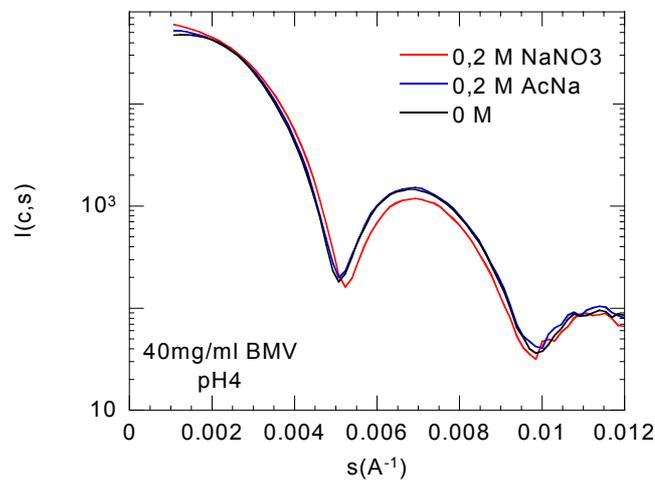


Figure IV-3 : Effet de la présence de sels sur la structure du virus. L'acétate de sodium (AcNa) et le nitrate de sodium (NaNO_3) à une concentration de $0,2 \text{ M}$ modifient l'intensité à l'origine, mais avec l'AcNa les courbes restent superposées aux plus grands angles, alors que le NaNO_3 provoque une modification du facteur de forme du virus.

Dans le cas de la diffusion de particules sphériques, la position des minima est directement reliée au rayon des particules. Le déplacement de ces minima vers les plus grands angles avec l'augmentation du pH ou de la concentration en NaNO_3 peut traduire une

diminution du rayon des particules virales, c'est-à-dire dire une compaction des virus. Pour déterminer l'importance de ces variations, une des méthodes couramment employée est de superposer les courbes de diffusion expérimentales avec des courbes de diffusion calculées pour des sphères de dimensions variables.

2) *Calculs de modèles théoriques de la diffusion de sphères creuses*

Le BMV étant creux et de forme sphérique, il est facile de comparer les résultats obtenus expérimentalement avec des signaux théoriques calculés pour la diffusion de sphères creuses, en faisant varier les valeurs des rayons internes et externes de ces sphères.

Nous avons superposé les facteurs de formes obtenus par extrapolation des données expérimentales avec des modèles théoriques de diffusion (voir le paragraphe III.C-3 : Traitement des données). En nous basant sur l'alignement des deux premiers minima d'intensité et des deux premiers maxima secondaires entre les deux séries de courbes, nous avons pu voir que le diamètre externe du virus ne subissait aucun gonflement ou rétrécissement suite à la variation du pH ou à l'ajout de sels. La variation du signal expérimental est due uniquement à la variation de la valeur du rayon interne. La superposition optimale des facteurs de forme et des courbes théoriques, et les valeurs des rayons correspondantes sont reportés dans la Figure IV-1 et le Tableau IV-1. Ces résultats indiquent une restructuration interne du virus.

Un changement de la valeur du rayon interne du virus ne peut être dû qu'à des modifications au niveau de la conformation de l'ARN, et des interactions entre résidus basiques protéiques et résidus phosphates. L'ARN chargé négativement interagit avec les résidus N-terminaux des protéines de capsid chargés positivement qui tapissent l'intérieur du virus. Les interactions entre protéines et ARN sont peu spécifiques, car, même si toutes les capsides de BMV ont la même structure, elles ne renferment pas toutes le même fragment d'ARN. En effet, le génome du BMV est tripartite, et les fragments ARN1, ARN2, ARN3/ARN4 n'ayant pas les mêmes séquences n'ont pas non plus la même organisation.

On peut supposer que la présence d'anions provoque l'écrantage des résidus protéiques chargés positivement, tandis que les contre-ions écrantent les groupements phosphates chargés négativement de l'ARN. La variation de pH pourrait induire la protonation de quelques résidus basiques impliqués dans la fixation de l'ARN ; son effet est toutefois moins important que celui des sels.

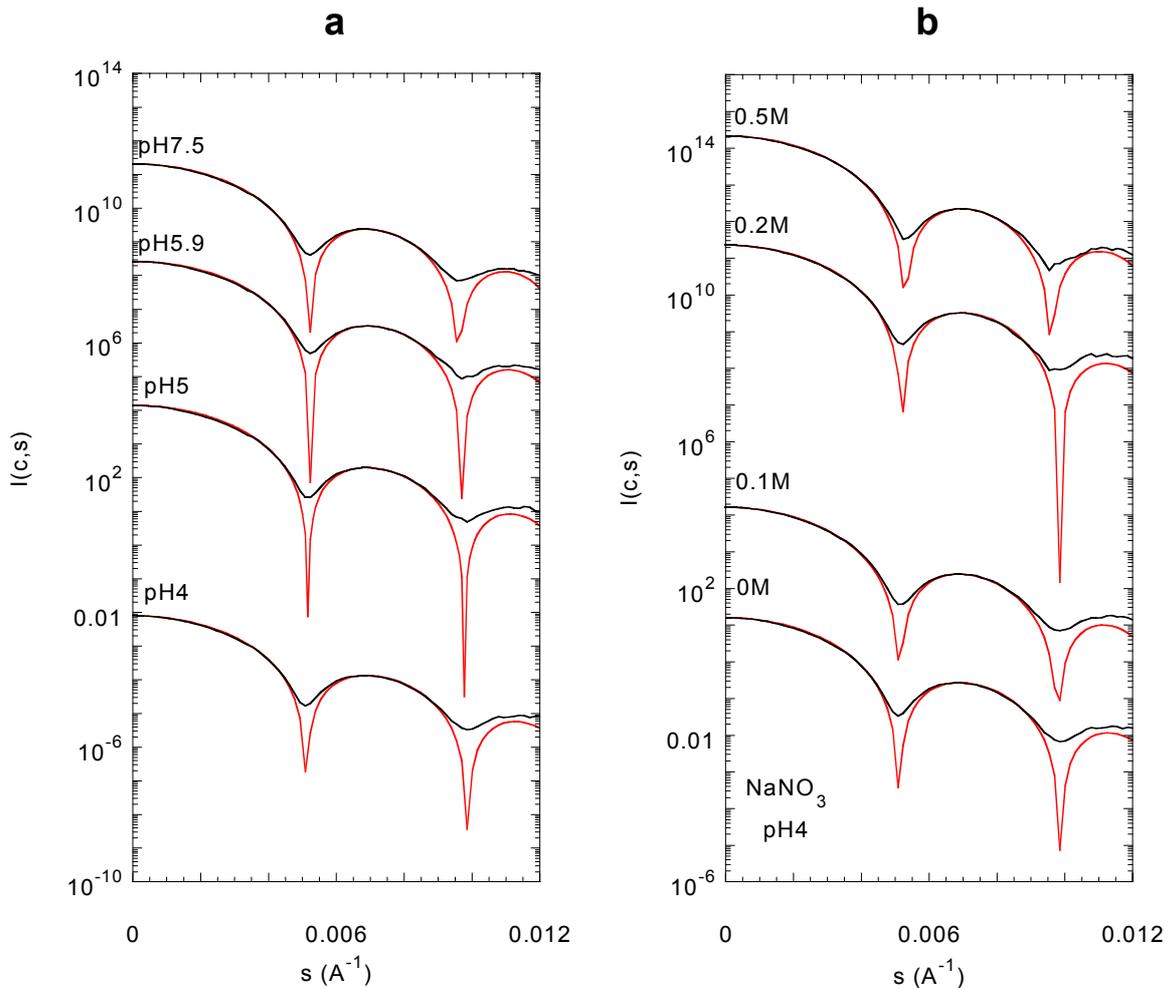


Figure IV-1 : Superposition des courbes expérimentales (en noir) et des modèles de sphères creuses (en rouge). L'extrapolation des courbes expérimentales a permis d'obtenir le facteur de forme du virus dans les différentes conditions de pH (à gauche) et de NaNO_3 (à droite).

	R_{ext} (Å)	R_{int} (Å)
pH 4	131	52
pH 5	132	46
pH 5.9	132	40.5
pH 7.5	133	39
0.1 M NaNO_3	132	48
0.2 M NaNO_3	131	46
0.5 M NaNO_3	132	34

Tableau IV-1 : Valeurs des rayons externes R_{ext} et des rayons internes R_{int} déterminées grâce aux modèles de sphères creuses pour les différentes conditions en pH et en sel. La valeur du rayon interne diminue avec l'augmentation du pH et de la concentration en sels, ce qui révèle une restructuration de l'ARN dans la capside.

Nous avons utilisé le programme GNOM (Svergun et Semenyuk, 1993) pour calculer les distributions des distances entre paires d'atomes diffusants. Nous avons ainsi pu rendre compte de la diminution du rayon interne du virus, qui correspond à un remplissage progressif du lumen (Figure IV-2).

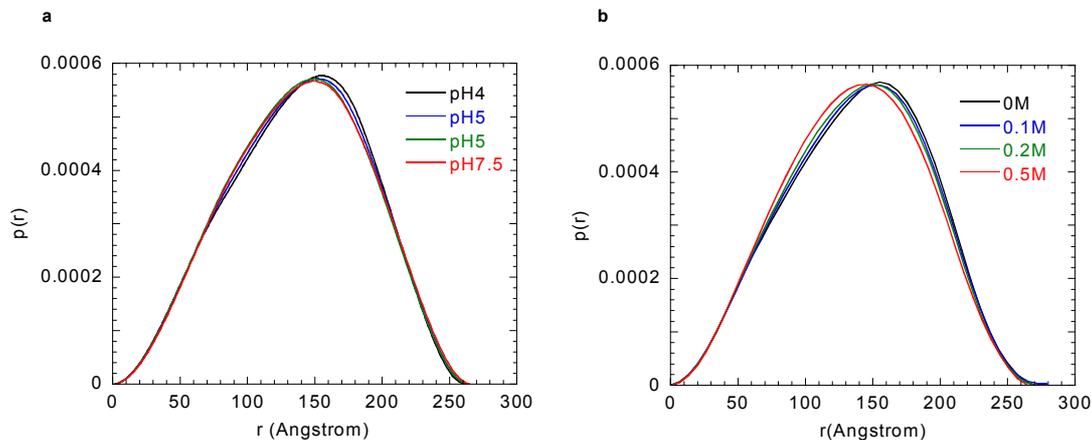


Figure IV-2 : Distribution des distances r (en Å) entre les atomes diffusants. On observe un décalage progressif des courbes vers les plus faibles valeurs de r avec l'augmentation du pH (a) et l'augmentation de la concentration en NaNO_3 (b), ce qui indique un remplissage progressif du trou central.

La diffusion des rayons X aux petits angles nous a permis de caractériser une diminution de la répulsion entre particules virales en solution avec l'augmentation du pH ou l'ajout de sels. Aux plus grands angles, qui rendent compte de la forme des particules, nous avons observé simultanément aux variations de l'intensité à l'origine, un décalage de la position du premier minimum, ainsi qu'un changement de la hauteur du premier maximum secondaire. Pour savoir à quoi était dû ce changement de forme du virus, nous avons comparé nos données expérimentales avec des données théoriques. Nous avons pu déduire de nos modèles que la variation du pH et l'ajout de sels provoquaient la restructuration de l'ARN viral, phénomène dû sans doute à la modification et/ou à l'écrantage des charges internes du virus (extrémités N-terminales basiques des résidus protéiques et groupements phosphates de l'ARN). Ces expériences ne nous ont pas permis de définir des conditions attractives. Nous avons donc utilisé un polymère non chargé, le polyéthylène glycol, dont les propriétés d'attraction par déplétion sont très utilisés en cristallogénèse, et en précipitation et purification des protéines.

IV-C. Effets du polyéthylène glycol

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère non chargé, de formule $(-\text{CH}_2\text{OCH}_2-)_n$, non dénaturant, qui induit dans les solutions protéiques ou colloïdales un potentiel attractif appelé « attraction de déplétion ». Cet effet a été étudié dans le cas de protéines de tailles et formes très variables.

1) *Effet synergique entre sels et PEG*

Nous avons voulu conjuguer les effets des sels et du PEG, pour voir si l'ajout du polymère pouvait avoir un effet synergique avec les sels, comme dans le cas de l'ATCase (306 kDa) (Budayova et coll., 1999), puis une séparation de phase, comme dans le cas des α cristallines (800 kDa) (Finet et Tardieu, 2001), qui sont les plus grosses particules à avoir été étudiées systématiquement par SAXS. Nous avons utilisé, dans des expériences effectuées au LURE, deux tailles de PEG, 8000 et 20 000. Les pourcentages de PEG qui sont indiqués dans la suite correspondent à des pourcentages en masse/volume (m/v).

L'acétate de sodium, à partir d'une concentration 0,2 M en présence de 5 % de PEG 20 000 a eu un effet précipitant sur les échantillons, ce qui correspond à un « excès » d'attraction. Les échantillons précipités en présence de sels et de PEG ont un aspect blanc ou turbide. Expérimentalement, ces échantillons sont caractérisés par l'apparition de pics de diffraction, ce qui révèle leur nature microcristalline (Figure IV-1). La présence de pics est reliée à la concentration en sel et en virus : seul l'échantillon le plus concentré présente des pics.

Pourtant, comme le montre la Figure IV-2 a, le régime reste répulsif en utilisant uniquement 5 % de PEG 20 000, et nous avons vu précédemment que l'utilisation de 0,2 M d'acétate de sodium n'induisait pas non plus de précipitation. La Figure IV-2 b montre l'évolution du signal diffusé/diffracté en fonction de la composition de l'échantillon : en présence soit de PEG, soit de sel, les échantillons contenant 40 mg/ml de BMV ne précipitent pas. En revanche, la combinaison des deux agents précipitants provoque la précipitation des échantillons, soit un « excès » d'attraction. Ainsi, dans le cas du BMV, il existe un effet synergique des sels et du polyéthylène glycol.

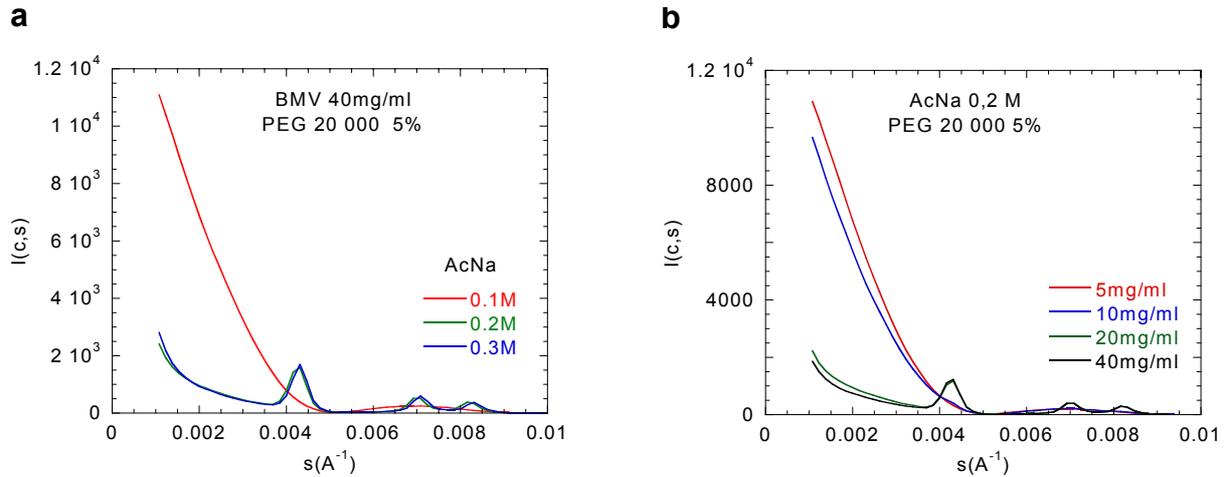


Figure IV-1 : Précipitation des échantillons en présence de 5 % de PEG 20 000, et à différentes concentrations d'acétate de sodium, à pH 4.

(a) Une concentration de 0,2 M d'AcNa en présence de 5 % de PEG 20 000 provoque la précipitation des échantillons à 40 mg/ml de BMV.

(b) Limite de précipitation : à une concentration en BMV de 10 mg/ml, en présence de 0,2 M d'AcNa et de 5 % de PEG 20 000, on peut déjà observer l'émergence d'un pic de diffraction.

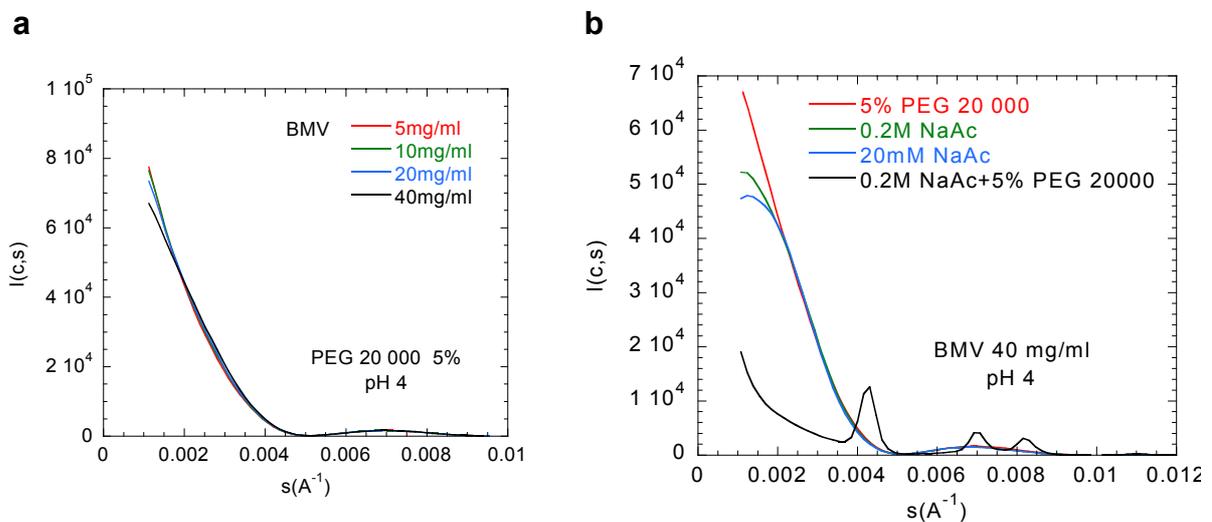


Figure IV-2 : Effet synergique du sel et du PEG.

