HAL
open science

Propriétés physiques de capsides virales étudiées à l'échelle du virus unique par microscopie à force atomique : exemples du rétrovirus VIH-1 et du parvovirus AAV

Julien Bernaud

To cite this version:

Julien Bernaud. Propriétés physiques de capsides virales étudiées à l'échelle du virus unique par microscopie à force atomique : exemples du rétrovirus VIH-1 et du parvovirus AAV. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2015. Français. NNT : 2015ENSL1028 . tel-01229879

HAL Id: tel-01229879

https://theses.hal.science/tel-01229879v1

Submitted on 17 Nov 2015

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

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

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon,
délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon

Discipline : Physique

Laboratoire de Physique de l'ENS Lyon

École Doctorale 52 - Physique et Astrophysique de Lyon (PHAST)

présentée et soutenue publiquement le 27 Octobre 2015

par Monsieur Julien BERNAUD

Propriétés physiques de capsides virales étudiées à l'échelle du virus unique par microscopie à force atomique : exemples du rétrovirus VIH-1 et du parvovirus AAV

Directeur de thèse :

Mme. Cendrine FAIVRE MOSKALENKO

Après l'avis de :

M. Pierre Emmanuel MILHIET
M. Guillaume TRESSET

Devant le jury composé de :

M. Arezki BOUDAOUD, *ENS de Lyon*, Membre
M. Giovanni CAPPELLO, *Liphy Grenoble*, Membre
M. Martin CASTELNOVO, *ENS de Lyon*, Co-encadrant
M. Pierre Emmanuel MILHIET, *CBS Montpellier,* Membre
Mme. Cendrine MOSKALENKO FAIVRE, *ENS de Lyon*, Directeur
Mme. Delphine MURIAUX, *CPBS Montpellier,* Membre
M. Guillaume TRESSET, *LPS Orsay*, Membre

Table des matières

Avant Propos 1

Chapitre 1. De la Biologie à la Physique des virus 3

I. Les virus 5

1. Petit historique de la découverte des virus 5
2. Cycle viral et infectiosité 6
3. Classification des virus 8

II. La biophysique des virus 12

1. Morphologie des capsides 12
   a. Voir les virus avec des électrons : les microscopes électroniques 13
   b. Voir le virus avec des rayons X : la radiodiffraction 17
   c. Voir les virus par le toucher : le microscope à force atomique 20
2. Dynamique du cycle viral 22
   a. Fluorescence et détection de protéines virales 22
   b. Observer le cycle viral 23
3. Propriétés mécaniques du virion 24
   a. Pression interne dans les capsides 25
   b. Déformer mécaniquement le virus 28
   c. Mesure de la pression interne 31
4. Interactions protéines virales / récepteurs cellulaires 32

III. Le cas des rétrovirus 34

1. L'exemple du VIH-1 34
2. La phase tardive du cycle viral. 35
   a. La phase tardive 35
   b. Structure des particules (figure 1.21) 37
3. La phase précoce du cycle viral 40
   a. Phase précoce (figure 1.20.a) 40

b. Désassemblage et rétrotranscription 41

IV. Le cas des vecteurs viraux 42

1. L'exemple : le virus AAV 42
2. Structure et cycle viral 43
a. Un virus icosaédrique 43
b. Assemblage des virions 44
c. Phase précoce du cycle viral 44
1. AAV : un vecteur pour la thérapie génique 46
a. Le ciblage : 13 sérotypes 46
b. L'efficacité de transfert de gène : effet de l'acidité du milieu 47
c. La production de vecteur : effet de la longueur et de la nature du génome 48

V. Conclusion 52

Chapitre 2. Une étude expérimentale par AFM 53

I. Le microscope à force atomique 54

1. Principe général 54
a. Le microscope à effet tunnel. 54
b. Description du microscope à force atomique. 55
c. Une sonde d'interaction. 56
2. Imagerie 56
a. Principe général et rétroaction 58
b. Paramètres de contrôle 58
c. Paramètres de contrôle 60
d. Résolution 62
3. Propriétés mécaniques 62
a. Principe général 62
b. Courbe d'approche sur une surface dure 62
c. Courbe d'approche sur une surface molle 63
d. Paramètres de contrôle 63

II. Préparation des échantillons 65

1. Virus : VIH et AAV 65
a. Production des pseudo-particules du VIH-1 65
b. Production des cores du VIH-1 69
2. Choix du tampon 70
3. Dépôt sur surface 71

a. La surface de mica 71
b. Le mica fonctionnalisé 73
c. Protocoles de dépôt 74
4. Destabilisation 76
a. Stabilité du core du rétrovirus VIH-1 77
b. Stabilité de la capside AAV 77
c. Stabilité de la capside du vecteur AAV en fonction du pH de la solution tampon 79

III. Imagerie et traitement de l'image 82

1. Obtention des images 82
a. Imagerie dans l'air 82
b. Imagerie en liquide 84
c. Les problèmes d'imagerie 85
2. Analyse des images 87
a. Traitement de l'image. 87
b. Sélection des objets sur la surface 87
c. Paramètres morphologiques. 90
d. Représentations statistiques. 93
e. Mesure automatique de la longueur d'ADN éjecté 97

IV. Expérience d'indentation 99

1. Réalisation des courbes 99
a. Préparation des échantillons 99
b. Mesure de la raideur du levier 99
c. Réalisation des courbes 101
2. Traitement des courbes 104
a. Prétraitement 104
b. « Zoologie » des courbes d'approche 104
c. Raideur et modèle du 1er ordre 106
d. Autres informations. 110
e. Cartographies 112

V. Conclusion 114

Chapitre 3. Propriétés physiques du virus VIH-1 117

I. Etude morphologique et mécaniques des VLPs et cores 119

1. Images AFM obtenues 119
2. Caractérisation morphologique des VLPs et des cores 120

a. Critère de sélection 120
b. Comparaison de la morphologie entre les VLPs et les cores. 123
c. Mesure de l'angle des cores 127
d. Modèle des cores de VIH-1 132
3. Propriétés mécaniques des VLPs p8.2 134
a. Les courbes de force 135
b. Histogrammes des raideurs 137
4. Discussion. 139

II. Comparaison de différents variants du VIH-1 141

1. Comparaison p8.2 vs p8.91 142
a. Propriétés morphologiques des VLPs 144
b. Propriétés morphologiques des cores 144
2. Comparaison p8.2 vs Q151N 144
a. Les propriétés morphologiques des cores p8.2 versus Q151N 146
b. Les propriétés mécaniques des cores p8.2 versus Q151N 146
3. Comparaison VLP immature vs VLP p8.91 mature 147
4. Discussion 150

III. Comparaison des propriétés physiques : Effet du signal ψ 152

1. Aspect expérimental 152
2. Propriétés morphologiques 154
a. Propriétés morphologiques des VLPs 154
b. Propriétés morphologiques des cores 156
3. Modèle entropique 158
4. Discussion 161