(a) L'utilisation de 5 % de PEG 20 000 seul ne provoque pas d'interactions globalement attractives.

(b) Evolution du signal de diffusion en fonction de la nature des agents précipitants. L'ajout de 0,2 M d'acétate de sodium provoque une légère diminution des interactions répulsives ; l'ajout de 5 % de PEG 20 000 est plus efficace. La combinaison de ces deux agents provoque la précipitation de l'échantillon, c'est-à-dire un excès d'attraction.

De plus, l'effet du PEG est relié à sa taille. Comme le montre la Figure IV-3, les pics sont mieux définis et plus hauts avec le PEG 20 000 qu'avec le PEG 8 000 pour une même concentration de sels.

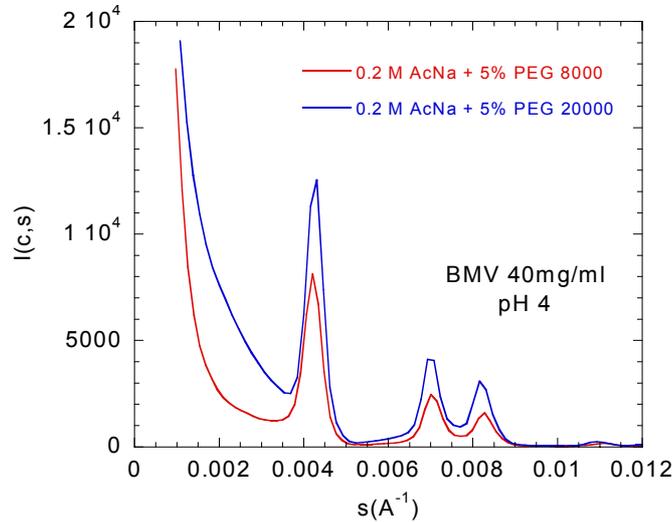


Figure IV-3 : Effet synergique du PEG et du sel en fonction de la taille du PEG. L'effet synergique a lieu avec le PEG 8000 également, mais de façon moins efficace qu'avec le PEG 20 000, comme l'indique la différence de la hauteur des pics.

2) Effets du PEG seul

L'utilisation de PEG seul a également pu provoquer la précipitation des échantillons. Nous avons montré que ce phénomène était relié au pH. Ainsi, l'utilisation de 5 % (m/v) de PEG 20 000 (PEG 20) à pH 4 (Figure IV-2 a) ou de 4 % à pH 5 (Figure IV-1 a) n'induisent pas la précipitation des échantillons, alors que 4 % (m/v) de PEG 20 à pH 5,9 (Figure IV-1 b) précipitent les échantillons. Dans cette dernière condition, la précipitation est visible à l'œil dès 20 mg/ml de BMV, sous la forme de traces blanches dans l'échantillon, et se caractérise par l'apparition d'une ébauche de pic. A 40mg/ml, l'échantillon est totalement précipité et provoque l'apparition de pics distincts. Ainsi, plus le pH est élevé, plus l'effet précipitant du PEG est important, ce qui semble normal en vue des résultats obtenus précédemment, où les interactions sont de moins en moins répulsives au fur et à mesure que le pH augmente. Dans la Figure IV-1 b, la courbe qui correspond à l'échantillon contenant 10 mg/ml de BMV est au-dessus de la courbe à 5 mg/ml. Dans ce cas-ci, le régime attractif est atteint avant la précipitation.

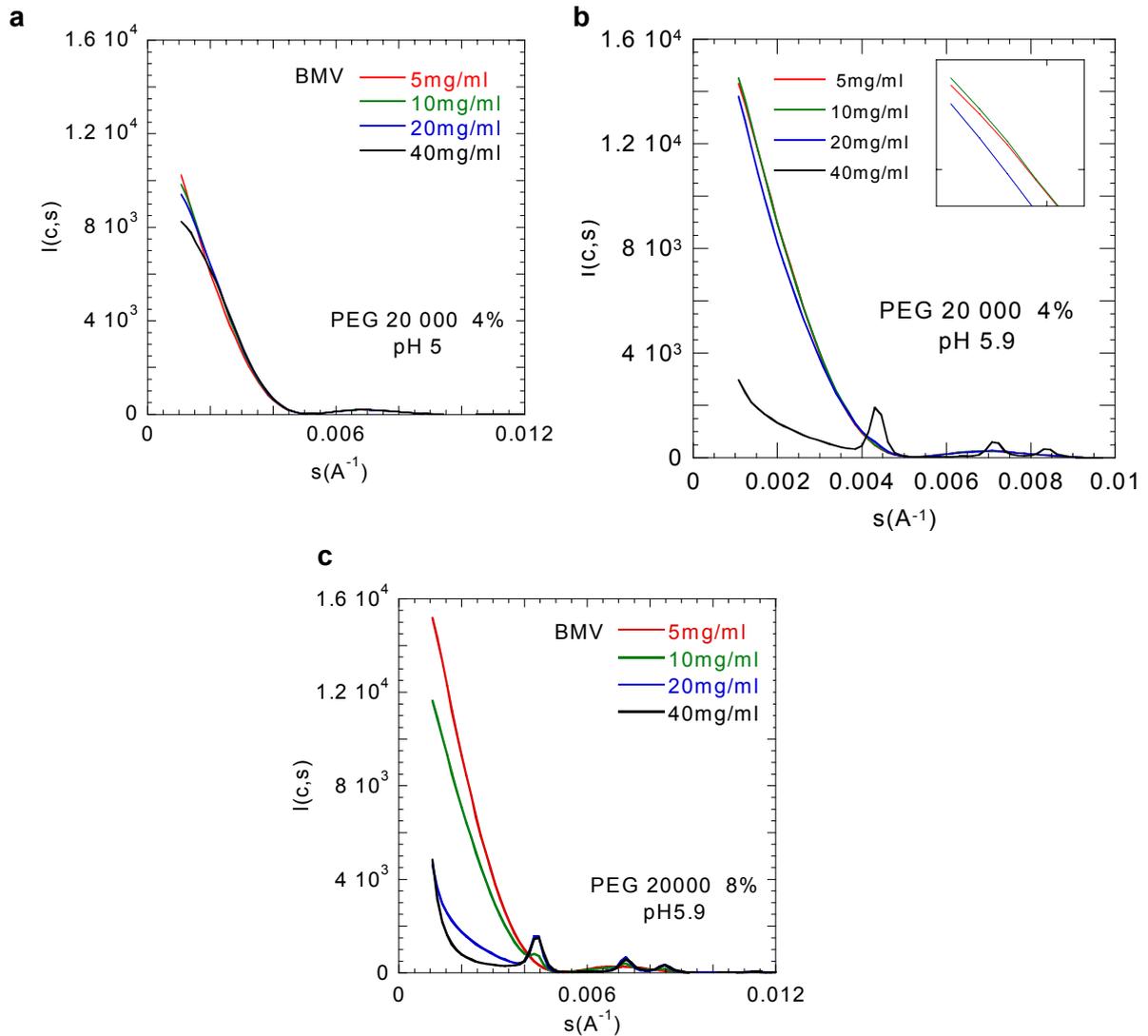


Figure IV-1 : Effet du PEG 20 000. a) L'utilisation de 4 % de PEG 20 000 à pH 5 est insuffisante pour induire des interactions attractives. b) A pH 5,9, l'utilisation de 4 % du même PEG provoque la précipitation totale des échantillons à 40 mg/ml de BMV, et un début de pic apparaît avec 20 mg/ml de virus. Les courbes reportées dans l'insert rendent compte de la nature attractive des interactions. c) L'utilisation de 8 % de PEG 20 000 à pH 5,9 induit la précipitation des échantillons dès 5 mg/ml de virus.

L'utilisation de PEG 8 000 (PEG 8) a permis d'induire également des précipités, mais il a fallu utiliser des concentrations plus importantes de PEG 8 que de PEG 20 pour induire la précipitation. Nous avons ainsi pu confirmer que l'efficacité du PEG était reliée à sa taille dans le cas du BMV également, phénomène qui a déjà été mis en évidence avec les protéines (Bonneté et coll., 2001; Budayova et coll., 1999; Finet et Tardieu, 2001; Kulkarni et coll., 2000; Vivarès et Bonneté, 2002). Nous avons étudié le PEG 8 en série de concentration (4 %, 6 %, 8 % et 10 % (m/v)) à pH 5. Les résultats obtenus pour les échantillons à 40 mg/ml de BMV sont reportés dans la Figure IV-2 a. La zone correspondant aux interactions, près de l'origine, montre la diminution des interactions répulsives avec l'augmentation de la concentration en PEG, jusqu'à atteindre la précipitation avec 10 % de PEG 8. Avec 8 % de PEG 8 (Figure IV-2 b), les conditions sont toujours attractives. Les valeurs de A_2 calculées pour des concentrations en PEG allant de 0 à 8 % restent toujours positives, mêmes si elles tendent vers des valeurs de plus en plus faibles, ce qui indique que les interactions répulsives diminuent. Il faut atteindre une concentration en PEG 8 de 10 % (m/v) pour obtenir la précipitation (Figure IV-2 c), qui par contre a lieu avec seulement 5 mg/ml de virus. La hauteur des pics de diffraction est reliée à la concentration en virus.

L'insert dans la Figure IV-2 a représente les signaux obtenus avec l'augmentation progressive de la concentration en PEG 8 000, sous leur forme logarithmique. On n'observe pas de décalage des minima ni des maxima, ce qui signifie que l'augmentation de la concentration en PEG n'influe pas sur le facteur de forme, donc sur la forme du virus lui-même. De plus, un des faits remarquables est que quelle que soit la concentration ou la taille de PEG utilisée, la position des pics de diffraction est la même.

Nous avons également pu mettre en évidence que la solubilité du BMV diminuait avec l'augmentation de la concentration et de la taille du PEG. Ces résultats seront représentés sous la forme de diagrammes de phases dans le chapitre suivant.

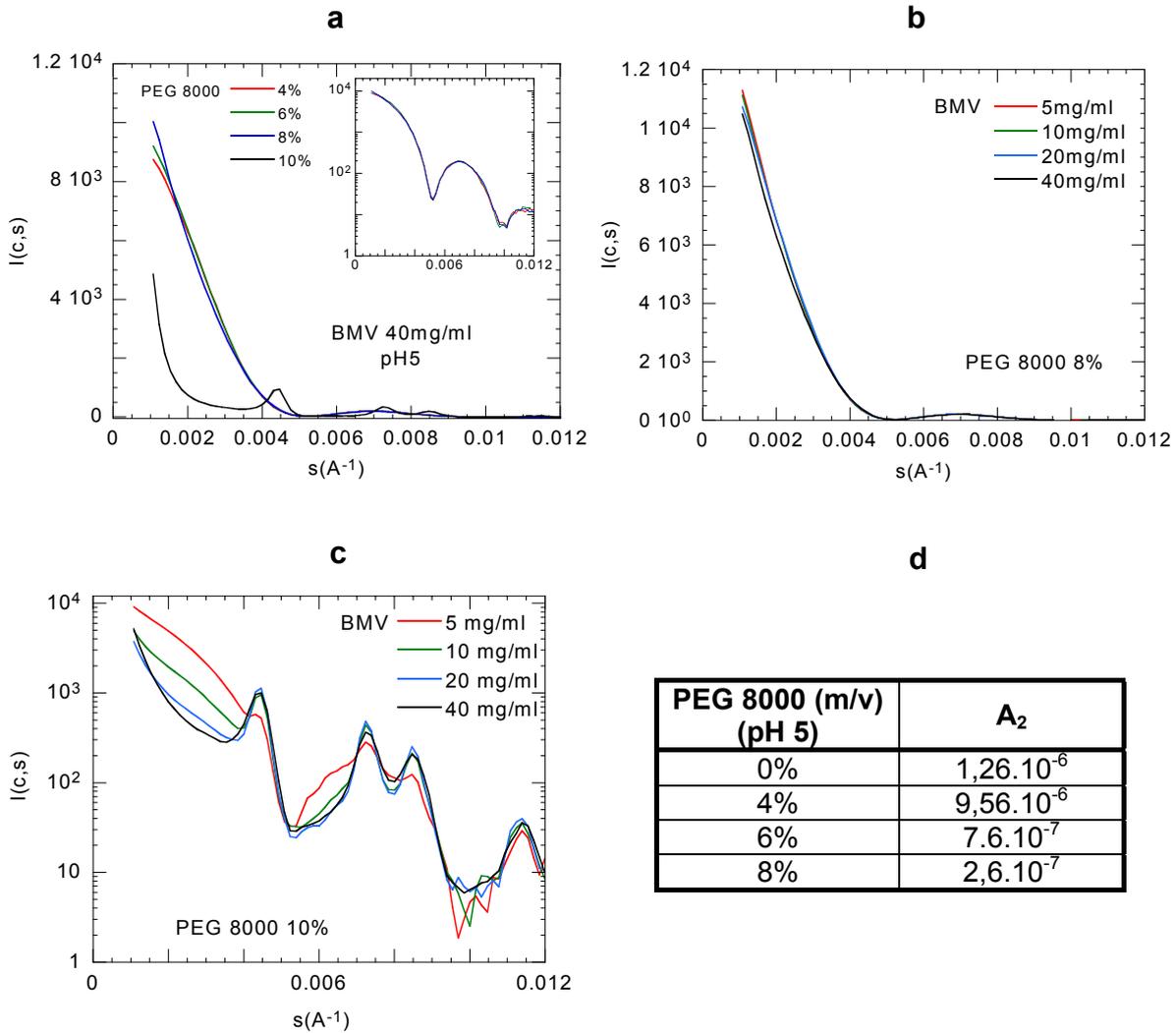


Figure IV-2 : Précipitation des échantillons par l'ajout de PEG 8 000.

(a) Série en concentration de PEG 8 000, de 4 à 10 %, pour une concentration en virus de 40 mg/ml. Il faut 10 % de PEG pour induire la précipitation des échantillons. La représentation logarithmique des courbes représentée dans l'insert montre qu'il n'y a pas de changement du facteur de forme du virus avec l'augmentation de la concentration en PEG.

(b) Série en concentration de virus pour une concentration en PEG 8 000 de 8 %. Les interactions restent répulsives.

(c) Série en concentration de BMV pour une concentration en PEG 8 000 de 10 %. Tous les échantillons ont précipité. La hauteur des pics est reliée à la concentration en virus.

(d) Valeurs des coefficients du viriel, calculées pour une concentration en PEG 8 000 allant de 0 à 8 %, la précipitation ayant lieu avec 10 % de PEG. Les valeurs calculées sont toujours positives.

L'ajout de PEG, contrairement à la variation de pH et à l'ajout de sels, ne provoque pas de changement de structure interne du virus. L'utilisation de PEG, seul ou en présence de sels, introduit un potentiel attractif de portée variable. Cet effet de déplétion nous a permis d'obtenir des conditions attractives, mais trop attractives, puisque attraction et précipitation étaient difficilement discernables. La précipitation dépend de plusieurs facteurs : la taille du PEG et sa concentration, la concentration en virus, le pH de la solution, et la présence de sels. Il existe un effet synergique entre sels et PEG.

L'utilisation de PEG induit donc une séparation de phase, l'une des phases étant liquide et enrichie en PEG, et l'autre solide, constituée des virus précipités. La nature des échantillons, solubles, turbides ou totalement précipités, couplée à la présence de pics de Bragg, nous a permis d'obtenir des diagrammes de phase du BMV en fonction de la taille et de la concentration du PEG et de la concentration en BMV, qui seront décrits dans le chapitre suivant.

Le résultat le plus surprenant réside dans la nature des précipités obtenus : ces précipités ne sont pas amorphes, mais cristallins, comme l'a révélé l'apparition de pics de diffraction. Ces pics émergent tous aux mêmes positions quelque soit la composition en PEG ou en virus de l'échantillon. L'exploitation de ces pics de diffraction, et des conditions de cristallisation que nous avons pu en déduire, sera également décrite dans le Chapitre V.

V- ETUDE DES PRECIPITES OBTENUS EN PRESENCE DE POLYETHYLENE GLYCOL : DES MICROCRISTAUX AUX CRISTAUX

Les expériences de diffusion des rayons X aux petits angles (DXPA) décrites dans le Chapitre IV avaient pour but de mettre en relation interactions attractives et cristallisation des protéines. Seule l'addition de polyéthylène glycol (PEG) induit des interactions attractives entre particules virales, jusqu'à une attraction « excessive » qui conduit à la précipitation des échantillons. Il s'est avéré que ces précipités ne sont pas amorphes, comme la plupart des précipités de protéines, mais microcristallins, car les signaux de diffusion montrent des pics de diffraction. Nous avons pu établir que l'apparition des pics, et leur hauteur, c'est-à-dire l'intensité du signal diffracté, est liée à la taille et à la concentration du PEG, ainsi qu'à la concentration en virus. De plus, quelles que soient les conditions de précipitation/cristallisation, l'espacement entre les pics est conservé, ce qui indique que le système cristallin est le même. L'étude de la formation massive et presque immédiate des microcristaux dans ces échantillons a pu nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de nucléation des cristaux de BMV. De plus, nous avons pu déterminer des conditions de cristallisation du virus et obtenir des données de diffraction.

V-A. Diagrammes de phases et cristallisation du BMV

1) *Diagrammes de phases*

Dans les échantillons précipités, les microcristaux sont en équilibre avec les virus en solution, car on n'observe ni dissolution, ni croissance cristalline. La centrifugation à basse vitesse de ces échantillons permet d'isoler deux phases : l'une translucide, correspondant au tampon enrichi en PEG, et l'autre contenant les virus précipités. La séparation de phase induite par le PEG peut donc être assimilée à une séparation de phase liquide-solide.