IV. Initiation de la retrotranscription 163

1. Imagerie AFM 163
2. Analyse morphologique des cores non déstabilisés 166

Conclusion 170

Chapitre 4. Propriétés physiques des vecteurs AAV 171

I. Caractérisation des propriétés physiques des vecteurs AAV8 simple brin. 173

1. Imagerie dans l'air 173
2. Imagerie en liquide 175
3. Expériences d'indentation 177
4. Mesure de la stabilité des capsides 178
5. Discussion. 183

II. Comparaison des sérotypes : AAV8 vs AAV9 simple brin 185

1. Propriétés morphologiques à l'équilibre 185
2. Propriétés mécaniques à l'équilibre 187
3. Effet du chauffage des sérotypes 188
4. Discussion. 191

III. Effet du pH sur les capsides AAV8 : pH = 7,2 vs pH = 5,4 193

1. Propriétés morphologiques à l'équilibre 193
   a. Imagerie dans l'air 193
   b. Imagerie en liquide 195
2. Propriétés mécaniques à l'équilibre 196
3. Effet du chauffage 196
4. Discussion. 199

IV. Effet de la nature du génome du vecteur 201

1. La nature du génome : ssAAV9 vs scAAV9 201
   a. Imagerie dans l'air 201
   b. Expérience de destabilisation 204
2. La longueur du génome : ssAAV8 vs sslAAV8 207
3. Discussion 209

V. Pressurisation dans la capside AAV : le sérotype AAV2 211

1. Température d'éjection de l'ADN : une étude par AFM 211
2. Influence de la concentration en magnésium : une étude par SLS 213
3. Mesure de la pressurisation dans la capside AAV 216
4. Discussion. 220

Conclusion 222

Conclusion 225

Bibliographie 229

Avant-propos

Les virus sont des agents infectieux, pathogènes obligatoires, infectant des cellules de tous les règnes biologiques se trouvant sur Terre (bactéries, archaebactéries, eucaryotes) pour se répliquer et peuvent être associés à des pathologies plus ou moins importantes, maladies d'origines virales. Les symptômes résultants sont dus à un détournement de certains processus cellulaires pour la réplication des virus menant à un dérèglement du fonctionnement des cellules. Le virus VIH-1, *virus de l'immunodéficience humaine*, est à l'origine d'une diminution de l'efficacité du système immunitaire de l'hôte le rendant perméable aux infections opportunistes par la destruction de certaines cellules durant le cycle de réplication, ou cycle viral. Mais certaines propriétés biologiques de virus peuvent être détournées pour proposer de nouveaux traitements à certaines maladies rares, neuromusculaires par exemple. Ainsi, le virus adéno-associé, ou AAV, est considéré comme un outil important pour la thérapie génique en tant que système de transfert de gènes. Détourné pour cet usage, le virus prend le nom de vecteur AAV.

La compréhension de certaines propriétés biologiques permettraient par exemple de maitriser une contamination en rendant inefficace le cycle de réplication ou, *a contrario*, d'optimiser le traitement en augmentant l'efficacité de transfert de gènes. Pour cela, la physique des objets biologiques et plus précisément la « virologie physique » peut être considérée comme une approche originale de ces problématiques.

Depuis les années 40 et avec les réflexions d'E. Schrödinger, l'émergence de nouveaux instruments d'observation des systèmes biologiques a ouvert la voie à un domaine liant la recherche en biologie et en physique. Le domaine transdisciplinaire qu'est la biophysique a également permis de compléter les études en biologie par un point de vue original sur certains phénomènes et comportements.

La virologie a, par exemple, connu une révolution lorsque la microscopie électronique et la cristallographie, des méthodes exploitant des phénomènes physiques, ont permis, autour des années 1950, de visualiser les agents pathogènes que sont les virus, dont la taille nanoscopique limitait alors leur observation par microscopie optique. Elles ont ainsi rendu possible la description du virus comme l'assemblage d'un génome à l'intérieur d'une ou plusieurs coques de nature protéiques et/ou lipoprotéique. Mais la Biophysique a également apporté à la biologie des concepts purement physiques pouvant expliquer des résultats biologiques. C'est le cas de la contamination des bactéries par des virus (bactériophages) qui met en jeu une pression interne importante exercée par le génome sur la paroi interne de la coque protéique.

Au cours de ces trois années de thèse, nous avons tenté de relier les observations faites en biologie sur certains virus et leurs cycles viraux avec une étude de leurs propriétés physiques, comme leurs morphologie ou encore leurs capacités à se déformer et à se désassembler. En s'appuyant principalement sur un microscope

à très haute résolution, le Microscope à Force Atomique (AFM) offrant la possibilité d'obtenir des informations à la fois sur la morphologie et sur les propriétés mécaniques, nous avons étudié deux virus, l'AAV et le VIH-1 ainsi que certaines étapes de leurs cycles viraux.

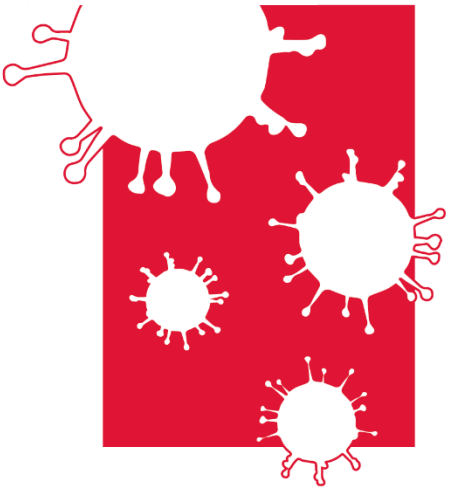
Avant d'aborder les résultats obtenus tout au long de cette thèse, nous proposons dans le premier chapitre, une rapide description des virus et de leurs principales caractéristiques physiques pour les non-spécialistes. Nous présentons ensuite différents apports de la biophysique à l'étude des virus et de leurs cycles viraux : les méthodes d'observation mais également les moyens de caractériser physiquement ces objets matériels. Les cas particuliers du virus VIH-1 et du virus AAV seront ensuite abordés, d'un point de vue biologique mais également physique dans la seconde partie du chapitre 1.

Les capacités du microscope à force atomique ont été abondamment exploitées durant ces travaux de recherche. Le chapitre 2 de ce manuscrit commencera par une description de cet instrument d'observation et de mesures mécaniques par des expériences de nano-indentation. Elle sera suivie par les protocoles mis en place pour la production des virus étudiés et les méthodes d'analyses des données obtenues via l'AFM, que nous avons développés spécifiquement au cours de ce travail de thèse. Des programmes d'analyse d'images et d'expériences de nanoindentation nous ont permis d'obtenir des informations statistiques sur la morphologie des virus et sur les propriétés mécaniques des virus.

Le troisième chapitre se focalise sur l'étude du VIH-1. Nous exposons dans un premier temps les résultats obtenus sur la morphologie et la mécanique de ces rétrovirus enveloppés, le génome étant protégé par une coque protéique elle-même entourée d'une membrane lipoprotéique. En comparant dans un deuxième temps différents variants du VIH-1, nous relions le rôle de certaines protéines virales importantes du cycle viral (protéines accessoires, protéines rétrotranscriptase, protéines de structure, …) à certaines propriétés physiques des particules virales. L'effet du signal ψ (signal d'encapsidation du génome dans la capside) se trouvant sur le génome viral sur la morphologie des particules est ensuite montré dans la troisième partie. Finalement, en comparant deux mutants, nous étudions le possible lien entre deux étapes du cycle viral du VIH-1, à savoir la rétrotranscription et la déstabilisation du core libérant le génome viral.

Le quatrième et dernier chapitre s'attarde sur l'étude du vecteur AAV. Le vecteur AAV présente 13 sérotypes. L'efficacité d'infection dépend du tissu cellulaire cible. Les première et seconde parties de ce chapitre propose une comparaison des propriétés physiques des deux sérotypes AAV8 et AAV9. L'effet du pH sur les propriétés physique du vecteur AAV est ensuite décrit dans une troisième partie dans le but de comprendre les modifications du vecteur lors de son transport à l'intérieur du noyau. La nature et la longueur du génome présent dans les vecteurs AAV dépend du gène que l'on souhaite transférer. La quatrième partie propose une comparaison des caractéristiques physiques de vecteurs possédant différents types de génomes. Finalement, la dernière partie de ce chapitre propose une mesure de la pression exercée par le génome à l'intérieur de la capside.

Chapitre 1 De la biologie à la physique des virus



Pour une majorité de personnes, les maladies virales sont surtout représentées par leurs symptômes, leurs moyens d'en guérir ou de s'en prémunir et leurs impacts sur la société. La grippe par exemple est souvent associée à des douleurs musculaires, une fièvre forte et persistante (plus de 38,5°C pendant trois jours), des maux de gorges et de tête, de la fatigue… La grippe espagnole, forme particulièrement virulente de la grippe, serait à l'origine du décès de plus de 50 millions de personnes entre 1915 et 1920 (Johnson & Mueller 2002). Chaque année, la France met en place de nombreuses campagnes de prévention pour se prémunir de ce qu'on appelle la grippe « saisonnière », pour promouvoir la vaccination de la grippe. Et des traitements existent soit pour diminuer les symptômes (anti-inflammatoires, anti-pyrétiques, …) soit pour aider le système immunitaire (antiviraux).

Ces symptômes ont en grande partie pour origine la présence d'un agent infectieux dans certaines cellules de l'hôte, les *virus*. Ces parasites se répliquent grâce à différents processus biologiques d'un cycle, appelé *cycle viral*, et se propagent à l'intérieur de l'organisme contaminé, de cellule en cellule, mais également d'un individu à un autre selon des voies de contamination spécifiques.

Les virus, qui sont principalement décris par leurs activités et propriétés biologiques, restent des objets physiques que l'on peut observer, déformer et étudier via des expériences de physique. Ces dernières ont commencé à montrer leur utilité, depuis une vingtaines d'années, pour comprendre certaines étapes de la réplication virale d'un autre point de vue, celui de la Physique des objets biologiques. Via des techniques de pinces optiques ou magnétiques, de microscopies avancées et de cristallographies, ces expériences mènent à une caractérisation des propriétés physiques (forme, taille, propriétés mécaniques, stabilité, …) de ces objets biologiques.

Dans cette thèse, nous avons utilisé une approche physique pour étudier deux virus, en grande partie grâce à un microscope de haute résolution. Le premier, connu du grand public est responsable de l'une des plus grandes pandémies qui touche l'humanité actuellement : le VIH-1, ou *Virus de l'ImmunoDéficience Humaine de type 1*, responsable du SIDA, *Syndrome de l'Immunodéficience Acquise*. Bien que les virus soient souvent associés à des maladies, certains d'entre eux, infectant l'Homme, ne sont pas pathogènes et sont une voie de recherche pour la thérapie génique permettant de soigner certaines maladies génétiques rares. C'est le cas du second virus, AAV, ou *Adeno-Associated Virus* (Virus Adéno-Associé), qui présente un grand intérêt en tant qu'outil biotechnologique pour le transfert de gêne.

Dans ce chapitre qui constitué un court état de l'art actuel de l'étude des virus. La première partie constitue une rapide description des virus. Certains apports de la physique dans la compréhension des virus sont présentés dans une seconde partie. Une focalisation sur le virus VIH-1 ainsi que sur le virus AAV occupent la troisième et la quatrième partie.

I. Les virus

Si l'appartenance des virus dans l'ordre du vivant reste fortement discutée (il est d'ailleurs absent de l'arbre phylogénétique), sa définition n'a eu de cesse d'évoluer en fonction des découvertes réalisées. Une définition généralement proposée est un agent infectieux, parasite obligatoire intracellulaire, c'est-à-dire qu'il a besoin d'un hôte et un détournement de la machinerie cellulaire pour se répliquer. Les virus constitueraient les entités biologiques les plus abondants sur Terre. On estime ainsi à plus de 10^{31} bactériophages, une famille de virus infectant les bactéries (Hendrix 2005). A ce grand nombre de particules virales s'associe un nombre important de sous-familles de virus, ayant leurs propres formes, modes de réplication, hôtes cibles et, dans certains cas, symptômes associés. Définir et classer ces virus représentent un véritable défi pour les scientifiques.

Dans un premier temps, nous essaierons de décrire simplement la famille des virus, et ses grandes caractéristiques. Puis nous proposerons une rapide présentation des cycles viraux. Nous finirons enfin par aboutir à une classification des virus.

1. Petit historique de la découverte des virus

Le lien entre virus et leurs possibles conséquences sur la santé est inscrit dans leur étymologie puisque virus vient du mot latin *virus* ou poison en français. De nombreuses épidémies voire pandémies ont pour origine des virus. Pour ne citer que les pandémies actuelles, les grippes dites saisonnières et le VIH touchent l'humanité causant des milliers de morts chaque année. Le virus de la fièvre Ebola est actuellement en phase d'épidémie dans quelques zones de l'Afrique de l'Ouest.

La découverte des virus et, en général des agents infectieux ne peut être détachée du travail de C. Chamberland, biologiste et physicien français. En 1884, travaillant sur la typhoïde, il met en place un protocole