Le couplage entre les résultats obtenus par DXPA et par microbatch nous a permis d'établir les diagrammes de phase de la concentration en BMV en fonction de la concentration en PEG (Figure V-1 et Figure V-2).

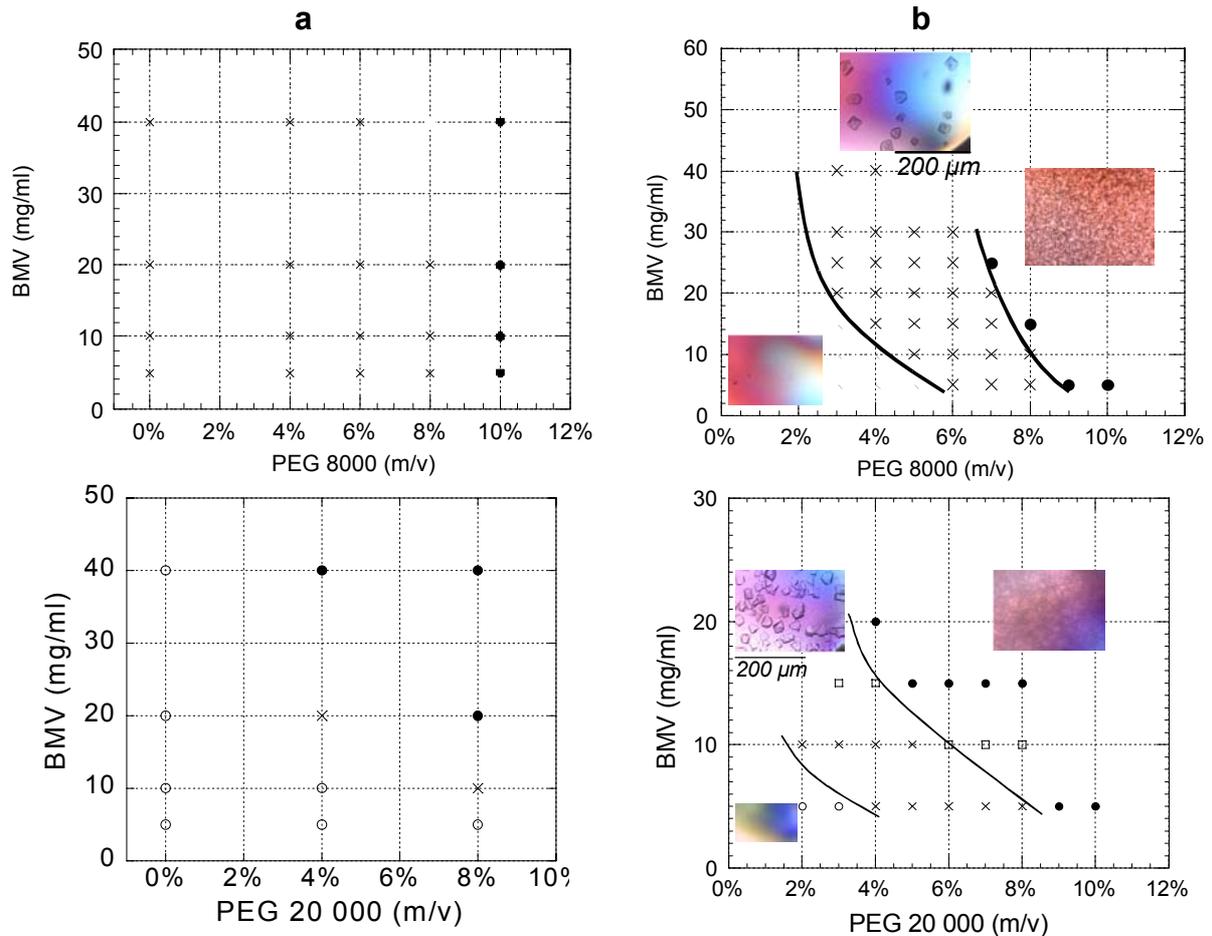


Figure V-1 : Diagrammes de phases réalisés grâce à des expériences de cristallisation d'après les résultats obtenus par DXPA au LURE, pour le PEG 8 000 (pH 5) et le PEG 20 000 (pH 5,9).

a) Aspect des échantillons étudiés par DXPA immédiatement après le mélange. Les échantillons qui restent solubles sont représentés par un cercle vide, les échantillons turbides (cristallins) sont représentés par une croix, et les échantillons totalement précipités (cristallins) sont représentés par un cercle plein. b) Courbe de solubilité obtenue grâce à des expériences de microbatch. Les échantillons qui restent solubles sont représentés par un cercle vide, les conditions qui permettent la formation de cristaux bien facettés sont représentées par une croix, les conditions conduisant à la formation de cristaux mal facettés sont représentées par un carré, et les échantillons précipités qui n'évoluent pas au cours du temps sont représentés par un cercle plein.

Nous avons pu délimiter la courbe de séparation de phase liquide-solide, et nous avons cherché des conditions de cristallisation juste au-dessous de cette limite. Nous avons également déterminé la courbe de solubilité, qui sépare les régions où les échantillons restent solubles des conditions où nous obtenons des cristaux.

Les limites des phases dans les diagrammes se déplacent en fonction de la taille du PEG. Les diagrammes obtenus pour le PEG 8000 et le PEG 20 000, d'après les résultats de

DXPA effectuées au LURE et par des expériences de cristallisation en microbatch, sont reportés dans la Figure V-1.

Les expériences réalisées à l'ESRF nous ont permis de mieux définir les courbes de solubilité et de séparation de phase. Nous représentons dans la Figure V-2 le diagramme obtenu avec le PEG 20 000.

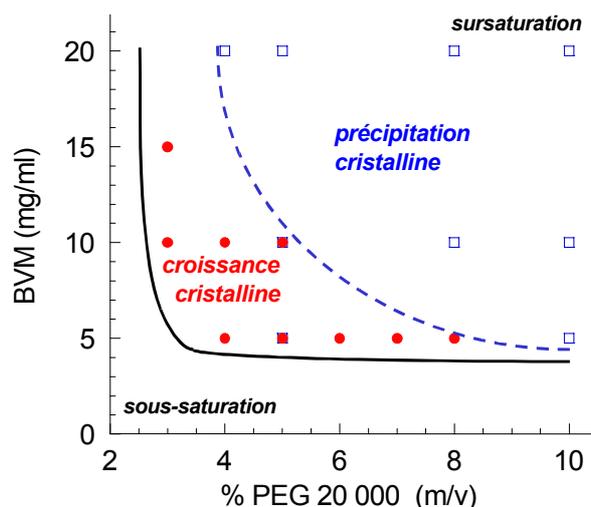


Figure V-2 : Diagramme de phase complété grâce aux expériences réalisées à l'ESRF. La courbe de solubilité, qui sépare les zones sous-saturée et sursaturée, est représentée en noir. Les points rouges correspondent aux conditions de microbatch où nous avons obtenu des cristaux individualisés. Les carrés bleus correspondent aux échantillons qui présentaient une séparation de phase, c'est-à-dire des pics de diffraction. La courbe en pointillés bleus correspond à la courbe de séparation de phases.

En explorant les conditions situées juste au-dessous de la limite de séparation de phase liquide-solide, nous avons obtenu des cristaux de plusieurs centaines de micromètres. Ces résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

2) Cristallisation du BMV

La nature microcristalline des précipités obtenus grâce à l'utilisation de PEG ainsi que l'établissement des diagrammes de phases nous ont permis de déterminer des conditions de cristallisation. Nous avons pu obtenir des cristaux par diffusion de vapeur et par la technique du microbatch, à 18 °C. D'une façon générale, les essais effectués en utilisant à la fois le PEG et les sels ont donné peu de résultats satisfaisants, produisant des aiguilles et des plaquettes

uniquement. En revanche, l'utilisation de PEG seul a fourni de nombreuses conditions favorables. Les plus gros cristaux ont atteint 1 mm de longueur. L'utilisation du PEG 8 000 a permis d'obtenir des cristaux mieux facettés qu'avec le PEG 20 000. Cela peut être dû à la qualité de la nucléation et de la croissance cristalline qui sont d'autant plus rapides que la taille du PEG est importante.

Ce sont les résultats obtenus par microbatch qui ont déterminé les conditions explorées par la technique de la diffusion de vapeur. Les principales conditions explorées avec les deux méthodes sont reportées dans le Tableau V-1.

Conditions explorées par microbatch (dans la goutte)	Conditions explorées par diffusion de vapeur (dans le réservoir)
PEG 20 000 - 3 à 8 % (m/v), 20 mM AcNa, pH 5,9 pour des concentrations en virus allant de 5 à 15 mg/ml	PEG 20 000 - 6 à 15 % (m/v), 20 mM AcNa, pH 5,9 pour des concentrations initiales en virus allant de 2,5 à 30 mg/ml dans la goutte
PEG 8 000 - 3 à 10 % (m/v), 20 mM AcNa, pH 5 - 3 à 10 % (m/v), 20 mM AcNa, pH 4 - 3 à 6 % (m/v) 0,3 M AcNa, pH 4 pour des concentrations en virus allant de 5 à 40 mg/ml	PEG 8 000 - 6 à 15 % (m/v), 20 mM AcNa, pH 5 - 2,5 à 10 % (m/v) 0,3 M AcNa, pH 4 pour des concentrations initiales en virus allant de 2,5 à 40 mg/ml dans la goutte

Tableau V-1 : Conditions explorées par microbatch et par diffusion de vapeur.

Par diffusion de vapeur, les cristaux sont obtenus de façon reproductible, après un délai de 8 à 12 jours. On obtient de petits cristaux, d'une longueur maximale de 200 µm en suspension dans la goutte, et des cristaux de 300-500 µm attachés à la lamelle de silicone. Ces cristaux sont très fragiles. De plus, ils se dégradent et se dissolvent systématiquement en moins de deux jours (Figure V-1).

Les cristaux obtenus par la méthode du microbatch restent stables pendant plusieurs mois, et les conditions sont également reproductibles. Les photographies de quelques-uns de ces cristaux sont rassemblées dans la Figure V-2.

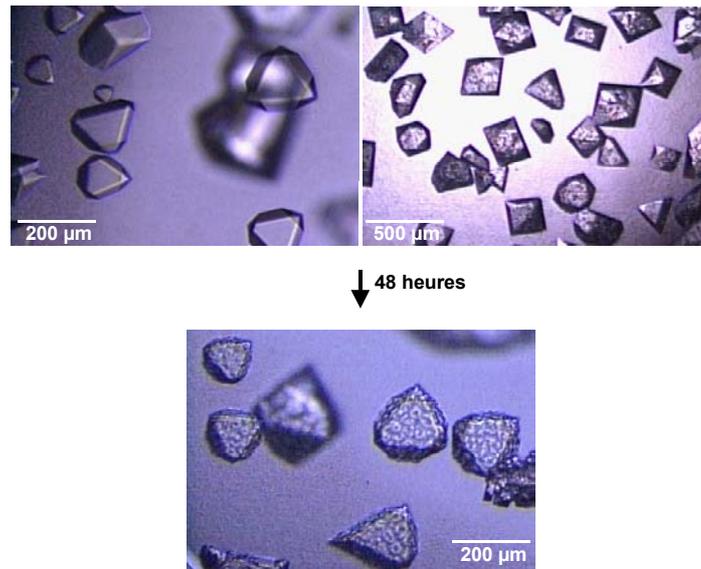
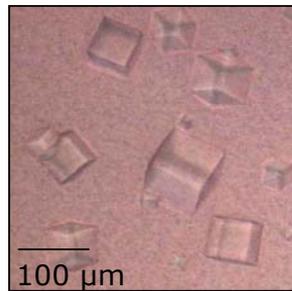
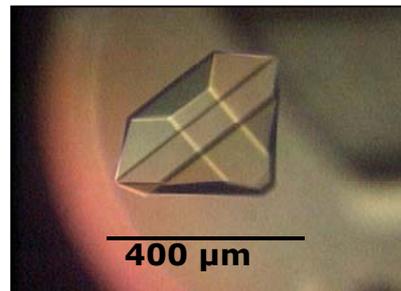


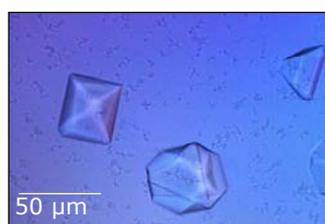
Figure V-1 : Cristaux obtenus par diffusion de vapeur. Les conditions d'obtention des cristaux (en haut) sont 10 % de PEG 8 000, 20 mM AcNa à pH 4 dans le réservoir, et une concentration initiale en BMV de 15 mg/ml, à pH 5,9. Les cristaux sont globalement de deux tailles différentes : de 50 à 200 µm pour les cristaux en solution, et de plusieurs centaines de µm pour ceux qui sont collés à la lamelle, et qui apparaissent moins facettés que les premiers. Ces cristaux se dégradent en 48 heures (en bas), puis se dissolvent complètement.



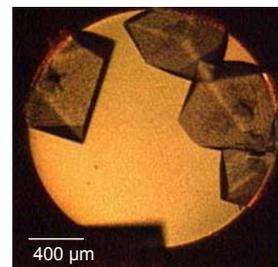
PEG 8 000 8 % (m/v)
BMV 5 mg/ml
AcNa 20 mM
pH 4



PEG 8000 4 % (m/v) à pH 4
BMV 15 mg/ml à pH 5,9
AcNa 20 mM



PEG 20 000 5 % (m/v)
BMV 5 mg/ml
pH 5,9



PEG 8000 4 % (m/v) à pH 4
BMV 20 mg/ml à pH 5,9
AcNa 20 mM

Figure V-2 : Cristallisation du BMV par la technique du microbatch. Nous avons obtenu des cristaux de tailles et de formes différentes selon le pH et la concentration en PEG et en virus.

La Figure V-3 montre l'aspect de deux échantillons précipités, après un délai d'une semaine. Le premier échantillon montre un précipité qui reste nébuleux. Le deuxième en revanche contient de petits cristaux d'environ 30 μm , difformes. Il pourrait s'agir d'un mûrissement d'Oswald (Ng et coll., 1996), phénomène qui correspond à la dissolution des plus petits cristaux en faveur des plus gros, et qui favorisent la croissance de ces derniers.

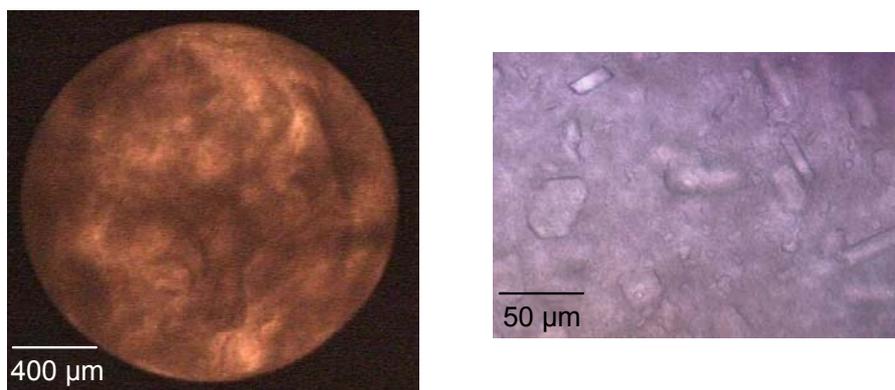


Figure V-3 : Echantillons précipités. Nous avons pu distinguer les échantillons totalement précipités (à gauche) qui n'évoluent pas au cours du temps, des échantillons précipités où quelques petits cristaux peuvent émerger (à droite).

3) Diffraction des cristaux

Cryoprotection

La présence de l'huile de paraffine au-dessus de la goutte de cristallisation peut être un handicap pour la récupération des cristaux, qui même obtenus par microbatch, sont fragiles. En revanche, cette huile nous a servi de cryoprotectant pour congeler les cristaux directement sous le faisceau d'azote (méthode du « flash-freeze », à 100°K).

L'huile de paraffine semble être un bon cryoprotectant « immédiat », car nous n'avons pas observé d'anneaux de glace sur les clichés de diffraction obtenus, mais elle ne permet pas la congélation de longue durée. En effet, les cristaux congelés en présence de paraffine et conservés 5 semaines dans l'azote liquide n'étaient plus exploitables.

Fragilité des cristaux

Les cristaux de virus sphériques sont connus pour être des édifices fragiles, et peu résistants aux rayons X (Fry et coll., 1996). Cette fragilité intrinsèque est reliée à la taille des virus, et aussi à leur forme, qui bien que facilitant leur empilement, ne favorise pas la formation de grandes surfaces d'interactions. De plus, l'équipe de Mac Pherson explique le faible pouvoir diffractant des cristaux de BMV (Lucas et coll., 2002) par l'existence de fragments d'ARN différents, et le peu de spécificité des interactions ARN-capside, qui rendent les capsides virales finalement différentes les unes des autres de par leur structure interne.

Diffraction à 8 Å

Nous avons pu utiliser la ligne microfocuse ID 13 à l'ESRF, spécialement conçue pour produire un faisceau de quelques micromètres de diamètre tout en conservant un flux important (10^{10} à 10^{13} photons. $\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$) et ainsi étudier de petits objets (monocristaux, fibres, polymères...). En collaboration avec Claudine Mayer (LMCP, Paris), nous avons placé dans le faisceau de rayons X des petits cristaux cubiques de 80 μm de côté environ obtenus par la méthode du microbatch (Figure V-2). Ces cristaux ont été congelés par la méthode du « flash-freeze ». Nous avons pu effectuer 40 mesures de 4 secondes, avec un angle de rotation d' 1° , avant d'observer la dégradation des cristaux. La limite de résolution de ces cristaux est de 8 Å.