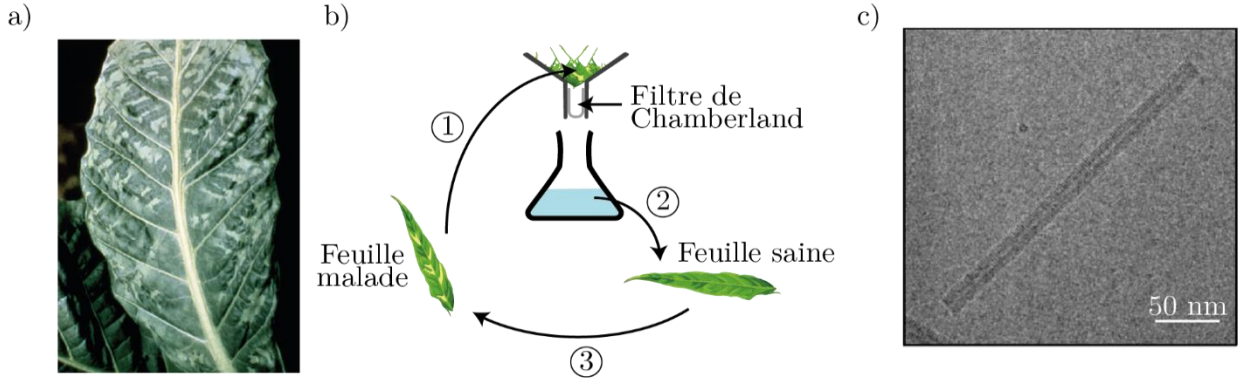


figure 1.1 – La découverte des virus
a) Feuille d'un plan de tabac malade de la mosaïque du tabac (wikipedia source).
b) Expérience de D. Ivanovsky (1892). 1. Une filtration de la sève et du broyat des feuilles malades est réalisée dans le but d'enlever l'hypothétique agent infectieux. Pensant à une bactérie, D. Ivanovsky utilise un filtre de Chamberland pour la récupérer. 2. Un contrôle est réalisé en incubant, le filtrat sur une feuille de tabac saine. 3. La feuille devient malade, l'origine de la maladie est donc un agent infectieux d'une taille inférieure aux bactéries.
c) Observation par cryomicroscopie électronique de l'agent infectieux plus de deux siècles plus tard : le TMV, ou *Tabacco Mosaïc Virus* (Sachse et al. 2007).

de filtrage (avec ce qui deviendra les filtres Chamberland) pour récupérer l'agent infectieux de la maladie. Ce système lui permet de nettoyer l'eau contaminée par l'agent infectieux, une bactérie. Au Pays Bas, l'agrochimiste A. Mayer essaie de caractériser une maladie touchant les plantes agricoles et plus précisément les feuilles de tabac, la mosaïque du tabac (figure 1.1.a). Les bactéries ont été découvertes depuis déjà deux siècles avec l'invention des premiers microscopes par A. van Leeuwenhoek, et leur étude connait un important essor à la fin du XIXème siècle avec les travaux de Louis Pasteur sur leur caractère infectieux et pathogène. La conclusion d'A. Mayer sur la maladie du tabac tend naturellement vers une origine bactérienne, bien que l'observation au microscope optique ne donne rien, ou une toxine. D. Ivanovsky, botaniste russe, utilise en 1892 les filtres de Chamberland pensant récupérer une bactérie. En appliquant le protocole décrit dans la figure 1.1.b, il découvre un nouveau type d'agent pathogène dont la taille est inférieure à celle des bactéries connues. Des expériences de dilution du filtrat mènent également à la maladie des plantes, ce qui exclut la toxine comme origine. M. Beijerinck, un botaniste néerlandais, répète alors les expériences de D. Ivanovsky et caractérise la nature de l'agent pathogène récupéré, lui donnant au passage le nom de *virus*. Ces travaux sont publiés dans sa thèse en 1903 (Zaitlin 1998) et sont souvent considérés comme les premiers travaux de virologie. Par la suite, le virus, qui sera appelé TMV pour *Tabacco Mosaïc Virus*, sera isolé dans les années 1930 puis sa structure particulière sera clarifiée, d'abord par cristallographie (dans les années 1950 (Klug 1999)) puis plus tard par cryo-microscopie électronique (depuis les années 1980 (Jeng et al. 1989), voir figure 1.1.c).

Ces informations renseignent sur plusieurs choses. Tout d'abord, les virus ne sont pas que des agents infectieux humains, certains infectent d'autres règnes comme ceux des plantes et des bactéries. Ils présentent d'ailleurs une sélectivité d'hôtes. La taille de ces parasites, lorsqu'ils sont isolés, est généralement très petite (une centaine de nanomètres), nettement inférieure à celles des bactéries (quelques micromètres). Il est alors important de souligner que les virus sont des objets matériels ayant une forme particulière. Celle-ci, souvent représentée par une boule avec des pics à sa surface, est d'ailleurs erronée ou du moins non généralisable, le TMV par exemple est un tube hélicoïdal.

2. Cycle viral et infectiosité

Comme déjà signalé, tous les règnes animaux et végétaux existant sur Terre peuvent être infectés par des virus. Les animaux sont touchés ce qui peut être un problème de santé publique à cause des transferts inter-espèces (avec par exemple la souche de la grippe aviaire H5N1), les plantes également amenant des problèmes agricoles (comme le TMV…). Les bactéries peuvent également être infectées par des bactériophages, virus qui sont d'ailleurs utilisés pour certaines bactérioses. Les champignons sont sensibles aux mycovirus. L'équipe de Didier Raoult décrit en 2008 le virus Spoutnik capable de contaminer des virus géants, Mamavirus (La Scola et al. 2008).

L'infection de la cellule hôte est nécessaire pour permettre au virus de se répliquer. Un virus peut être décrit comme une coque protéique, appelé *capside* ou *core*, protégeant à l'intérieur un génome viral, sous la forme ARN ou ADN (figure 1.2.a). Certains virus possèdent en plus une ou plusieurs bicouches lipidiques extérieures (comme le virus VIH-1, on parle de *virus enveloppé*) ou intérieures (comme le Mimivirus). Les virus ne possédant pas d'enveloppe lipidique sont appelés *virus non enveloppés* (comme le virus AAV).

Lorsque l'on considère le virus isolé dans son intégralité, on parle de *virion*. Son génome code généralement pour les protéines formant la capside et les éventuelles protéines d'enveloppe, dites *protéines de structure*, mais aussi les protéines nécessaires à sa réplication, dites protéines *régulatrices*. Il peut aussi coder pour des protéines *accessoires* qui bien que non essentielles contribuent à l'efficacité du cycle viral. Cependant, pour se répliquer, le virus ne possède pas toute la machinerie protéique, comme les ribosomes et pour certains cas d'ARN polymérases, permettant de produire à partir des ARNm viraux les protéines qui formeront les virions suivants.