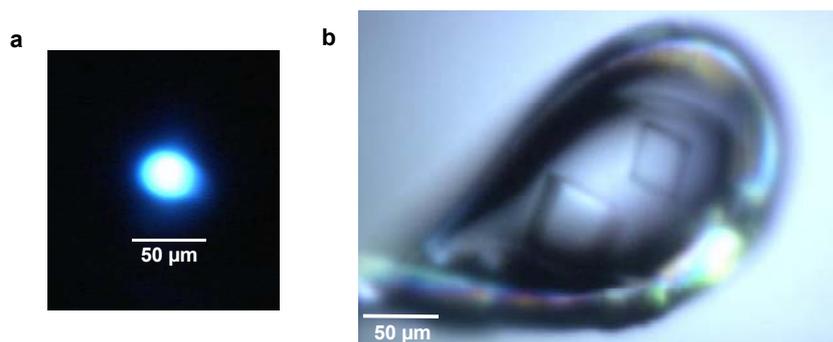


Figure V-1 : Taille du faisceau sur ID 13 et montage des cristaux. Des cristaux cubiques d'environ 80 μm de côté ont pu être récupérés dans des boucles de 200 μm .

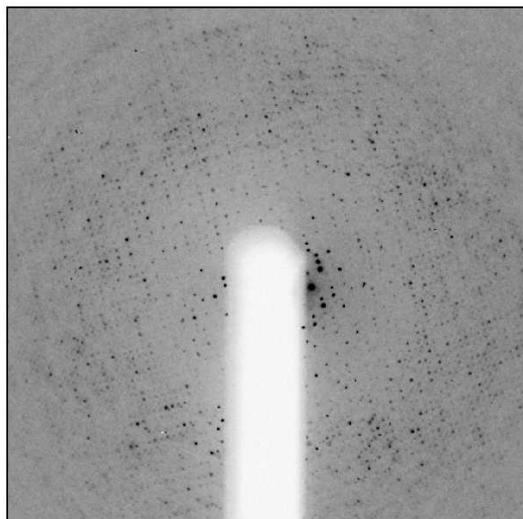


Figure V-2 : Cliché de diffraction. Les taches s'étendent jusqu'à 8 Å.

L'indexation des taches de diffraction n'a pas été possible. Cela peut être dû à une trop grande mosaïcité du cristal, ou à une mauvaise congélation.

La mosaïcité du cristal peut être due à de nombreux facteurs, tels que le diamètre variable des particules de BMV, l'hétérogénéité de l'ARN selon les virions... L'AFM a montré (Malkin et coll., 2002) que la mosaïcité de cristaux de Cucumber Mosaic Virus (CMV), un virus T = 3 de 28 nm de diamètre, était due à la formation de marches de différentes tailles causées par l'attachement aléatoire de virus sur la marche précédente durant la nucléation bidimensionnelle dans des conditions sursaturées. Les défauts des cristaux sont également dus à l'incorporation de virions de tailles anormales (entre 22 et 36 nm), et à la propagation de la distorsion qui en résulte.

Nous avons pu relier les résultats de DXPA à la cristallisation du BMV. Nous avons pu obtenir des cristaux de BMV, de tailles variables en fonction du pH et de la taille et de la concentration en PEG. Les cristaux que nous avons testés diffractent les rayons X.

Nous nous sommes intéressés également aux étapes précoces de la cristallisation, c'est-à-dire la nucléation et les premières étapes de croissance cristalline. La précipitation cristalline quasi immédiate des échantillons en présence de PEG nous a permis d'effectuer des expériences de cinétique grâce à un appareillage de mélange rapide. Les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

V-B. Caractérisation des pics de diffraction obtenus avec les échantillons de BMV précipités

La compréhension des étapes précoces de cristallisation, c'est-à-dire la nucléation, pourrait permettre de mieux définir les conditions de cristallisation. La formation des noyaux de nucléation est directement reliée à la sursaturation du milieu. De plus, il est généralement admis que dans le cas de molécules sphériques, les noyaux de nucléation ont eux-mêmes une forme sphérique.

Nous avons voulu obtenir des informations sur la taille et la structure des microcristaux que nous avons détectés lors des expériences effectuées au LURE. En effet, un excès de PEG provoque la formation massive de microcristaux, ce qui correspond à un taux de nucléation très élevé. Toutefois, nous n'avons pas pu déterminer si la formation des microcristaux avait lieu dans l'ordre de la milliseconde, de la seconde ou de la minute. Même si la précipitation de l'échantillon est immédiatement révélée par la formation d'un nuage blanchâtre lors de l'ajout de PEG dans la solution virale, l'échantillon lui-même est soumis aux radiations plusieurs minutes seulement après le mélange, le temps de l'injecter dans la cellule, de refermer les portes de la chambre d'expérimentation et d'ouvrir le faisceau. A l'ESRF, nous avons pu, grâce à un « appareil de mélange rapide », effectuer des mesures d'intensité diffusée quelques millisecondes seulement après le mélange du virus et du PEG.

Les résultats présentés ici ont fait l'objet d'un article présentant une analyse préliminaire : « Time-resolved scattering investigations of brome mosaic virus microcrystals appearance », M. Casselyn, S. Finet, A. Tardieu et H. Delacroix, *Acta D* (2002), D58, 1568-1570 (Casselyn et coll., 2002). Un autre article est en préparation.

1) Caractéristiques des signaux de diffraction observés

Nous avons effectué toutes nos expériences à pH 5,9, pH de stockage du BMV, pour des facilités de concentration du virus et de dispositif expérimental, mais également parce que la variation du pH provoque une modification structurale du virus. Nous avons utilisé trois tailles de PEG : 3 000 (PEG 3), 8 000 (PEG 8) et 20 000 (PEG 20). Les concentrations finales en virus étaient de 2,5, 5, 10 et 20 mg/ml, en présence de 2,5, 5 ou 10 % (m/v) de PEG. Le facteur de forme, représenté dans Figure V-1, a été déterminé grâce à un échantillon contenant 2,5 mg/ml de BMV, sans agent précipitant.

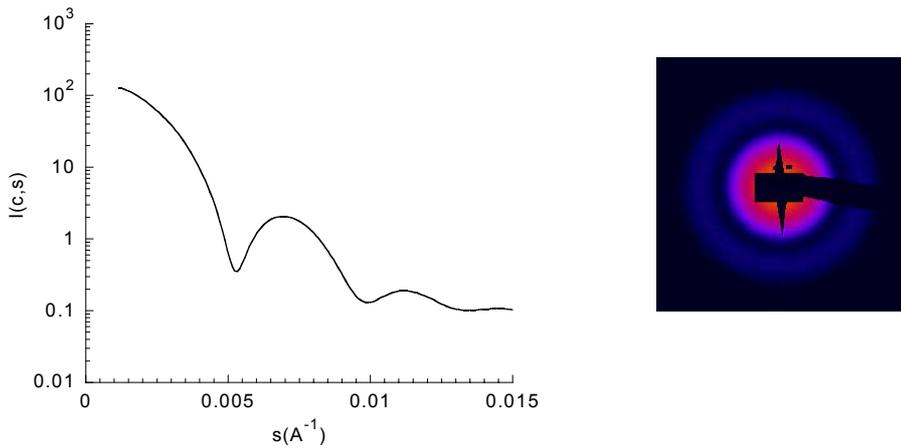


Figure V-1 : Diffusion du BMV en solution à pH 5,9.

A gauche : facteur de forme. Le signal de l'échantillon à 2,5 mg/ml de BMV a été utilisé comme facteur de forme du virus aux plus petits angles ($1,17 \cdot 10^{-3}$ à $4,62 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$), et complété avec le signal de l'échantillon à 20 mg/ml pour améliorer le rapport signal/bruit aux plus grands angles.

A droite : anneaux de diffusion caractéristiques du BMV sur la caméra CCD.

Nous avons pu observer les spectres d'intensité dès 180 ms après le mélange des trois composants. Le PEG et le tampon de dilution étaient injectés en même temps dans le premier mélangeur, puis mélangés au virus. Les expériences effectuées sur ID2 nous ont permis de retrouver les propriétés du PEG relatives à sa taille et à sa concentration : la précipitation apparaît plus rapidement avec l'utilisation du PEG 20, qu'avec le PEG 8 et le PEG 3 (Figure V-2). De plus, la cinétique d'apparition et de croissance des pics de diffraction, ainsi que leur hauteur et leur nombre, sont également reliées à la taille et à la concentration du PEG.

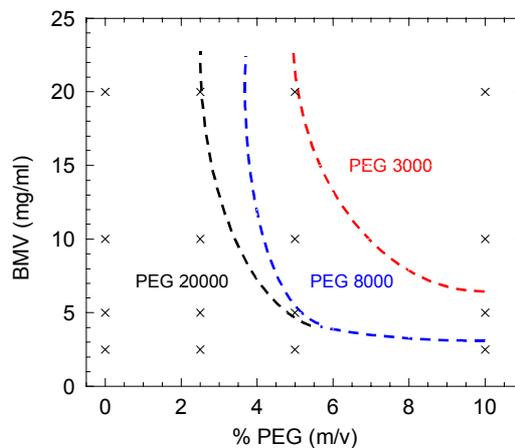


Figure V-2 : Conditions testées avec les 3 tailles de PEG. Les courbes en pointillés délimitent les zones où les échantillons sont restés solubles, des zones où la séparation de phase apparaît, pour chacun des 3 PEG. On peut observer un décalage de ces courbes vers les plus hautes concentrations en PEG et en virus avec la diminution de la taille du PEG.

La Figure V-3 montre les spectres 2D caractéristiques de l'évolution au cours du temps d'un échantillon précipité. Ces données ont été enregistrées entre 180 ms et 25 min après le mélange du BMV et du PEG.

Le premier spectre ne se distingue du spectre de diffusion de l'échantillon utilisé comme facteur de forme que par la présence de quelques points de diffraction, qui correspondent à des microcristaux. Ces points deviennent de plus en plus nombreux, montrant la formation de microcristaux en grand nombre, et forment au cours du temps les anneaux caractéristiques de la diffraction dite sur poudre, qui correspond à la diffraction d'un ensemble de petits cristaux orientés dans toutes les directions.

Les spectres 2D de cette figure montrent qu'il n'existe que deux espèces en solution : le virus soluble, caractérisé par les anneaux de diffusion, et le virus cristallisé, caractérisé par les anneaux de diffraction. Aucun anneau d'interférence pouvant correspondre à un état intermédiaire (amorphe) du virus n'est observable.

Les 3 spectres 1D qui sont représentés dans la même figure, à 0,180, 5 et 1511 secondes après le mélange, montrent l'évolution de la hauteur des pics de diffraction au cours du temps. Ces signaux montrent encore les lobes caractéristiques de la diffusion de particules sphériques. Les lobes disparaissent au cours du temps, ce qui indique qu'il y a de moins en moins de virus libres en solution.

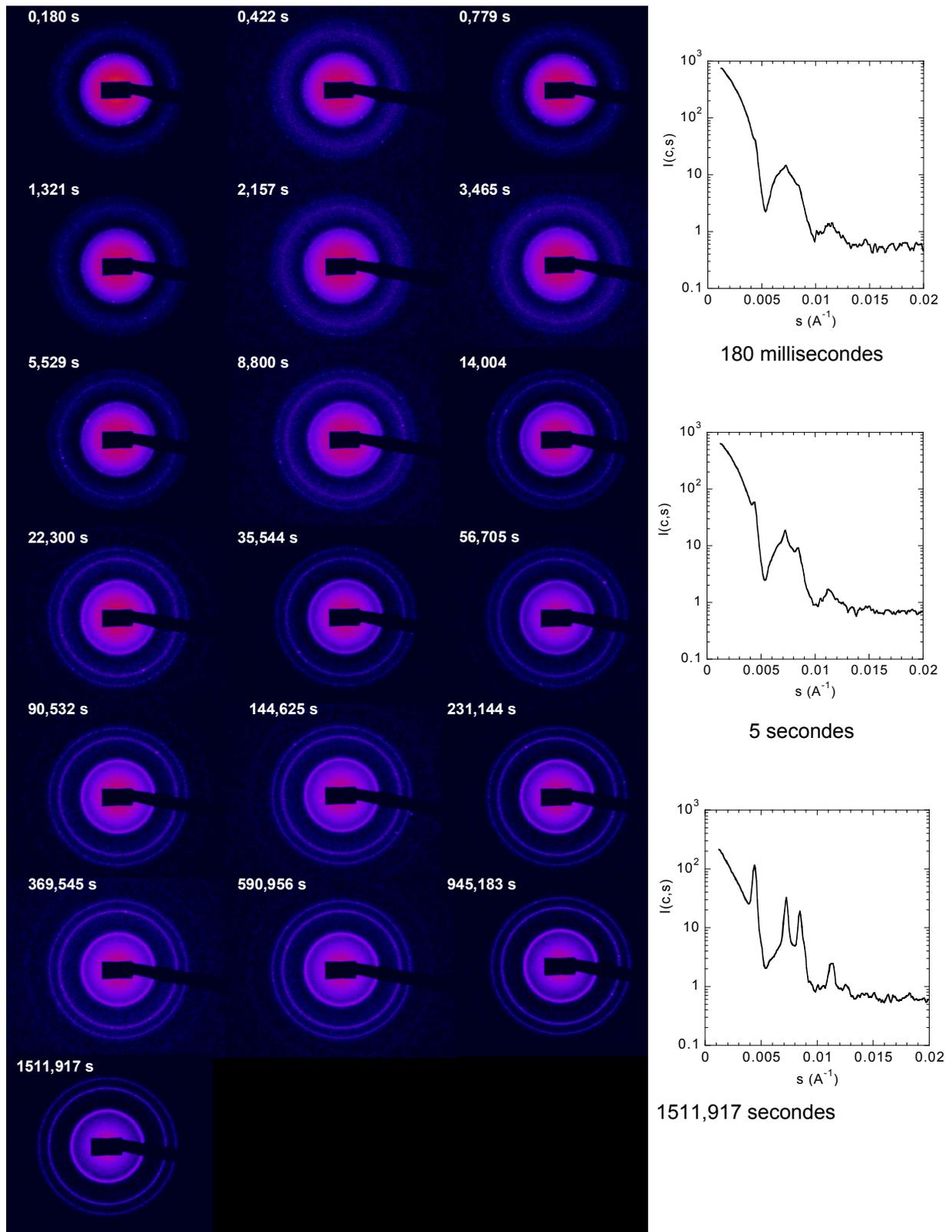


Figure V-3 : Evolution du signal diffusé par un échantillon contenant 10 mg/ml de BMV et 5 % de PEG 20 000 au cours du temps. Les anneaux de diffraction sont constitués des points de diffraction correspondant à la formation de nouveaux microcristaux. A droite, les signaux d'intensité montrent la croissance des pics de diffraction au cours du temps .

La Figure V-4 représente la cinétique d'apparition et de croissance des pics de diffraction pour les trois tailles de PEG. Pour chaque condition, le signal de l'intensité diffusée $I(c,s)$ et le facteur de structure $S(c,s)$ résultant de la division de $I(c,s)$ par le facteur de forme ont été représentés. Le calcul de $S(c,s)$ fait ressortir les pics de diffraction, en éliminant la contribution de la forme sphérique du BMV au signal. On retrouve, en plus de nouveaux pics, les 4 pics d'intensité obtenus dans les mesures du LURE.

Nous avons représenté dans cette figure les signaux correspondant aux échantillons contenant 5% (m/v) de PEG 20 000 avec 10 mg/ml de BMV (a), 5% (m/v) de PEG 8 000 avec 10 mg/ml de BMV (b), et 10% (m/v) de PEG 3 000 avec 20 mg/ml de BMV (c). Dans chaque cas, la croissance des pics est régulière au cours du temps.

L'utilisation de 10 % de PEG 8000 et de PEG 3 000 provoque la formation de 4 pics de diffraction. Bien que la concentration en PEG 20 000 soit deux fois inférieure (5 %), les pics obtenus sont mieux définis et plus nombreux. En effet, ce qui n'était qu'un épaulement avec les deux autres tailles de PEG vers $s = 0,005 \text{ \AA}^{-1}$ devient un pic avec le PEG 20. Un autre épaulement apparaît aux environs de $s = 0,009 \text{ \AA}^{-1}$.

La hauteur finale des pics obtenus avec le PEG 3 000 est deux fois plus haute que celle des pics obtenus avec le PEG 20 000 et le PEG 8 000, ce qui rend compte de la différence de concentration initiale en virus.

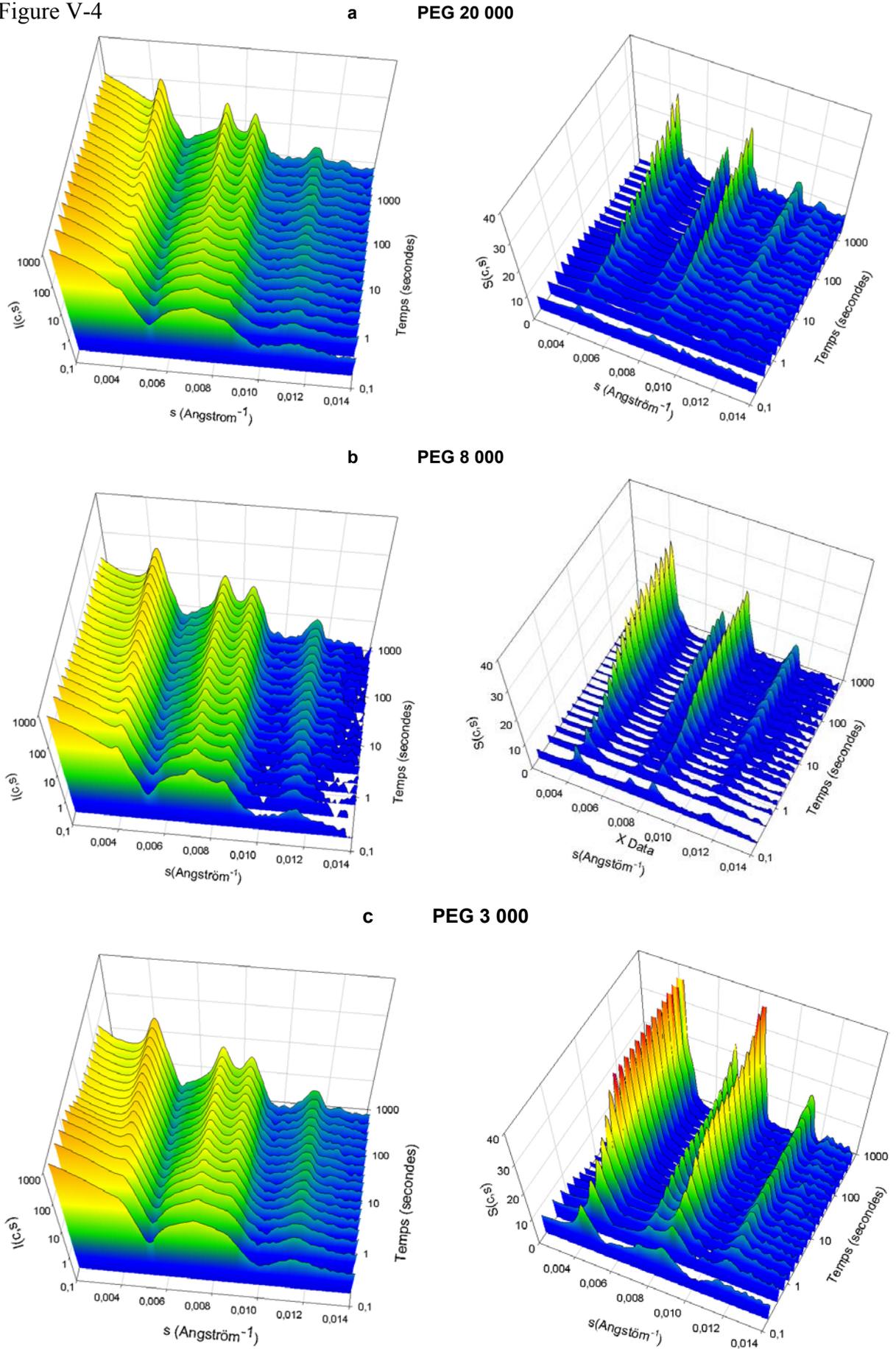
Figure V-4 (page suivante) : Cinétique de croissance des pics de diffraction. Les signaux de diffusion $I(c,s)$ (à gauche) ont été divisés par le facteur de forme du virus, afin d'obtenir le facteur de structure de l'échantillon (à droite).

(a) 5 % (m/v) de PEG 20 000, 10 mg/ml de BMV.

(b) 10 % (m/v) de PEG 8 000, 10 mg/ml de BMV. Les pics sont moins bien différenciés qu'avec le PEG 20 000.

(c) 10 % (m/v) de PEG 3 000, 20 mg/ml de BMV. La hauteur finale des pics est 2 fois plus haute qu'avec les deux autres échantillons.

Figure V-4



2) *Indexation des pics de diffraction*

Grâce à la haute brillance de la ligne ID2, le nombre de pics de Bragg observables est plus important qu'avec les résultats obtenus au LURE (Figure V-1).

Les expériences réalisées avec de fortes concentrations de virus et de PEG nous ont permis d'observer jusqu'à 7 pics de diffraction, dont l'un se dédouble (le pic n°6). La position de ces pics, reste la même, quelque soit la concentration ou la taille du PEG utilisé. Ce résultat nous a permis de déterminer le système auquel appartiennent les microcristaux.

L'indexation des pics de diffraction est représentée dans la Figure V-2. Leur espacement est compatible avec un système cubique face centrée.

La seule réflexion absente dans nos signaux de diffraction est la réflexion (400), qui devrait avoir pour position $s = 0,01024 \text{ \AA}^{-1}$. Bien qu'un pic semble émerger à cette position dans la Figure V-1, nous préférons ne pas le prendre en compte dans la suite car cette valeur de s correspond également à la position du deuxième minimum du facteur de forme par lequel les signaux sont divisés, ce qui rend les valeurs imprécises. De plus, il n'apparaît pas clairement dans les autres conditions.

Les cristaux utilisés pour déterminer la structure atomique du BMV à haute résolution (Lucas et coll., 2002) appartiennent à un système rhomboédrique et à un système orthorombique, mais ils ont été obtenus dans des conditions très différentes, en diffusion de vapeur, le réservoir contenant 23 % de PEG 550 mono-méthyl et 0,1 M d'acétate de magnésium à pH 5,2.

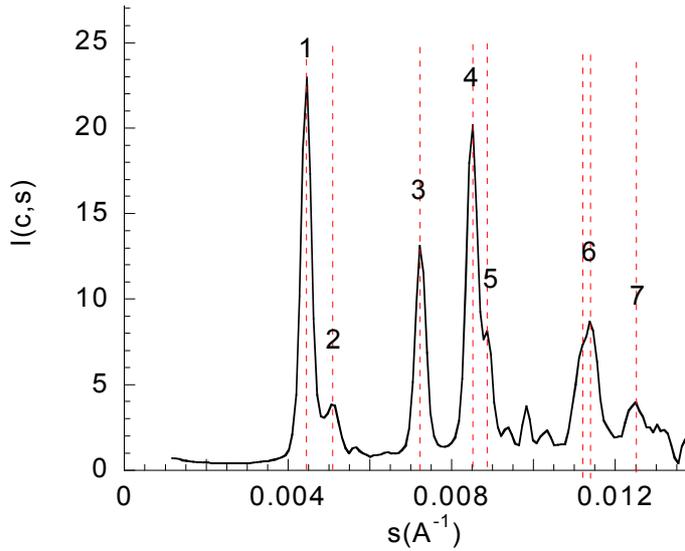
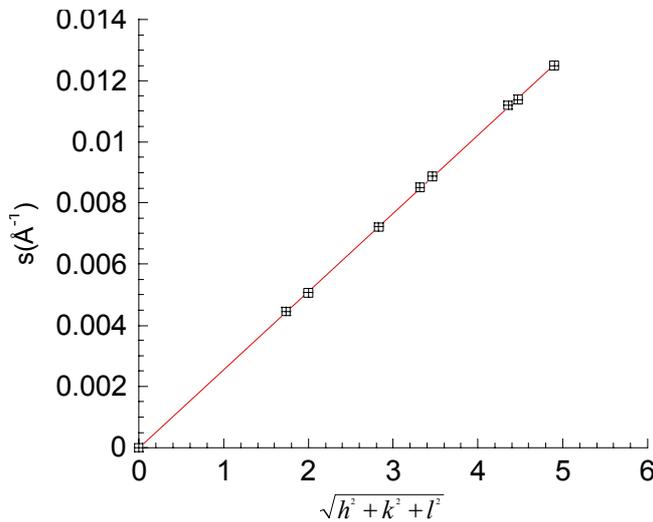


Figure V-1 : Position des pics de diffraction. Le signal de diffraction provient de l'échantillon contenant 10 mg/ml de BMV et 10 % de PEG 20 000, 25 minutes après le mélange.



réflexions permises pour un système cfc	valeurs de s observées	s_R	pic°
(111) $\sqrt{3}$	0.00445	0.00443	#1
(200) $\sqrt{4}$	0.00506	0.00511	#2
(220) $\sqrt{8}$	0.00722	0.00723	#3
(311) $\sqrt{11}$	0.00852	0.00847	#4
(222) $\sqrt{12}$	0.00887	0.00886	#5
(400) $\sqrt{16}$	autour de 0.01	0.01024	--
(331) $\sqrt{19}$	0.01120	0.01115	}#6
(420) $\sqrt{20}$	0.01138	0.01147	
(422) $\sqrt{24}$	0.01250	0.01253	#7

Figure V-2 : Indexation des pics de Bragg par régression linéaire. L'espacement entre les pics visibles dans la Figure V-1 est caractéristique d'un système cubique face centrée (cfc). (entre chaque canal, $\Delta s = 0.0865 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$)

3) Taille des microcristaux

Les pics de diffraction peuvent être approximés par une Gaussienne (Figure V-1). Le diamètre des microcristaux peut ainsi être calculé, à partir de la transformée de Fourier de la Gaussienne, qui est elle-même une Gaussienne de largeur $\omega_2 = 2/\pi\omega_1$.

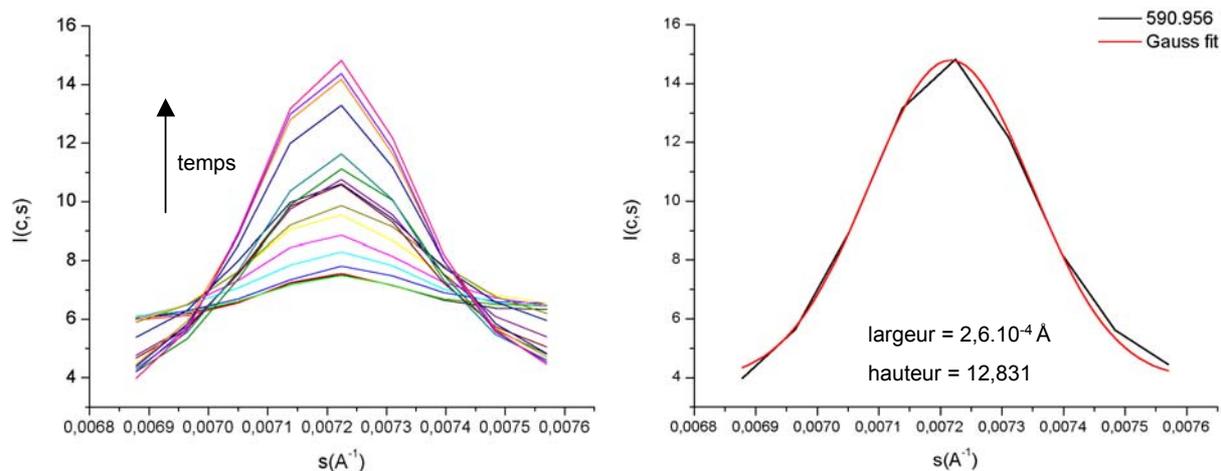


Figure V-1 : Exemple de la détermination de la largeur et de la hauteur des pics de diffraction. Le pic n°3 ou (220), dont l'évolution au cours du temps est reportée à gauche, peut être approximé par une Gaussienne (à droite), ce qui permet de déterminer la largeur et la hauteur du pic. Ces données sont directement calculées par le logiciel Origin 6.1®. L'exemple montré ici correspond à l'échantillon contenant 5% de PEG 20 000 et 10 mg/ml de BMV.

Les pics obtenus avec le PEG 8000 et le PEG 20 000, quelle que soit la concentration en PEG ou en virus, ont une largeur à mi-hauteur presque constante, qui est comprise entre $2,3$ et $2,6 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^{-1}$. Les microcristaux ont un diamètre compris entre 2500 \AA et 2800 \AA .

En revanche, les mesures qui correspondent à l'échantillon contenant 10 % de PEG 3000 et 20 mg/ml de BMV, permettent de suivre l'augmentation de la taille des microcristaux au cours du temps. Hauteur et largeur évoluent parallèlement. Les premiers microcristaux observables ont un diamètre de 800 \AA environ, et à la fin des mesures ils atteignent un diamètre de 1800 \AA .

Les microcristaux appartiennent à un système cubique face centrée (Figure V-2 a). Dans ce système, 74% de la maille sont occupés par le virus, et la diagonale des faces de la maille est égale à 4 fois le rayon r du volume occupé par le virus (Figure V-2 b). Pour une maille de 391 \AA de côté, ce rayon est égal à 138 \AA . Le volume occupé par un seul virus est donc de $11 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$. Ainsi, les microcristaux de 800 \AA de diamètre seraient composés de 18 particules virales. Les noyaux de nucléation sont sûrement plus petits que 800 \AA , qui la plus petite taille que nous ayons pu déterminer.

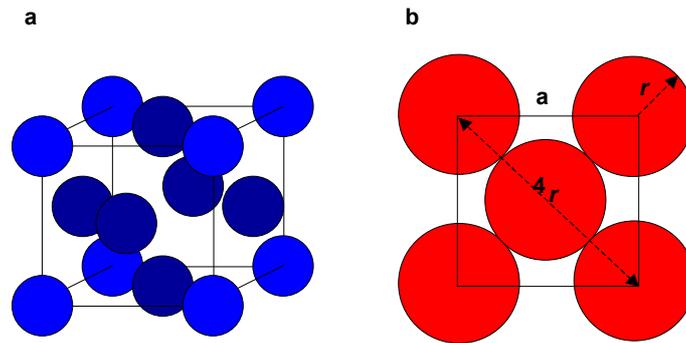


Figure V-2 : Système cubique face centrée.

a) Chaque maille contient l'équivalent de 4 particules virales entières.

b) Le côté a de la maille est relié au rayon r du volume occupé par un virus par la relation $a = \sqrt{2}r$. Le volume total de la maille est donc de $16\sqrt{2}r^3$, et le volume occupé par les 4 virus est de 74 % ($\pi/(3\sqrt{2})$) du volume de la maille.

La cinétique d'apparition et de croissance des microcristaux dans ces échantillons est étudiée plus en détails dans le paragraphe suivant.

4) Cinétique de croissance et nucléation

La Figure V-1 montre l'évolution régulière et continue des pics de diffraction au cours du temps.

La division par le facteur de forme met en évidence une nouvelle fois qu'il n'existe que deux espèces en solution : le virus soluble, et le virus sous sa forme cristalline.

La hauteur du plateau que l'on peut observer aux plus petits angles dans le facteur de structure (Figure V-4, Figure V-1 a) est relié à la décroissance de la concentration du virus soluble au cours du temps. Le fit linéaire de ces plateaux a permis d'approximer les concentrations finales à moins de 2 mg/ml avec l'utilisation de 10 % de PEG 8 et 20, et inférieure à 4 mg/ml en utilisant 10 % de PEG 3. Avec 5 % de PEG 8 et 20, la concentration finale est inférieure à 3,5 mg/ml. Ces valeurs donnent une estimation de la solubilité du virus. Les virus solubles en solution se retrouvent sous forme cristalline soit pour la création de nouveaux noyaux de nucléation, donc de nouveaux microcristaux, soit pour permettre l'augmentation de la taille des microcristaux déjà formés.

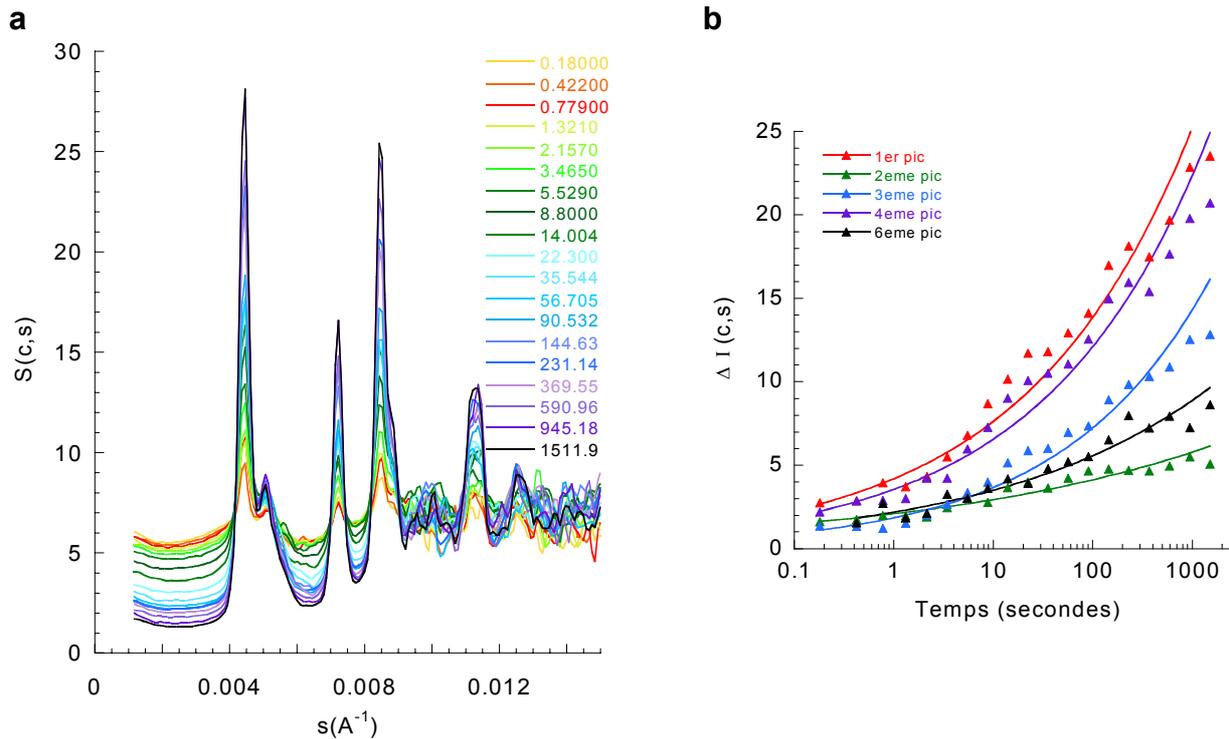


Figure V-1 : Croissance des pics de diffraction au cours du temps dans un échantillon contenant 5 % (m/v) de PEG 20 000 et 10 mg/ml de BMV.

(a) La division de l'intensité diffusée par le facteur de forme du virus met en évidence qu'il n'existe que deux espèces en solution : le virus sous sa forme soluble, et le virus cristallisé. Le plus haut plateau est proportionnel à la concentration initiale en virus dans la solution, et le dernier plateau est proportionnel à la concentration finale.
 (b) Evolution de l'intensité des pics de diffraction.

La cinétique de formation des microcristaux peut être suivie en déterminant l'évolution au cours du temps de la hauteur et de la largeur des pics de diffraction. D'une façon schématique, la hauteur des pics correspondant à l'intensité du signal diffracté, l'augmentation du nombre de microcristaux se traduit par une augmentation de la hauteur des pics, et la variation de leur taille par une diminution de la largeur des pics couplée à l'augmentation de leur hauteur (Figure V-2). Les résultats suivants ne traiteront que du pic n°3 ou (220), situé à $s = 0,0072 \text{ \AA}^{-1}$, car c'est le seul pic qui ne supporte pas d'épaulement ou qui ne se divise pas, et qui peut donc être correctement étudié dans toutes les conditions.

Pour chaque condition, les pics de diffraction ont été approximés par une Gaussienne de largeur à mi-hauteur ω_1 (Figure V-1). Nous pouvons ainsi déterminer la largeur et la hauteur $\Delta I(c,s)$ des pics.