L'infection d'une cellule hôte et le détournement de la machinerie cellulaire lui sont donc nécessaires pour se répliquer (figure 1.2.b). Le virion doit d'abord entrer dans la cellule hôte. Des reconnaissances entre les protéines d'enveloppe ou la capside virale et des récepteurs cellulaires sont nécessaires au passage du virion dans le cytoplasme puis la libération de son génome : il perd alors son intégrité physique, le virion n'existe plus. Cette phase est appelé *précoce*. Au bout d'une période plus ou moins longue (on parle de *latence*), les

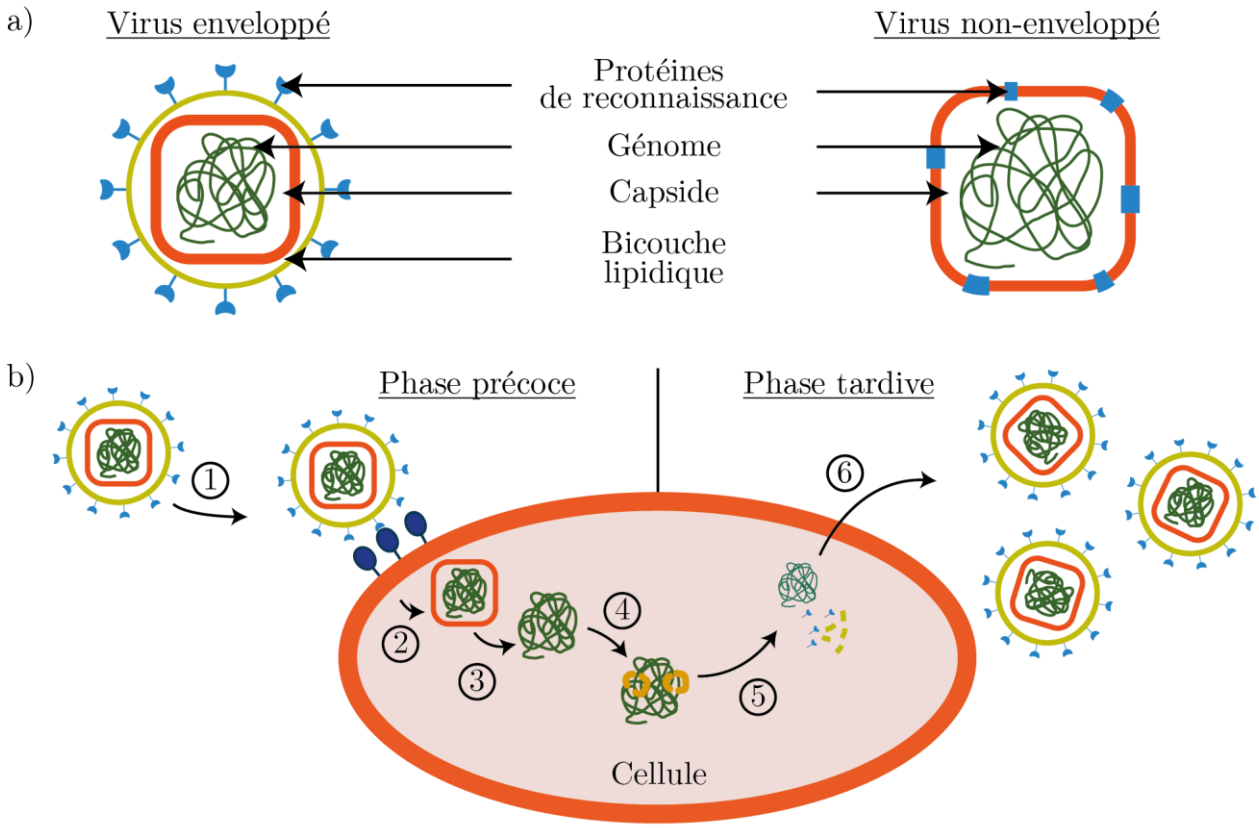


figure 1.2 - Cycle viral

a) Schéma très simplifié d'un virus, enveloppé (à gauche) et non enveloppé (à droite). Les protéines de reconnaissance, dans le cas des virus enveloppés sont transmembranaires et sont appelées protéines d'enveloppe. Dans certains cas de virus non enveloppés, les protéines de structures servent également comme protéines de reconnaissance des récepteurs cellulaires (c'est le cas de AAV). D'autres possèdent en plus des fibres ou exons à l'extérieur de la capside (c'est le cas des Adenovirus).

b) Schéma très simplifié d'un cycle viral. 1. Fixation du virus à la cellule. 2. Entrée du virus dans la cellule. 3. Libération du génome. (Pour certains bactériophages, le virus fixé à l'extérieur de la membrane cellulaire injecte le génome directement dans le cytoplasme, sans rentrer (Letellier et al. 1999)) 4. Détournement de la machinerie cellulaire pour la production de protéines virales. Cette étape peut, dans certains cas, inclure préalablement une étape d'intégration dans le génome cellulaire. 5. Les protéines et le génome formant le futur virion migrent vers la membrane cytoplasmique. 6. Sortie du virus dans le milieu extracellulaire. Par mesure de simplification, le noyau cellulaire a été omis dans cette figure.

protéines cellulaires et/ou virales vont mettre en place les mécanismes pour répliquer le génome viral, c'est le début de la phase *tardive*. Des nouvelles particules virales sont ainsi produites et sortent ensuite de la cellule hôte, s'accompagnant parfois de la mort de celle-ci. Elles peuvent alors infecter de nouvelles cellules. L'ensemble de ce scenario constitue le *cycle viral*. Lors de ce cycle, le virus, en tant qu'objet physique, est alors amené à changer de forme, sous l'effet de l'environnement extra et intracellulaire.

Une bonne infectiosité, c'est-à-dire la bonne efficacité d'entrée, de réplication et de production des virus, requiert donc une optimisation des étapes biologiques (reconnaissance, détournement), morphologiques (dimension, reconnaissance, …) et mécanique (libération du génome, cytoplasme fortement inhomogène, …) tout au long du transport du virus dans l'organisme et puis dans la cellule cible.

Ce cycle viral est extrêmement simplifié. Chaque virus présente son propre cycle, dépendant de la nature du génome, des protéines extérieures dont il a besoin, des mécanismes d'entrée dans la cellule ou de libération du génome, de sa forme, enveloppé ou non, mais également du type cellulaire de l'hôte. Les cycles des virus VIH-1 et AAV seront décrits précisément dans les parties suivantes (Chap. 1.III.3 et Chap. 1.IV.3).

3. Classification des virus

Plusieurs propriétés des virus sont utilisées pour à les classer les uns par rapport aux autres.

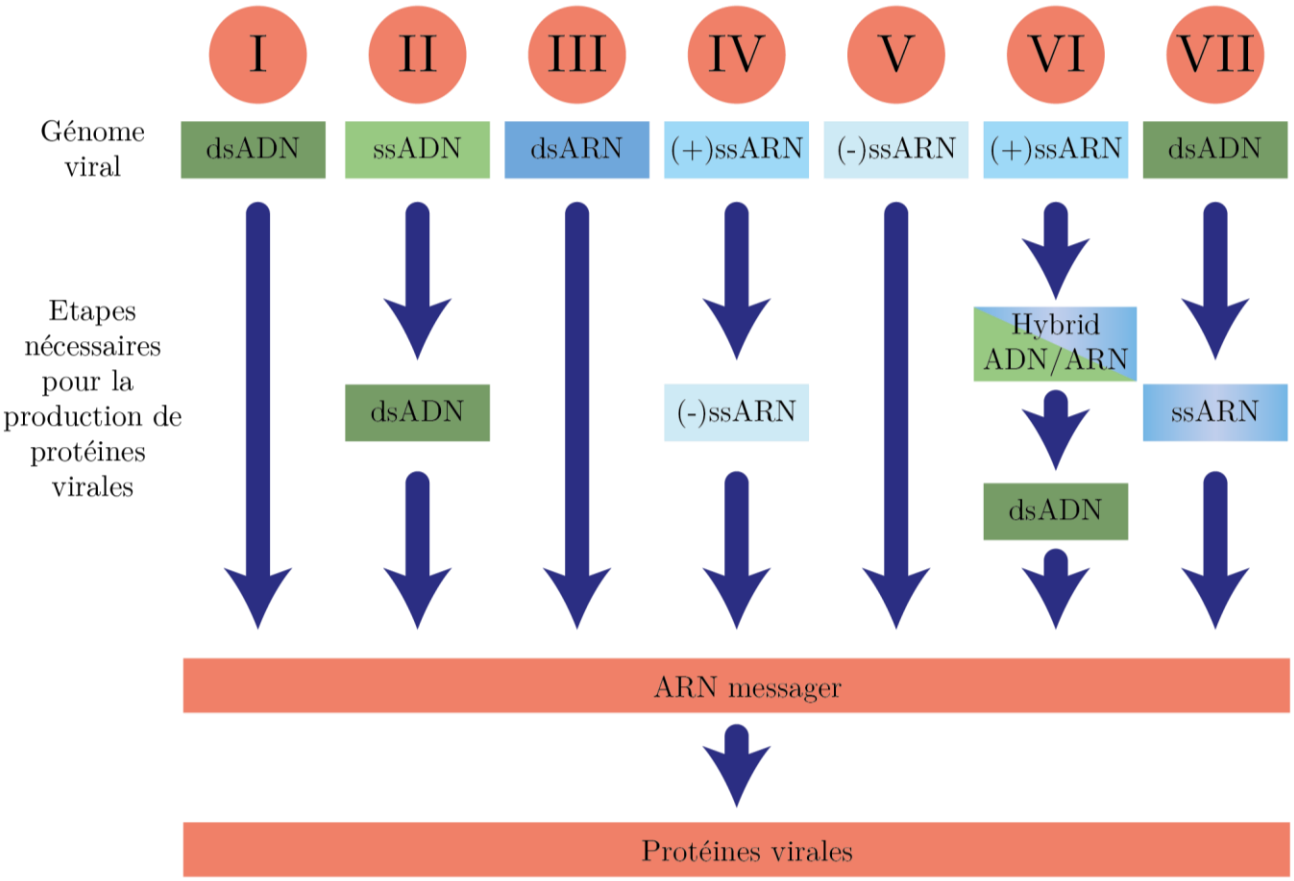


figure 1.3 - Classification de Baltimore des virus du règne animal
La classification de Baltimore sépare les virus des animaux en fonction de la nature du génome viral (ADN ou ARN, simple ss ou double ds brin, la polarité de l'ARN (+) ou (-)) mais également des étapes nécessaires à l'obtention des ARNm qui seront traduits en protéines virales.

Une classification des virus infectant les animaux, dite de Baltimore, proposée par le biologiste américain D. Baltimore en 1971 (Baltimore 1971), repose sur le génome viral. Elle les range selon le nombre et la nature des étapes nécessaires pour passer du génome viral à l'ARN messager (ou ARNm permettant aux ribosomes cellulaires de produire les protéines nécessaires à l'assemblage de nouveaux virus) (figure 1.3). Cette figure montre la diversité des natures du génome dans les virus ainsi que les mécanismes généraux de réplication. Sept groupes sont alors mis en évidence. Le groupe II par exemple nécessite le passage d'ADN simple brin (ssADN– ss pour *single stranded*) à un ADN double brin (dsADN – ss pour *double stranded*) grâce à une ADN-polymérase. L'ADN double brin peut ensuite être transcrit en ARN messager. Le virus AAV appartient à ce groupe. Le groupe VI présente un mécanisme plus complexe, le génome est sous forme ARN de polarité[1] positive (+) donc le ribosome ne peut réaliser directement la traduction. Une étape de rétro-transcription est nécessaire pour passer d'ARN simple brin (+) à ADN double brin, via un hybride ADN/ARN et permettre l'intégration du génome dans celui de la cellule hôte. Elle est ensuite suivie par la transcription par l'ARN polymérase cellulaire pour obtenir les ARNm. Ce n'est qu'à ce moment-là que le ribosome peut initier la production des protéines virales. Le VIH-1 appartient à ce groupe.

On peut noter qu'aucun critère de cinétique n'est utilisé dans cette classification ni de notion d'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte.

Une autre classification (Prasad & Schmid 2012) peut reposer sur la structure du virion (la forme du virus dans le milieu extracellulaire). En plus de la séparation des virus enveloppés et non enveloppés, il existe de nombreuses formes de capsides protéiques, classés en quatre grandes familles (figure 1.4) :

- Les capsides hélicoïdales dont fait partie le TMV (virus non enveloppé) ou le virus de la Rage (virus enveloppé). Les protéines de structure s'organisent avec le génome à l'intérieur sous la forme d'une hélice. Le virus Ebola est également hélicoïdal mais filamenteux, lui donnant une certaine souplesse et est enveloppé d'une bicouche lipidique.
- Les capsides géodes (nom qui par abus de langage est souvent remplacé par icosaédrique) dont fait partie le virus AAV (virus non enveloppé) ou le virus HSV (*HerpèsSimplex Virus*). Les protéines s'associent pour former les 20 facettes triangulaires de la capside. Cette géométrie particulière présente au total 31 axes de symétrie (6 d'ordre 5 (rotation de 72°) passant par deux sommets opposés, 5 d'ordre 3 (rotation de 120°) passant par deux facettes opposées et finalement 15 d'ordre 2 (rotation de 180°) passant par deux arrêtes opposées). Cette géométrie est souvent rapprochée de la sphère puisque les sommets se situent à équidistance du centre de la capside.
- Les capsides à structure mixte sont composées principalement d'une partie hélicoïdale et d'une partie icosaédrique ou pseudo-icosaédrique. Sur la figure 1.4.c, est représenté schématiquement un bactériophage de type T présentant une tête formant un icosaèdre déformé et une gaine hélicoïdale. Ces bactériophages sont non enveloppés. Le bactériophage PMV2 présente des membranes lipidiques

[1] Pour une protéine donnée, un code génétique lui est associé. Un brin d'ARN viral est dit de polarité positive si la séquence des gènes est identique à celle des ARN messagers susceptibles d'être traduits en protéines. Dans ce cas, puisque la formation des brins d'ARNm se fait par complémentarité (A-U, C-G), il est impossible de passer directement de l'ARN viral (+) à l'ARN messager. Il faut soit passer par l'ARN complémentaire de polarité (–) soit passer par l'ADN double brin et la rétrotranscription. Le brin complémentaire présente une polarité négative (–).

internes (Harrison et al. 1971). Il est à noter que tous les bactériophages n'ont pas cette forme (une partie d'entre eux sont icosaédriques).

- La dernière famille est constituée des capsides complexes, c'est-à-dire celles qu'on n'a pu classer dans les trois premières familles. Les protéines formant la capside s'arrangent de manière particulière. La capside du VIH-1 est conique ou cylindrique (Briggs & Kräusslich 2011), mais d'autres virus présentent des géométries encore plus exotiques, forme de bouteilles par exemple pour certains virus d'archébactéries (Ha et al. 2005).