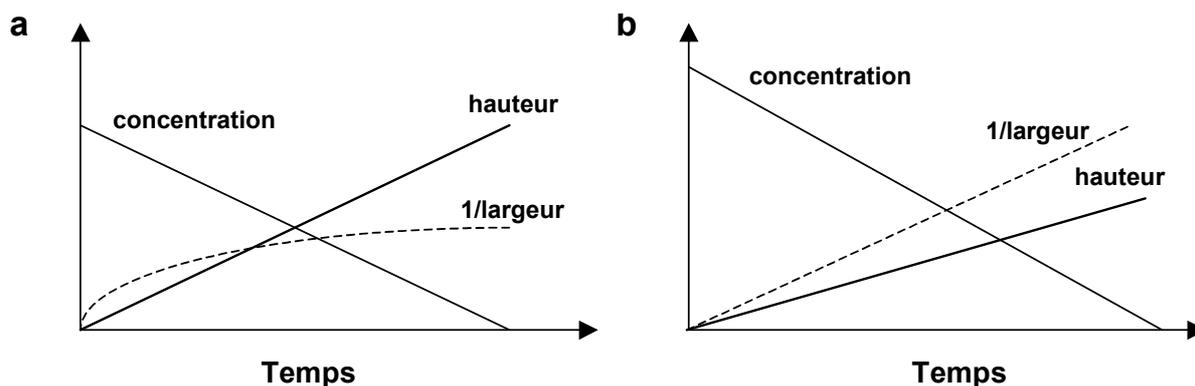


Figure V-2 : Relations entre décroissance de la concentration, et hauteur et largeur des pics. Les virus en solution sont utilisés soit principalement pour la création de nouveaux microcristaux (a), soit également pour l'augmentation de la taille des microcristaux déjà formés (b).

Les Figure V-3, Figure V-4, et Figure V-5 montrent l'évolution de l'intensité des pics de diffraction et de la concentration en virus soluble au cours du temps pour des échantillons contenant 10 mg/ml de BMV, en présence de 10 % de PEG 8, de 5 % de PEG 20 et de 10 % de PEG 20 respectivement.

Avec ces deux tailles de PEG, on ne peut pas observer d'évolution majeure au cours du temps de la largeur des pics de diffraction, qui est en moyenne de $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^{-1}$ avec le PEG 8, et de 2,7 à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^{-1}$ avec le PEG 20. Les microcristaux ont un diamètre d'environ 1800 Å avec le PEG 8, et de 2400 à 2500 Å avec le PEG 20. On peut supposer que la vitesse de nucléation étant d'autant plus rapide que le polymère est grand, on ne peut distinguer les microcristaux déjà formés des noyaux de nucléation avec le PEG 20 et le PEG 8.

Les deux derniers signaux d'intensité représentés dans la Figure V-5, mesurés 532 et 832 secondes après le mélange, semblent beaucoup moins intenses que les précédents, ce qui se traduit par la diminution de la hauteur des pics de diffraction. Ces pics gardent cependant leur forme bien définie, ce qui indique que la résolution est la même et que les microcristaux ne se sont pas dissous. La diminution du signal traduit la sédimentation des plus gros microcristaux hors du faisceau.

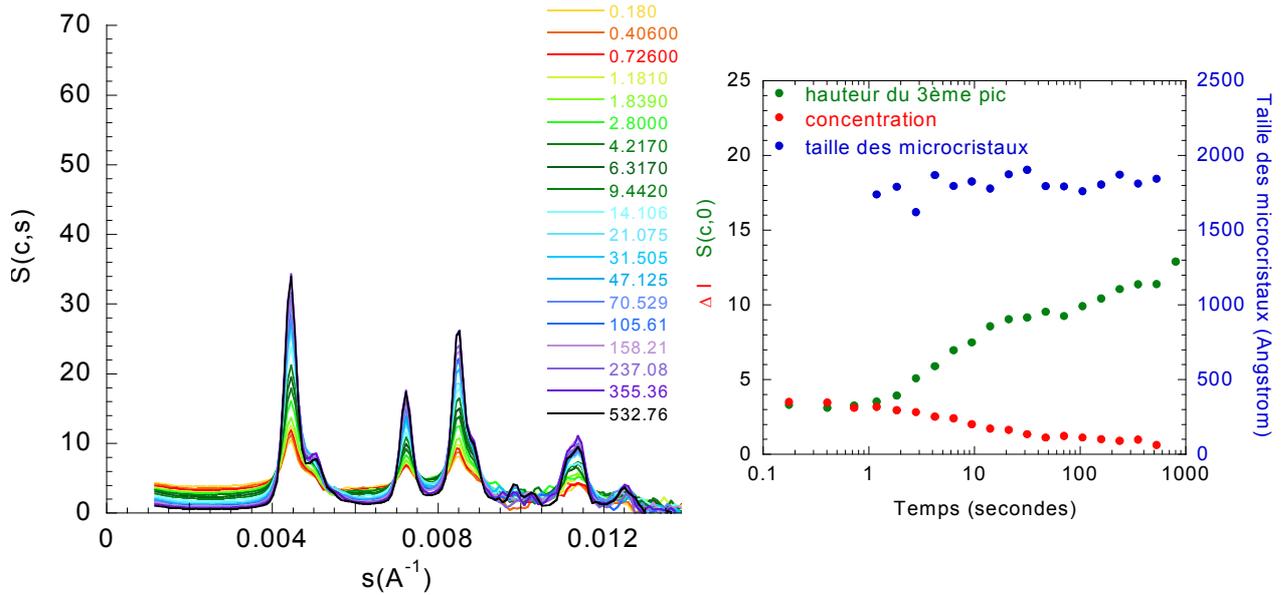


Figure V-3 : Diffraction de l'échantillon contenant 10 % (m/v) de PEG 8 000 et 10 mg/ml de BMV.

A gauche : l'évolution des pics de diffraction est régulière au cours du temps.

A droite : la diminution de la concentration en BMV est parfaitement corrélée à l'augmentation de la hauteur des pics de diffraction. La taille des microcristaux ne semble pas évoluer au cours du temps.

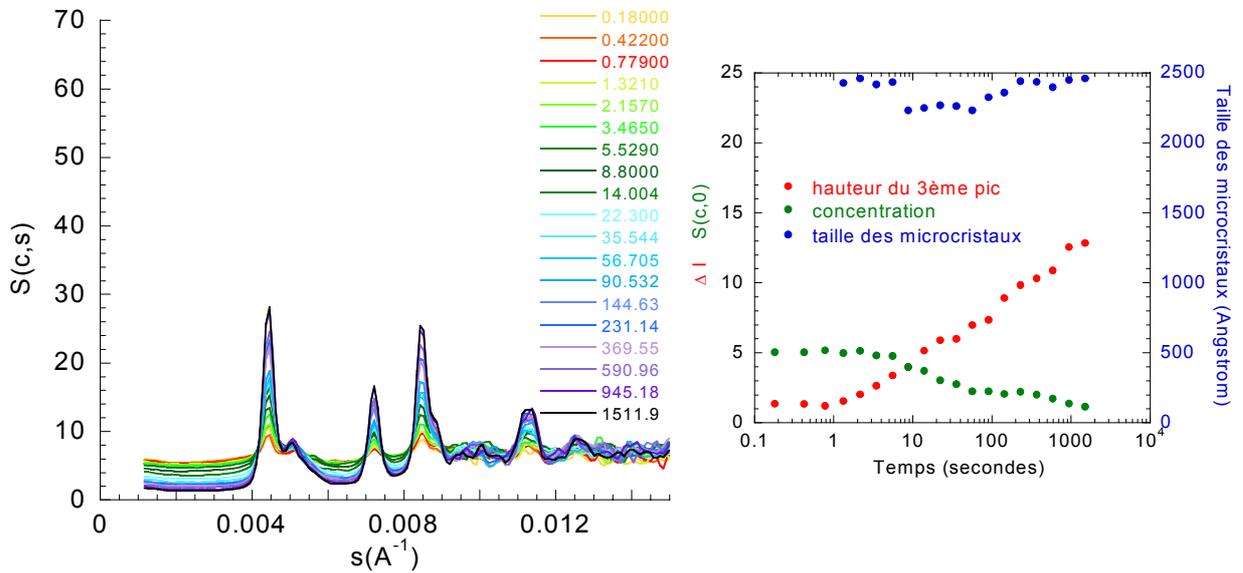


Figure V-4 : Diffraction de l'échantillon contenant 5 % (m/v) de PEG 20 000 et 10 mg/ml de BMV.

A gauche : évolution régulière des pics au cours du temps.

A droite : la concentration en virus solubles diminue de façon linéaire au cours du temps.

On n'observe pas d'évolution de la taille des microcristaux.

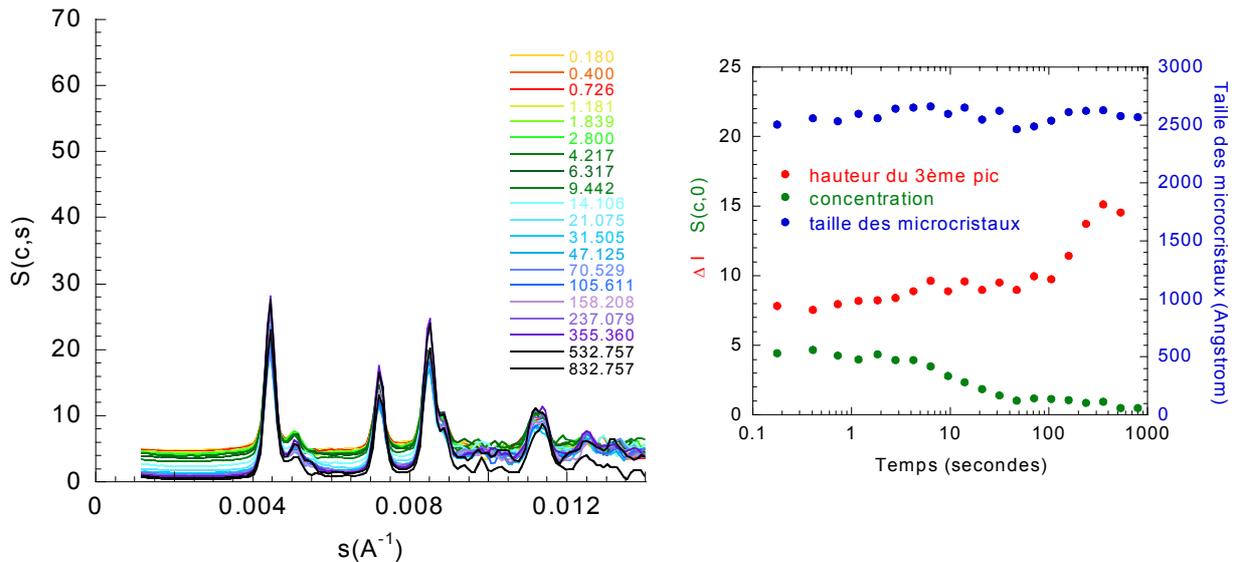


Figure V-5 : Diffraction de l'échantillon contenant 10 % (m/v) de PEG 20 000 et 10 mg/ml de BMV.

A gauche : les deux derniers signaux diffractés sont plus bas que les autres, mais les pics de diffraction restent les mêmes. Les microcristaux sédimentent au fond de la cellule.

A droite : la concentration en virus solubles diminue de façon linéaire au cours du temps. Le pic de diffraction n°3 est déjà haut dès la première mesure, ce qui peut être dû à la présence de microcristaux résiduels dans la cellule. La taille de microcristaux est constante au cours du temps.

Dans le cas de l'échantillon contenant 10 % de PEG 3 et 20 mg/ml de BMV, on peut observer une évolution simultanée de la croissance des pics et une diminution de leur largeur, 1 à 2 secondes environ après le mélange (Figure V-6). Dans cette expérience, on distingue clairement deux étapes : la nucléation, qui a lieu dans les 12 premières secondes après le mélange, puis la croissance cristalline. La taille des microcristaux évolue de 800 Å de diamètre, à 1800 Å de diamètre environ.

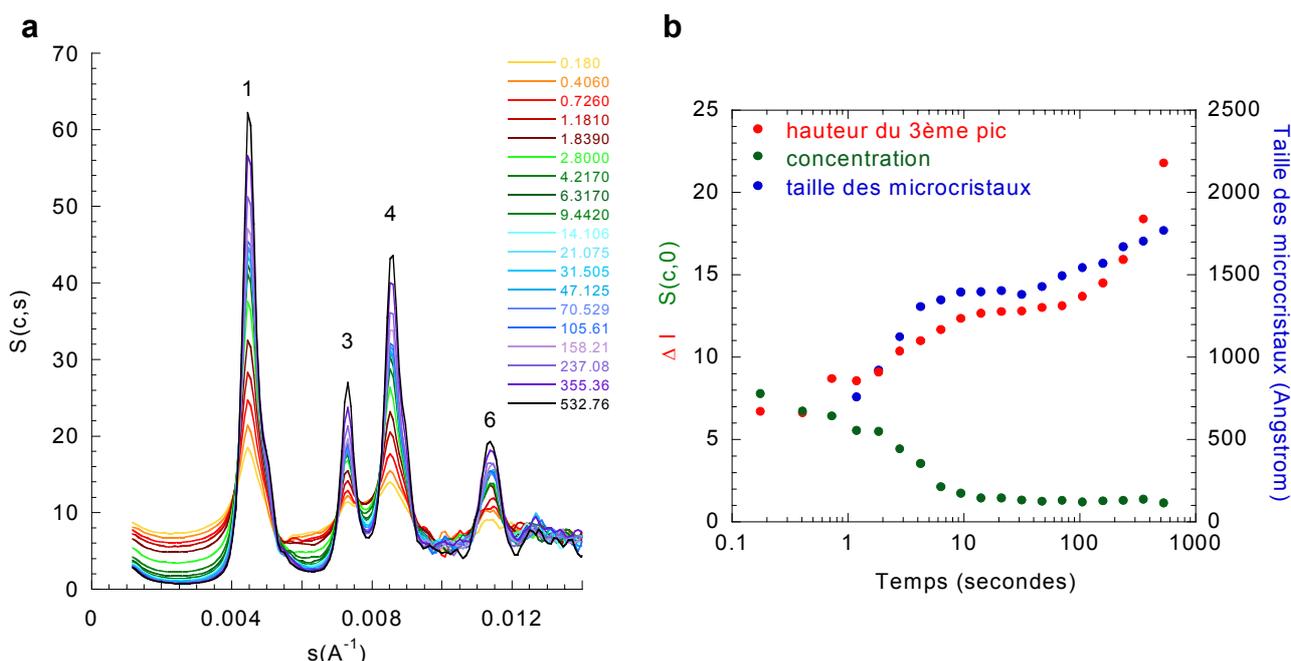


Figure V-6 : Diffraction de l'échantillon contenant 10 % (m/v) de PEG 3 000 et 20 mg/ml de BMV.

(a) Les pics sont moins bien définis qu'avec les PEG 8 000 et 20 000, mais leur croissance est constante au cours du temps. La hauteur finale des pics est deux fois plus élevée qu'avec 10 mg/ml de BMV.

(b) Les pics s'affinent au cours du temps, ce qui montre une évolution de la taille des microcristaux. On observe deux phases distinctes, l'une correspondant à la nucléation, et la deuxième à la croissance des microcristaux.

La Figure V-7 indique que l'intensité des pics de diffraction à la fin des mesures est directement reliée à la concentration en virus. En effet, les échantillons contenant 10 mg/ml de BMV présentent des hauteurs finales de pics comparables (Figure V-7 a). De plus, les pics obtenus avec 20 mg/ml de virus ont une hauteur finale presque égale au double de celle obtenue avec 10 mg/ml. La décroissance du signal à la fin de l'expérience indique que les microcristaux ont sédimenté au fond de la cellule et se retrouvent hors du faisceau.

Le temps de latence de formation des microcristaux est relié à la taille et à la concentration du PEG (Figure V-7 a). Il est d'environ 2 secondes pour les échantillons précipités contenant 5 et 10 % de PEG 20, ou 10 % de PEG 3 et 8, et 10 ou 20 mg/ml de BMV. En revanche, on voit que la croissance du 3ème pic « démarre » 10 secondes après le mélange pour la condition 5 % de PEG 8 000, 10 mg/ml de BMV.

Une fois ce temps de latence dépassé, la vitesse de formation des microcristaux n'est plus seulement dépendante du PEG, mais aussi reliée à la concentration en virus, c'est-à-dire à la sursaturation du milieu, comme le montre la pente des courbes de croissance des pics de diffraction (Figure V-7 b) : la vitesse de croissance des pics est plus rapide avec 20 mg/ml de BMV qu'avec 10 mg/ml, mais elle est aussi plus rapide en utilisant 10 % de PEG 20 que 10 % de PEG 3.

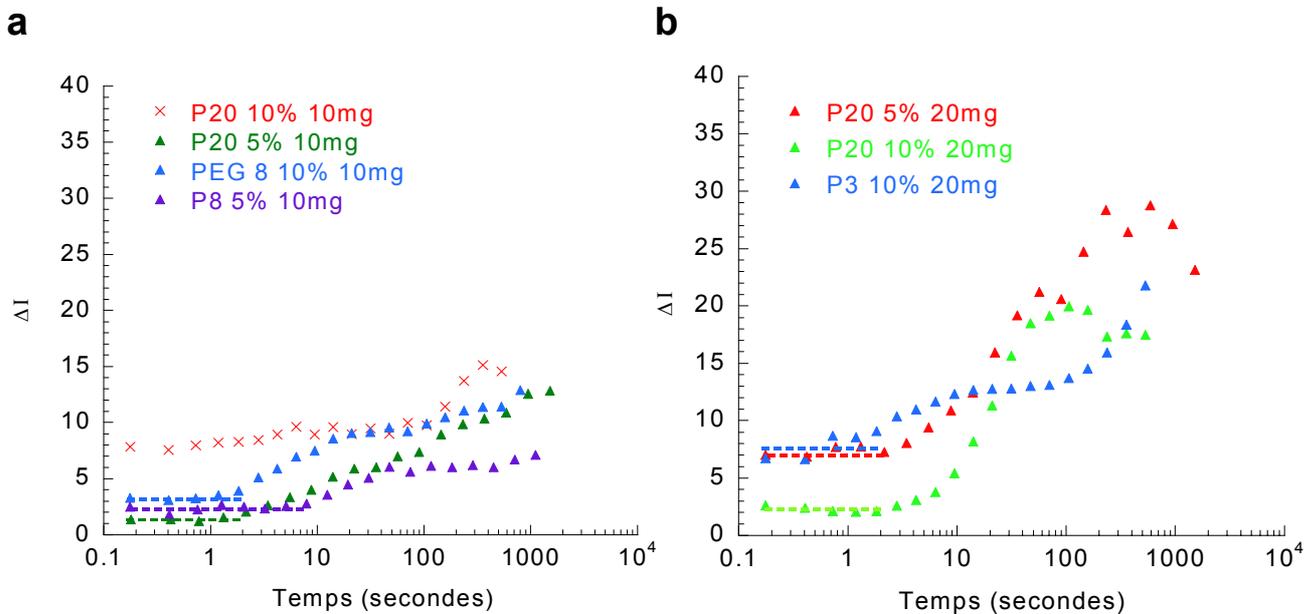


Figure V-7 : Croissance des pics de diffraction en fonction de la concentration en BMV, et de la concentration et de la taille du PEG. Le temps de latence pour la formation des microcristaux est indiqué par une ligne en pointillés.