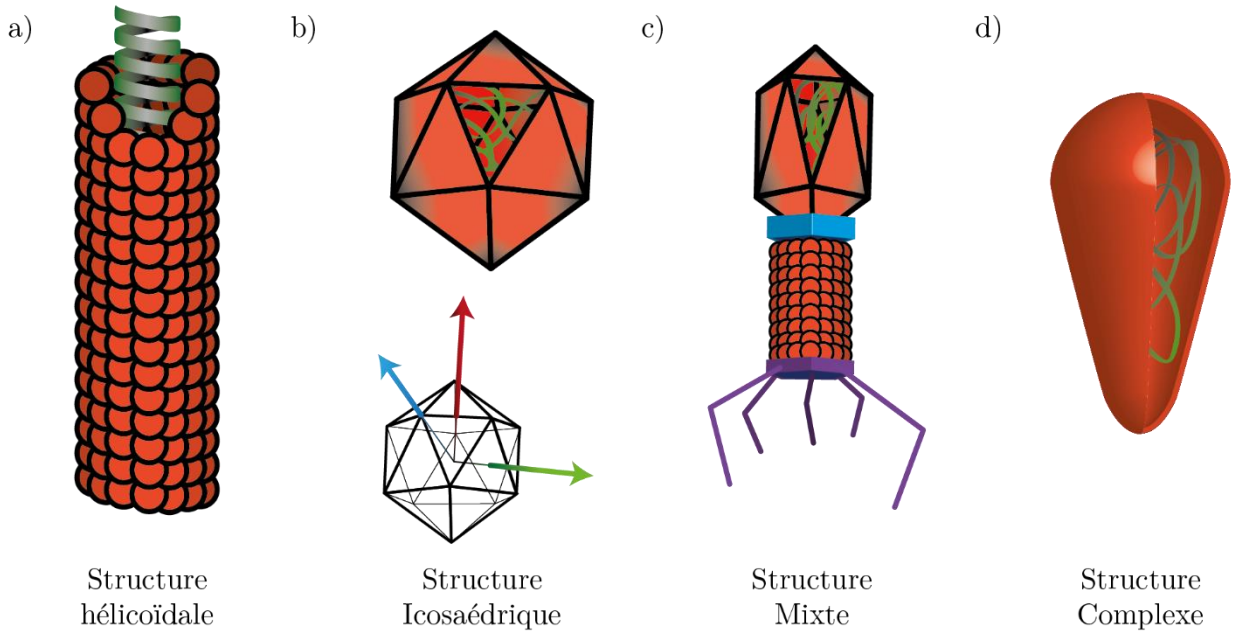


figure 1.4 - Différentes familles de structure des capsides.
Le génome, en vert, s'organise de manière bien spécifique. Sauf pour la première structure, l'arrangement du génome viral n'est pas représenté sur les schémas.
a) La structure hélicoïdale présente un agencement des protéines sous la forme d'une hélice. Le génome suit l'hélice de la capside.
b) La structure icosaédrique est caractérisée par les 20 facettes triangulaires qui la composent. La structure présente 3 types d'axes de symétrie (en dessous), d'ordre 2 au niveau des arrêtes (rouge), d'ordre 3 au centre de chaque facette (vert), d'ordre 5 à chacun des sommets (bleu).
c) La structure mixte est formée d'une tête icosaédrique renfermant l'ADN, d'un collier (en bleu) reliant la tête à une gaine hélicoïdale puis de fibres de la queue (en violet).
d) La famille des structures complexes regroupent tous les virus n'ayant pas de géométrie particulière (cônes, cylindres, forme de citrons, bouteilles…).

Des sous-familles existent. Ainsi, selon le nombre de protéines formant une facette et leurs organisations, représenté par un nombre entier de triangulation T, les capsides de type géodes sont réparties selon la valeur T (Castón & Carrascosa 2013) : pour T = 1, la capside est un pur icosaèdre (c'est le cas d'AAV). Plus T est grand, plus la capside s'éloigne d'une structure de base icosaèdre et plus l'agencement des protéines de structure se complexifie. La capside d'HSV présente par exemple un nombre T de 16. Ces quatre familles ont été définies et utilisées après de nombreuses expériences de microscopie électronique et de cristallographie. Des images et la description des virus cités se trouvent dans la partie suivante (Chap. 1.II.1 et figure 1.7).

Une classification des virus proposé par l'ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses* utilise ces différents critères associés à des aspects plus biologiques et médicaux pour classer plus précisément les virus qui se ressemblent entre eux. Ce type de classification se rapproche de celles utilisées pour les classifications phylogénétiques. Le code de nomenclature d'un virus est obtenu grâce à cette classification. Par exemple, l'espèce virale VIH-1 appartient aux virus animaux enveloppés et plus particulièrement à la famille des *retroviridae* sous famille *orthoretrovirinae*, du genre *lentivirus* du type 1.

Ces classifications rendent compte d'une part de la grande variété de virus existant sur Terre. D'après le comité ICTV, en 2014 ont été référencées 3187 espèces de virus de tous les règnes du vivant. Chacun présente un caractère infectieux et pathogène mais également une structure physique et un cycle viral qui lui est propre.

II. La biophysique des virus

Les structures des virus sont multiples et plus ou moins complexes. Mais elles sont également amenées à se modifier légèrement (disparition de la membrane lipidique par exemple) ou radicalement (désassemblage de la capside) pour permettre l'entrée de son génome à l'intérieur de la cellule hôte et donc sa réplication et la génération d'une multitude de nouvelles particules virales lors du cycle viral.

Les études de virologie se sont attachées à étudier le cycle viral d'un point de vue principalement biologique. L'influence de la nature de la cellule, les différentes protéines cellulaires ou virales rentrant en jeu et leurs activités sur les virus, les niveaux d'infectiosité, les symptômes associés… sont des exemples de caractérisations biologiques et médicales possibles des virus. Cependant, ces informations ne donnent qu'une indication minime sur la morphologie, la structure de la capside. Il a fallu attendre les années 1930 avec l'émergence de nouveaux instruments expérimentaux, s'appuyant fortement sur les nouveaux concepts de physique fondamental de la fin du XIXème et du début du XXème (la diffraction des rayons X, le comportement ondulatoire des électrons, …). C'est également à la même époque que E. Schrödinger, avec son livre *Qu'est-ce que la vie* (Schrödinger 1944), recueil de vulgarisation, introduit des notions de Physique, pour aider à la compréhension des phénomènes biologiques donnant naissance à la Biophysique.