(a) La concentration en BMV est de 10 mg/ml. La hauteur finale des pics est la même, mais la vitesse de nucléation est moins importante avec 5 % (m/v) de PEG 8000. L'utilisation de 10 % de PEG 8 000 est aussi efficace que l'utilisation de PEG 20 000.

(b) La concentration en BMV est de 20 mg/ml. Les temps de latence sont identiques pour les deux PEG utilisés, mais la vitesse de nucléation est supérieure avec le PEG 20 000.

La croissance des pics de diffraction cesse lorsqu'il n'y a plus suffisamment de virus solubles dans l'échantillon. La densité optique mesurée pour des échantillons équivalents en composition à ceux utilisés pour la DXPA a montré qu'il restait moins d'1 mg/ml de BMV en dans la phase soluble 30 minutes après le mélange des composants pour les échantillons

contenant 10 et 20 mg/ml de virus, et 5 et 10 % (m/v) de PEG. Dans cette même phase, on retrouve par des mesures d'indices de réfraction entre 88 et 98 % du PEG.

L'utilisation du « stopped-flow » nous a permis de montrer que la cinétique de nucléation et de croissance des microcristaux était directement liée à la sursaturation du milieu, c'est-à-dire à la concentration en BMV. Le délai d'apparition des microcristaux, entre 2 et 10 secondes après le mélange selon les conditions, semble toutefois dépendre de la concentration en PEG.

Le pouvoir diffractant des microcristaux, relié à leur taille puisque le même système cristallin cubique face centrée est retrouvé dans tous les échantillons précipités, dépend de la taille et de la concentration en PEG : 8 pics de diffraction ont été obtenus en utilisant le PEG 20 000 à 10 % (m/v).

Les plus petits microcristaux contiennent moins de 20 particules virales. Ils ont été obtenus environ 2 secondes après le mélange, en présence de PEG 3 000. Même si l'on ne sait pas avec certitude s'ils correspondent à des noyaux de nucléation critiques, nous pouvons maintenant affirmer que les noyaux ont une taille inférieure ou égale à celle de ces microcristaux, que la nucléation a lieu dans l'ordre de la seconde, et que leur organisation est cristalline, car on n'observe pas de phase amorphe intermédiaire.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les expériences réalisées nous ont permis d'étudier les variations de la structure du Virus de la Mosaïque du Brome (BMV) par cryomicroscopie et diffusion des rayons X aux petits angles, et les interactions qui mènent à sa cristallisation.

Lors de leur entrée dans les cellules hôtes, les virus subissent un changement structural nécessaire à leur prolifération. Le gonflement du Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV), à l'origine du désassemblage de la capsidie couplé à la traduction de l'ARN viral, a été très étudié, et les structures du CCMV et du BMV sont suffisamment proches pour attribuer les mêmes propriétés de dynamique structurale aux deux virus. Jusqu'à présent, deux hypothèses sont avancées : soit l'ARN viral est traduit et libéré de la capsidie au niveau des pseudo-axes 3, où des pores sont créés par le gonflement du virus (Speir et coll., 1995), soit l'ARN est libéré au niveau des axes 5 (Albert et coll., 1997), qui sont les unités les moins stables de la capsidie.

Il a été reconnu depuis peu que les génomes viraux, qui n'ont pas de structure organisée dans les capsides et qui donc ne diffractent pas les rayons X, pouvaient être observés grâce à la technique de reconstruction tridimensionnelle à partir de clichés de cryomicroscopie. Le modèle que nous avons obtenu du BMV sous sa forme gonflée nous a permis de mieux comprendre le réarrangement du génome viral dans la capsidie à pH 7,5. En effet, nous avons pu observer une densité correspondant à l'ARN viral localisée au niveau des axes 5, qui obstrue le pore. Nos résultats sont en faveur de la théorie d'Albert et coll.

La diffusion des rayons X aux petits angles nous a permis d'observer l'évolution des interactions en solution en fonction de la variation de différents paramètres physico-chimiques, et de caractériser les étapes précoces de cristallisation.

D'une façon générale, nous avons pu confirmer la nécessité de l'existence de conditions attractives pour la cristallisation des macromolécules biologiques. L'effet Hofmeister, qui traduit un effet différentiel des sels à induire des interactions attractives entre petites protéines, est toujours présent avec le BMV. En revanche, cet effet est insuffisant pour obtenir un régime attractif, ce qui avait déjà été mis en évidence avec des macromolécules moins grosses que le BMV. L'étude systématique des interactions entre particules virales en

solution en fonction du pH et de la concentration en sels a toutefois montré une réorganisation de l'ARN à l'intérieur des capsides, liée à l'augmentation du pH et à la nature des sels.

L'attraction de déplétion induite par l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) a permis d'accéder à un régime globalement attractif en solution. C'est dans ces conditions attractives que nous avons pu obtenir des cristaux de BMV, qui diffractent les rayons X.

Nous avons mis en évidence que le BMV a la propriété de précipiter sous forme microcristalline en présence d'un excès de PEG. Les échantillons précipités sont constitués de deux phases, l'une enrichie en PEG, et l'autre contenant les microcristaux.

La cinétique d'apparition et de croissance de ces microcristaux a montré qu'on ne détectait pas de phase amorphe intermédiaire avant l'apparition des premiers pics de diffraction, 1 à 10 secondes après le mélange selon les conditions. Nous avons pu déduire que dans le cas de la cristallisation du BMV en présence de PEG, les noyaux de nucléation ont une taille inférieure ou égale à 800 Å de diamètre, ce qui correspond à la plus petite taille de microcristaux qui a pu être estimée, et qu'ils ont déjà une organisation cristalline.

Les résultats présentés ici appellent de nombreuses futures expériences, complémentaires ou novatrices.

Concernant la diffusion des rayons X aux petits angles, la nature microcristalline des échantillons a orienté nos études sur la cinétique de nucléation et de croissance cristalline, et sur la cristallisation du BMV. D'autres expériences de diffusion pourraient être effectuées en utilisant des ions divalents. De plus, la simulation des facteurs de structure est en cours, à partir des programmes de Luc Belloni (CEA/Saclay), en fonction de la nature de différents agents précipitants (collaboration avec J. Perez, LURE, Orsay).

Des expériences très récentes de DXPA effectuées par A. Tardieu en collaboration avec l'équipe de P. Vekilov ont montré que l'apoferritine, une protéine sphérique de 130 Å de diamètre, précipite également de façon microcristalline en présence d'un excès de PEG. En revanche, des expériences effectuées sur l'urate oxydase (Vivarès et coll., 2002) ont montré que les précipités obtenus en présence de PEG étaient amorphes. Il serait intéressant de savoir ce qui détermine la nature amorphe ou cristalline des précipités

De plus, il est généralement admis que les atomes et les particules sphériques forment des noyaux de nucléation de forme sphérique, organisés ou non de façon cristalline. Or, des clichés de microscopie à force atomique ont révélé l'organisation cristalline des noyaux de

nucléation de l'apoferritine, obtenus en présence de sels, sous forme de rangées de protéines, donc non sphériques (Yau et Vekilov, 2000a; Yau et Vekilov, 2001).

Il faudrait donc connaître la structure des noyaux de nucléation obtenus en présence de PEG pour le BMV et l'apoferritine, par AFM (collaboration en cours pour le BMV avec S. Veessler, CRMC2, Marseille) et par cryodécapage (collaboration en cours pour le BMV avec S. Weinkauf, Garching, Allemagne). On pourrait ainsi savoir si, en présence de PEG, les noyaux de nucléation de l'apoferritine sont également plans. L'observation des microcristaux de BMV pourrait peut-être permettre d'attribuer cette structure de noyaux à toutes les grosses macromolécules sphériques.

Enfin, la structure du BMV a été déterminée par Lucas et coll. à partir de cristaux obtenus en présence d'ions magnésium. L'utilisation de ces ions a apparemment modifié la structure interne du virus, au niveau de l'organisation de l'ARN et des extrémités protéiques N-terminales. Il faudrait donc pouvoir faire diffracter les cristaux que nous avons obtenus de façon reproductible en présence de PEG seul, mais que nous n'avons pas pu tester, pour voir si nous pouvons obtenir une structure légèrement différente du BMV.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ouvrages de référence :

pour la virologie

Fields Virology, 3^{ème} édition - Edité par B.N. Fields, P.M. Howley et al.
Lippincott - Raven Publishers, Philadelphie © 1996

pour les interactions intermacromoléculaires

Intermolecular and surface forces, 2^{ème} édition (1992)- J.N. Israelachvili. Academic Press, London.

Liaisons intermoléculaires : les forces en jeu dans la matière condensée (1995) – A. Gerschel. Savoirs Actuels, InterEditions / CNRS Editions, Paris.

pour la diffusion aux petits angles

Modern Aspects of Small-Angle Scattering, édité par H. Brumberger (1993) - Dept. of Chemistry, Syracuse University, NY, USA.

Abad-Zapatero, C., Abdel-Meguid, S., Johnson, J. E., Leslie, A. G. W., Rayment, I., Rossman, M. G., Suck, D., et Tsukihara, T. 1980. Structure of southern bean mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Nature*. 286:33-39.

Ahlquist, P. 1992. Bromovirus RNA replication and transcription. *Curr Opin Genet Dev*. 2:71-6.

Albert, F. G., Fox, J. M., et Young, M. J. 1997. Virion swelling is not required for cotranslational disassembly of cowpea chlorotic mottle virus in vitro. *J Virol*. 71:4296-9.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., et Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-10.

Anderegg, J. W., Wright, M., et Kaesberg, P. 1963. An X-ray scattering study of bromegrass mosaic virus. *Biophys. J*. 3:175-182.

Asakura, S., et Oosawa, F. 1958. Interactions between particles suspended in solutions of macromolecules. *J. Pol. Sci.* 33:183-192.

Atha, D. H., et Ingham, K. C. 1981. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J Biol Chem*. 256:12108-12117.

Baker, T. S., et Cheng, R. H. 1996. A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J Struct Biol*. 116:120-30.

Bancroft, J. B. 1970. The self-assembly of spherical plant viruses. *Adv Virus Res*. 16:99-134.

Bancroft, J. B., Hiebert, E., Rees, M. W., et Markham, R. 1968. Properties of cowpea chlorotic mottle virus, its protein and nucleic acid. *Virology*. 34:224-39.

Bancroft, J. B., Hills, G. J., et Markham, R. 1967. A study of the self-assembly process in a small spherical virus. Formation of organized structures from protein subunits in vitro. *Virology*. 31:354-79.

Berger, B., Shor, P. W., Tucker-Kellogg, L., et King, J. 1994. Local rule-based theory of virus shell assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:7732-6.

- Berthet-Colominas, C., Cuillel, M., Koch, M. H. J., Vachette, P., et Jacrot, B. 1987. Kinetic study of the self-assembly of brome mosaic virus capsid. *Eur. Biophys. J.* 15:159-168.
- Bockstahler, L. E., et Kaesberg, P. 1962. The molecular weight and other biophysical properties of bromegrass mosaic virus. *Biophys. J.* 2:1-9.
- Boistelle, R., et Astier, J. P. 1988. Crystallization mechanisms in solution. *J. Cryst. Growth.* 90:14-30.
- Bonneté, F., Finet, S., et Tardieu, A. 1999. Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions. *J. Crystal Growth.* 196:403-414.
- Bonneté, F., Vivares, D., Robert, C., et Colloc'h, N. 2001. Interactions in solution and crystallization of *Aspergillus flavus* urate oxidase. *J. Crystal Growth.* 232:330 - 339.
- Brisco, M., Hull, R., et Wilson, T. M. A. 1985. Southern Bean Mosaic Virus-specific proteins are synthesized in an in vitro system supplemented with intact, treated virions. *Virology.* 143:392-398.
- Brisco, M., Hull, R., et Wilson, T. M. A. 1986. Swelling of bacilliform plant virus nucleocapsids is required for virus-specific protein synthesis in vitro. *Virology.* 148:210-217.
- Budayova, M., Bonneté, F., Tardieu, A., et Vachette, P. 1999. Interactions in solution of large oligomeric protein. *J. Cryst. Growth.* 196:210-219.
- Carbonnaux, C., Ries-Kautt, M., et Ducruix, A. 1995. Relative effectiveness of various anions on the solubility of acidic *Hypoderma lineatum* collagenase at pH 7.2. *Protein Sci.* 4:2123-8.
- Caspar, D. L. D., et Klug, A. 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27.
- Casselyn, M., Finet, S., Tardieu, A., et Delacroix, H. 2002. Time-resolved scattering investigations of brome mosaic virus microcrystals appearance. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58:1568-70.
- Casselyn, M., Perez, J., Tardieu, A., Vachette, P., Witz, J., et Delacroix, H. 2001. Spherical plant viruses: interactions in solution, phase diagrams and crystallization of brome mosaic virus. *Acta Cryst.* D57:1799-1812.
- Chauvin, C., Pfeiffer, P., Witz, J., et Jacrot, B. 1978. Structural polymorphism of bromegrass mosaic virus: a neutron small angle scattering investigation. *Virology.* 88:138-48.
- Cheng, R. H., Reddy, V. S., Olson, N. H., Fisher, A. J., Baker, T. S., et Johnson, J. E. 1994. Functional implications of quasi-equivalence in a T = 3 icosahedral animal virus established by cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *Structure.* 2:271-282.
- Choi, Y. G., Dreher, T. W., et Rao, A. L. 2002. tRNA elements mediate the assembly of an icosahedral RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:655-60.
- Chothia, C., et Lesk, A. M. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5:823-826.
- Citovsky, V. 1999. Tobacco mosaic virus: a pioneer of cell-to-cell movement. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354:637-43.
- Colloc'h, N., Etchebest, C., Thoreau, E., Henrissat, B., et Moron, J. P. 1993. Comparison of three algorithms for the assignment of secondary structure in proteins: the advantages of a consensus assignment. *Protein Eng.* 6:377-82.

Conway, J. F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., et Steven, A. C. 1997. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*. 386:91-4.

Conway, J. F., et Steven, A. C. 1999. Methods for reconstructing density maps of "single" particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. *J Struct Biol*. 128:106-18.

Cuillet, M., Berthet-Colominas, C., Timmins, P. A., et Zulauf, M. 1987. Reassembly of Brome Mosaic Virus from dissociated virus. *Eur Biophys J*. 15:169-176.

Cuillet, M., Jacrot, B., et Zulauf, M. 1981. A T=1 capsid formed by protein of Brome Mosaic Virus in the presence of trypsin. *Virology*. 110:63-72.

Cuillet, M., Zulauf, M., et Jacrot, B. 1983. Self-assembly of brome mosaic virus protein into capsids. Initial and final states of aggregation. *J Mol Biol*. 164:589-603.

Debye, P. et Hückel, E. 1923. *Physik Z*. 24:185.

Derjaguin, B. 1940. On the repulsive forces between charged colloid particles and on the theory of slow coagulation and stability of lyophobic sols. *Trans. Faraday Soc*. 36:203.

Dubochet, J., Lepault, J., Freeman, R., Berriman, J. A., et Homo, J.-C. 1982. Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. *J. Microsc*. 128:219-237.

Dubuisson, J. M., Decamps, T., et Vachette, P. 1997. Improved signal-to-background ratio in small angle X-ray scattering experiments with synchrotron radiation using an evacuated cell for solutions. *J. Appl. Cryst*. 30:49-54.

Ducruix, A., et Giégé, R. 1992. Crystallization of nucleic acids and proteins - A practical approach. *dans* Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach. A. Ducruix et R. Giegé, editors. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo. 127-143.

Ducruix, A., Guilloteau, J. P., Riès-Kautt, M., et Tardieu, A. 1996. Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis. *J. Crystal Growth*. 168:28-39.

Durham, A. C., Hendry, D. A., et Von Wechmar, M. B. 1977. Does calcium ion binding control plant virus disassembly? *Virology*. 77:524-33.

Finch, J. T., et Bancroft, J. B. 1968. Structure of the reaggregated protein shells of two spherical viruses. *Nature*. 220:815-6.

Finet, S. 1999. Thèse - Interactions entre protéines en solution: étude par diffusion des Rayons X aux petits angles du lysozyme et des protéines du cristallin; application à la cristallisation. Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Finet, S., et Narayanan, T. 2002. La diffusion des rayons X aux petits angles : application à la biologie. *Bulletin de la Société Française de Biophysique*. 133:8-11.

Finet, S., et Tardieu, A. 2001. alpha-cristallin interaction forces studied by small-angle X-ray scattering and numerical simulations. *J. Crystal Growth*. 232:40 - 49.

Fox, J. M., Wang, G., Speir, J. A., Olson, N. H., Johnson, J. E., Baker, T. S., et Young, M. J. 1998. Comparison of the native CCMV virion with in vitro assembled CCMV virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *Virology*. 244:212-8.

Fraenkel-Conrat, H., et Williams, R. C. 1955. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid component. *Proc. Natl.Acad. Sci*. 41:690-698.

Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., et Leith, A. 1996. SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol.* 116:190-9.

Frishman, D., et Argos, P. 1995. Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins.* 23:566-79.

Fry, E., Logan, D., et Stuart, D. 1996. Virus crystallography. *Methods Mol Biol.* 56:319-63.

Fuller, S. D., Butcher, S. J., Cheng, R. H., et Baker, T. S. 1996. Three-dimensional reconstruction of icosahedral particles--the uncommon line. *J Struct Biol.* 116:48-55.

George, A., et Wilson, W. W. 1994. Predicting protein crystallization from a dilute solution property. *Acta Cryst.* D50:361-365.

Grimes, J. M., Burroughs, J. N., Gouet, P., Diprose, J. M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P. P., et Stuart, D. I. 1998. The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature.* 395:470-8.

Grimes, J. M., Jakana, J., Ghosh, M., Basak, A. K., Roy, P., Chiu, W., Stuart, D. I., et Prasad, B. V. 1997. An atomic model of the outer layer of the bluetongue virus core derived from X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Structure.* 5:885-93.

Guilloteau, J. P. 1991. Thèse - Cristallogénèse des macromolécules biologiques : influence de la nature des sels et de la température sur la solubilité du lysozyme et sur les interactions protéine-protéine. Université Louis Pasteur-Strasbourg.

Guinier, A., et Fournet, A. 1955. Small angle scattering of X-rays, New York, USA.

Harrison, S. C., Olson, A. J., Schutt, C. E., Winkler, F. K., et Bricogne, G. 1978. Tomato Bushy Stunt Virus at 2.9 Å resolution. *Nature.* 276:368-373.

Hebert, T. T. 1963. Precipitation of plant viruses by polyethylene glycol. *Phytopathology.* 53:362.

Hiebert, E., Bancroft, J. B., et Bracker, C. E. 1968. The assembly in vitro of some small spherical viruses, hybrid viruses, and other nucleoproteins. *Virology.* 34:492-508.

Hofmeister, F. 1888. Zur Lehre von der Wirkung der salze. *Arch Exp. Pathol. Pharmakol.* 24:247-260.

Hsu, C. H., Sehgal, O. P., et Pickett, E. E. 1976. Stabilizing effect of divalent metal ions on virions of southern bean mosaic virus. *Virology.* 69:587-595.

Incardona, N. L., et Kaesberg, P. 1964. A pH-induced structural change in bromegrass mosaic virus. *Biophys. J.* 4:11-21.

Israelachvili, J.N. 1992. Intermolecular and surface forces, 2^{ème} édition. Academic Press, London.

Jacrot, B. 1980. Structural studies of viruses with X-Rays and neutrons. *Comp virology.* 17:129-181.

Jacrot, B., Chauvin, C., et Witz, J. 1977. Comparative neutron small-angle scattering study of small spherical RNA viruses. *Nature.* 266:417-421.

Jahn, W. 1995. Easily prepared holey films for use of electron microscopy. *J. Microsc.* 179:333-334.

Johnson, J. E., et Speir, J. A. 1997. Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies. *J Mol Biol.* 269:665-75.

Kabsch, W., et Sander, C. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 22:2577-2637.

Kaper, J. M. 1975. The chemical basis of virus structure, dissociation and reassembly. *Front Biol*. 39:1-485.

Klug, A. 1983. Architectural design of spherical viruses. *Nature*. 303:378-9.

Krol, M. A., Olson, N. H., Tate, J., Johnson, J. E., Baker, T. S., et Ahlquist, P. 1999. RNA-controlled polymorphism in the in vivo assembly of 180-subunit and 120-subunit virions from a single capsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:13650-5.

Kulkarni, A. M., chatterjee, A. P., Schweizer, K. S., et Zukoski, C. F. 2000. Effects of polyethylene glycol on protein interactions. *J. Chem. Phys.* 113:9863-9873.

Lafont, S., Veessler, S., Astier, J. P., et Boistelle, R. 1997. Comparison of solubilities and molecular interactions of BPTI molecules giving different polymorphs. *J. Crystal Growth*. 173:132-140.

Lane, L. C. 1974. The bromoviruses. *Adv Virus Res*. 19:151-220.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., et Thornton, J. M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26:283-291.

Lekkerkerker, H. N. W. 1997. Strong, weak and metastable liquids. *Physica A*. 244:227-237.

Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., et Harrison, S. C. 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*. 354:278-284.

Liljas, L., Unge, T., Jones, T. A., Fridborg, K., Lovgren, S., Skoglund, U., et Strandberg, B. 1982. Structure of satellite tobacco necrosis virus at 3.0 Å resolution. *J Mol Biol*. 159:93-108.

Lindahl, T., Adams, A., et Fresco, J. R. 1966. Renaturation of transfer ribonucleic acids through site binding of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 55:941-948.

Lucas, R. W., Kuznetsov, Y. G., Larson, S. B., et McPherson, A. 2001. Crystallization of Brome mosaic virus and T = 1 Brome mosaic virus particles following a structural transition. *Virology*. 286:290-303.

Lucas, R. W., Larson, S. B., et McPherson, A. 2002. The crystallographic structure of brome mosaic virus. *J Mol Biol*. 317:95-108.

Lucas, W. J. 1995. Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Curr Opin Cell Biol*. 7:673-680.

Mahadevan, H., et Hall, C. K. 1990. Statistical-Mechanical model of protein precipitation by non-ionic polymer. *AIChE Journal*. 36:1517-1528.

Mahanty, J. et Ninham, B.W. 1976. Dispersion Forces. Academic Press, London.

Malfois, M., Bonneté, F., Belloni, L., et Tardieu, A. 1996. A model of attractive interactions to account for liquid-liquid phase separation of protein solutions. *J. Chem. Phys.* 105:3290-3300.

Malkin, A. J., Kuznetsov Yu, G., Land, T. A., DeYoreo, J. J., et McPherson, A. 1995a. Mechanisms of growth for protein and virus crystals. *Nat Struct Biol*. 2:956-9.

Malkin, A. J., Land, T. A., Kuznetsov, Y. G., McPherson, A., et DeYoreo, J. J. 1995b. Investigation of virus crystal growth mechanisms by in situ atomic force microscopy. *Physical Review Letters*. 75:2778-2781.

Malkin, A. J., Plomp, M., et McPherson, A. 2002. Application of atomic force microscopy to studies of surface processes in virus crystallization and structural biology. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 58:1617-1621.

Martelli, G. P. 1997. Plant virus taxa: properties and epidemiological characteristics. *J of Plant Virol.* 79:151-171.

Mc Pherson, A. 1999. Mechanisms of macromolecular crystal growth. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

McLean, B. G., Waigmann, E., Citovsky, V., et Zambryski, P. 1993. Cell-to-cell movement of plant viruses. *Trends Microbiol.* 1:105-109.

McPherson, A. 1998. Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

McPherson, A., Malkin, A. J., et Kuznetsov Yu, G. 2000. Atomic force microscopy in the study of macromolecular crystal growth. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:361-410.

Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G., et Thornton, J. M. 1992. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins.* 12:345-364.

Muschol, M., et Rosenberger, F. 1995. Interactions in under- and supersaturated lysozyme solutions. Static and dynamic light scattering results. *J. Chem. Phys.* 103:10424-10432.

Namba, K., Pattanayek, R., et Stubbs, G. 1989. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *J Mol Biol.* 208:307-325.

Narayanan, T., Diat, O., et Bösecke, P. 2001. Nuclear instruments & methods in physics research. Section A, Accelerators, spectrometers, detectors and associated equipment. *Nucl. instrum. methods phys. res., Sect. A Accel. spectrom. detect. assoc.equip.* 467-468:1005-1009.

Ng, J.D., Lorber, B., Witz, J., Théobald-Dietrich, A., Kern, D et Giegé, R. 1996. The crystallization of biological macromolecules from precipitates: Evidence for Ostwald ripening. *J. Cryst. Growth.* 168: 50-62.

Nicholls, A., Sharp, K. A., et Honig, B. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins.* 11:281-296.

Osman, F., Grantham, G. L., et Rao, A. L. 1997. Molecular studies on bromovirus capsid protein - IV. Coat protein exchanges between Brome Mosaic Virus and Cowpea Chlorotic Mottle Virus exhibit neutral effects in heterologous hosts. *Virology.* 238:452-459.

Oxtoby, D. W. 1998. Nucleation of first-order phase transitions. *Acc. Chem. Res.* 31:91-97.

Pfeiffer, P., et Hirth, L. 1974. Aggregation states of brome mosaic virus protein. *Virology.* 61:160-7.

Poon, W., Pusey, P., et Lekkerkerker, H. 1996. Colloids in suspense. *Physics world:*27-32.

Ramachandran, G. N., et Sasisekharan, V. 1968. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem.* 23:283-438.

Reddy, V. S., Natarajan, P., Okerberg, B., Li, K., Damodaran, K. V., Morton, R. T., Brooks, C. L., 3rd, et Johnson, J. E. 2001. Virus Particle Explorer (VIPER), a website for virus capsid structures and their computational analyses. *J Virol.* 75:11943-7.

Riès-Kautt, M., et Ducruix, A. 1989. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *J Biol Chem.* 264:745-748.

Robinson, I. K., et Harrison, S. C. 1982. Structure of the expanded state of tomato bushy stunt virus. *Nature*. 297:563-568.

Russel, W. B., Saville, D. A. and Schowalter, W. R. 1989. Colloidal Dispersions. Cambridge, Cambridge University Press.

Sali, A., et Blundell, T. L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 234:779-815.

Sgro, J. Y., Jacrot, B., et Chroboczek, J. 1986. Identification of regions of brome mosaic virus coat protein chemically cross-linked in situ to viral RNA. *Eur J Biochem*. 154:69-76.

Shaw, J. G. 1996. Plant viruses. *dans* Fields Virology, Third Edition. D. M. K. B.N Fields, P.M Howley et al., editor. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.

Shaw, J. G. 1999. Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 354:603-11.

Speir, J. A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S., et Johnson, J. E. 1995. Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*. 3:63-78.

Stehle, T., Gamblin, S. J., Yan, Y., et Harrison, S. C. 1996. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure*. 4:165-82.

Steven, A. C., Smith, P. R., et Horne, R. W. 1978. Capsid fine structure of cowpea chlorotic mottle virus: from a computer analysis of negatively stained virus arrays. *J Ultrastruct Res*. 64:63-73.

Svergun, D., et Semenyuk, A. 1993. GNOM: Small-angle scattering data processing by means of regularization technique. Académie des sciences de Russie., Moscou, Russie.

Svergun, D. I., Richard, S., Koch, M. H., Sayers, Z., Kuprin, S., et Zaccai, G. 1998. Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:2267-72.

Talanquer, V., et Oxtoby, D. W. 1998. Crystal nucleation in the presence of metastable critical point. *J. Chem. Phys*. 109:223-227.

Tama, F., et Brooks, C. L., 3rd. 2002. The mechanism and pathway of pH induced swelling in cowpea chlorotic mottle virus. *J Mol Biol*. 318:733-47.

Tardieu, A. 1994. *dans* Neutron and Synchrotron Radiation for Condensed Matter Studies. J. L. H. J. Baruchel, M.S. Lehman, J.R. Regnard, C. Schlenker, editor. Springer, Berlin. 145.

Tardieu, A., Bonnete, F., Finet, S., et Vivares, D. 2002. Understanding salt or PEG induced attractive interactions to crystallize biological macromolecules. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 58:1549-53.

Tardieu, A., Le Verge, A., Malfois, M., Bonneté, F., Finet, S., Riès-Kautt, M., et Belloni, L. 1999. Proteins in solution: from X-ray scattering intensities to interaction potentials. *J Crystal Growth*. 196:193-203.

ten Wolde, P. R., et Frenkel, D. 1997. Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations. *Science*. 277:1975-8.

Timmins, P. A., Wild, D., et Witz, J. 1994. The three-dimensional distribution of RNA and protein in the interior of tomato bushy stunt virus: a neutron low-resolution single-crystal diffraction study. *Structure*. 2:1191-201.

Tsuruta, H., Reddy, V. S., Wikoff, W. R., et Johnson, J. E. 1998. Imaging RNA and dynamic protein segments with low-resolution virus crystallography: experimental

design, data processing and implications of electron density maps. *J Mol Biol.* 284:1439-52.

Vachette, P., et Svergun, D. I. 2000. Small-angle X-ray scattering by solutions of biological macromolecules. *dans* Structure and Dynamics of Biomolecules. G. G. E.Fanchon, J.-L. Hodeau, J.-R. Regnard and P.A. Timmins., editor. Oxford University Press., New York . 199-237.

Velev, O. D., Kaler, E. W., et Lenhoff, A. M. 1998. Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen. *Biophys J.* 75:2682-97.

Verduin, B. J. M. 1992. Early interactions between viruses and plants. *Semin. Virol.* 3:423-431.

Verwey, E. J. W., Overbeek, J. T. G., et van Nes, K. 1948. Theory of the stability of lyophobic colloïds, Amsterdam.

Vivarès, D., et Bonneté, F. 2002. X-ray scattering studies of *Aspergillus flavus* urate oxidase: towards a better understanding of PEG effects on the crystallization of large proteins. *Acta Cryst.* D58:472-479.

Wikoff, W. R., Tsai, C. J., Wang, G., Baker, T. S., et Johnson, J. E. 1997. The structure of cucumber mosaic virus: cryoelectron microscopy, X-ray crystallography, and sequence analysis. *Virology.* 232:91-97.

Wilson, T. M. 1985. Nucleocapsid disassembly and early gene expression by positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol.* 66:1201-7.

Wilson, T. M. A. 1984. cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus in vitro. *Virology.* 137:255-265.

Witz, J., et Brown, F. 2001. Structural dynamics, an intrinsic property of viral capsids. *Arch Virol.* 146:2263-74.

Yau, S. T., et Vekilov, P. G. 2000a. Quasi-planar nucleus structure in apoferritin crystallization. *Nature.* 406:494-7.

Yau, S. T., et Vekilov, P. G. 2000b. Quasi-planar nucleus structure in apoferritin crystallization. *Nature.* 406:494-7.

Yau, S. T., et Vekilov, P. G. 2001. Direct observation of nucleus structure and nucleation pathways in apoferritin crystallization. *J Am Chem Soc.* 123:1080-9.

Ye, X., Narayanan, T., Tong, P., Huang, J. S., Lin, M. Y., Carvalho, B. L., et Fetters, L. J. 1996. Depletion interactions in colloid-polymer mixtures. *Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics.* 54:6500-6510.

Zlotnick, A., Aldrich, R., Johnson, J. M., Ceres, P., et Young, M. J. 2000. Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology.* 277:450-6.

Zulauf, M., Cuillel, M., et Jacrot, B. 1983. Scattering Techniques Applied to Supramolecular and Nonequilibrium Systems: Neutron and Light Scattering Studies of Brome Mosaic Virus and its Protein. Plenum Press, New York , London.

Modifications structurales du Virus de la Mosaïque du Brome et interactions entre particules virales en solution : application à la cristallisation

Résumé

Les virus sont des objets biologiques dont les mécanismes de prolifération restent mal compris, et dont la taille et l'organisation du génome rendent la cristallisation difficile. Nous avons étudié les modifications structurales d'un virus sphérique de plante, le Virus de la Mosaïque du Brome (BMV), ainsi que les interactions entre particules virales en solution afin de définir des conditions de cristallisation.

Le gonflement de la capsid lors de l'entrée du virus dans les cellules de plantes est impliqué dans la prolifération virale. Dans un premier temps, nous avons modélisé la capsid du BMV, sous sa forme compacte à pH 5,9 et sous sa forme gonflée à pH 7,5, par reconstruction tridimensionnelle à partir de clichés de cryomicroscopie. Nous avons ainsi pu observer le réarrangement de l'ARN entre les deux états.

Nous avons ensuite étudié les interactions entre particules virales en solution par diffusion des rayons X aux petits angles. Nous avons fait varier plusieurs paramètres physico-chimiques comme le pH, et la concentration en sels et en polymères, afin d'induire des interactions attractives entre virus en solution. En effet, la cristallisation des protéines a lieu en régime attractif. Grâce aux résultats obtenus par l'utilisation de polyéthylène glycol (PEG), nous avons pu déterminer des conditions de cristallisation du BMV, et montrer la corrélation existant entre la nature des interactions en solution et la cristallisation de macromolécules de la taille du BMV.

Nous avons également mis en évidence qu'un excès de PEG provoque la précipitation microcristalline des virus. L'étude de la cinétique d'apparition et de croissance des microcristaux nous a permis de mieux caractériser les étapes précoces de cristallisation du BMV en présence de PEG.

Mots-clés : phytovirus, BMV, cristallisation, DXPA, interactions, microscopie, modélisation

Structural modifications of Brome Mosaic Virus and interactions between viral particles in solution : application to cristallisation

Abstract

Viruses are biological objects, which mechanisms of proliferation remain badly understood, and which size and organization of the genome make crystallization difficult. We studied the structural modifications of a spherical plant virus, the Brome mosaic Virus (BMV), as well as the interactions between viral particles in solution in order to define crystallization conditions.

The capsid swelling that occurs when the virus enters into the host cells is involved in the viral proliferation. We modeled the BMV capsid, in its compact form at pH 5.9 and in its swollen form at pH 7.5, by three-dimensional reconstruction from electron cryomicroscopy images. We thus could observe the rearrangement of RNA between the two forms.

We then studied the interactions between viral particles in solution by small angle X-ray scattering. We varied several physicochemical parameters as pH, and polymer and salt concentration, to induce attractive interactions between viruses in solution. Indeed, crystallization of protein occurs in attractive regime. Owing to the results obtained by using polyethylene glycol (PEG), we could determine crystallization conditions of BMV, and show the correlation existing between the

nature of the interactions in solution and the crystallization of macromolecules of the size of BMV.

We also highlighted that an excess of PEG causes the microcrystalline precipitation of the viruses. The study of kinetics of appearance and growth of the microcrystals enabled us to better characterize the early stages of crystallization of BMV in presence of PEG.

Keywords : plant virus, BMV, crystallization, SAXS, interactions, microscopy, modeling