Ce domaine interdisciplinaire entre la physique et la biologie s'attache d'une part à exploiter des instruments issus de la recherche en Physique fondamentale expérimentale mais également, à apporter des concepts et des grandeurs physiques. Il trouve parfaitement sa place dans le monde de la virologie. La microscopie à très haute résolution et la cristallographie par rayons X aident à la détermination de la structure des capsides avec une précision inférieure au nanomètre. Elles permettent également d'étudier les structures à différentes étapes du cycle viral. L'étape de libération du génome dans la cellule hôte dépend étroitement des propriétés physiques de la particule virale, sa fragilité par exemple. Sa capacité à se déformer est aussi importante lors des autres étapes de son cycle. Lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte, de nombreuses interactions protéines anti-récepteurs / récepteurs existent. Elles sont mesurables par différents instruments de la physique des surfaces. Le génome et la capside sont également en interaction. La détermination de la pression exercée par le génome sur la coque protéique se fait via des expériences mêlant biochimie et physique.

C'est dans cet ordre que j'aborde les différentes techniques mises en place pour l'étude des virus : tout d'abord l'observation des structures virales par de nouveaux microscopes, ensuite l'étude du cycle viral pour finalement décrire des expériences dégageant les propriétés mécaniques des virions.

1. Morphologie des capsides

La détermination de la forme des virus ne peut pas se faire par observation optique. En effet, leurs tailles caractéristiques sont inférieures à la limite de résolution et du microscope optique, de l'ordre de la longueur d'onde (autour de 200 nm). En dessous de cette limite, appelée longueur d'Abbe L_A, le phénomène de diffraction domine. Par une simple observation au microscope optique, si deux objets se trouvent à une distance l'un de l'autre inférieur à L_A, ils ne peuvent plus être résolus.

Les scientifiques ont donc dû inventer et adapter des instruments de plus hautes résolutions. De nos jours, certains microscopes atteignent une résolution en dessous du nanomètre.

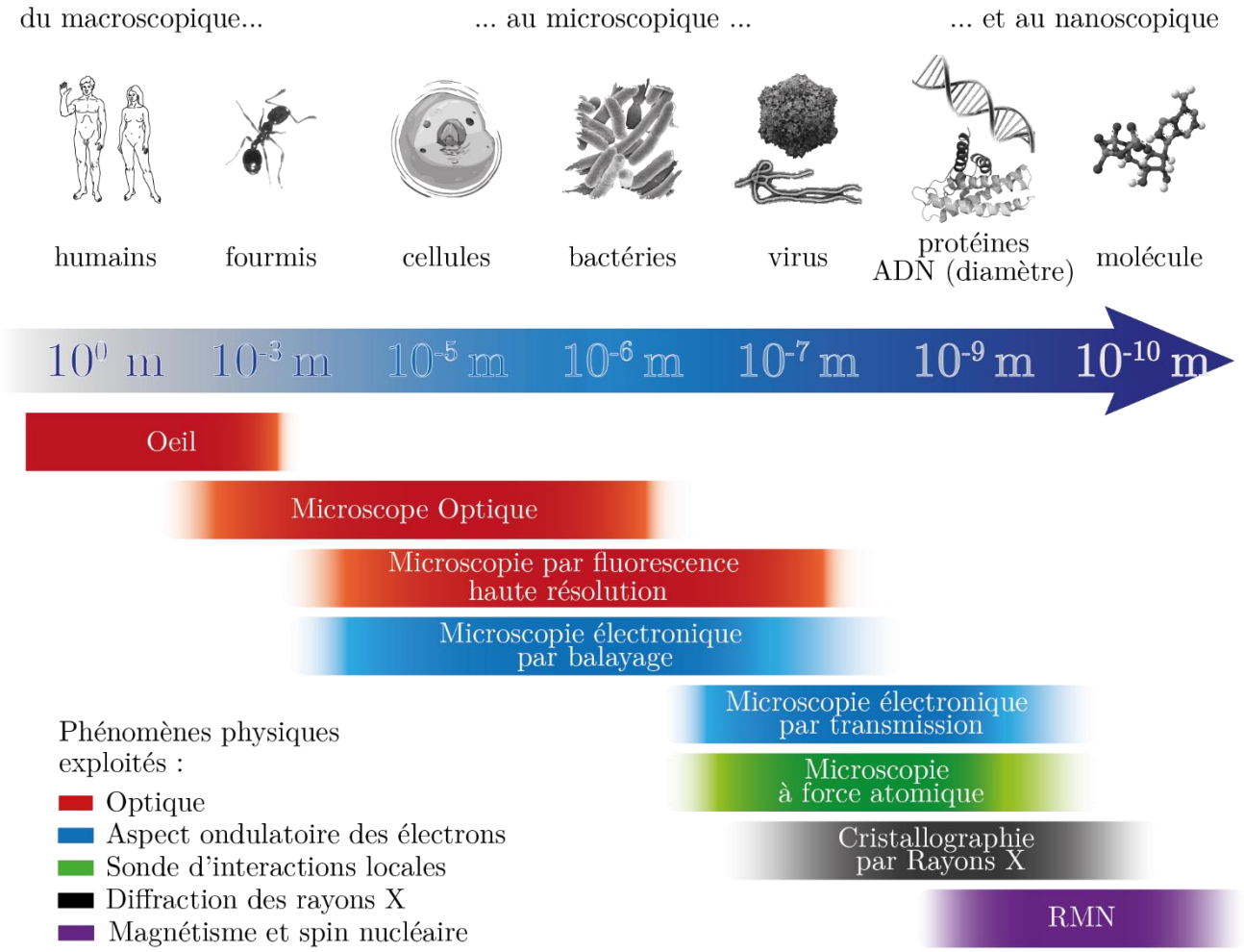


figure 1.5 - Echelle de résolution des microscopes utilisés en biophysique

a. Voir les virus avec des électrons : les microscopes électroniques

En 1924, L. De Broglie, physicien français soutient sa thèse sur le comportement ondulatoire de l'électron, ce qui ouvrira la voie à la mécanique quantique mais également à une multitude d'instruments de mesure. Les microscopes électroniques sont généralement séparés en deux familles : le microscope électronique par transmission (ou MET) dont le champ est restreint à de petites échelles et le microscope électronique par balayage (ou MEB), permettant d'observer un large éventail de tailles plus grandes. Cependant, cette différence de résolution tend à disparaitre avec les avancées technologiques et la création de microscopes électroniques à balayage par transmission.

Les deux types de microscope s'appuient sur un faisceau d'électrons éclairant un objet. Alors que le MET se comporte comme un microscope optique mais avec des rayons électroniques (le faisceau transmis, après passage par l'objet étudié, transporte l'information de ce dernier qui sera enregistrée par un système de films sensibles et de capteurs électroniques, comme un film argentique pour un appareil photo), le MEB

enregistre d'autres signaux, comme les électrons secondaires émis lors du passage du faisceau électronique primaire. Une image est alors reconstruite, point éclairé par le faisceau par point, donnant un semblant de représentation en 3D. Le microscope électronique reste l'un des instruments d'observation les plus adaptés à l'étude de la morphologie des virus grâce à sa précision et ses différents modes d'imagerie. D'ailleurs, historiquement, son invention par l'entreprise Siemens, et plus précisément par les ingénieurs E. Ruska et M. Knoll, (et pour son utilisation dans le domaine la biologie par Helmut Ruska), en 1931, a été stimulée par la re-

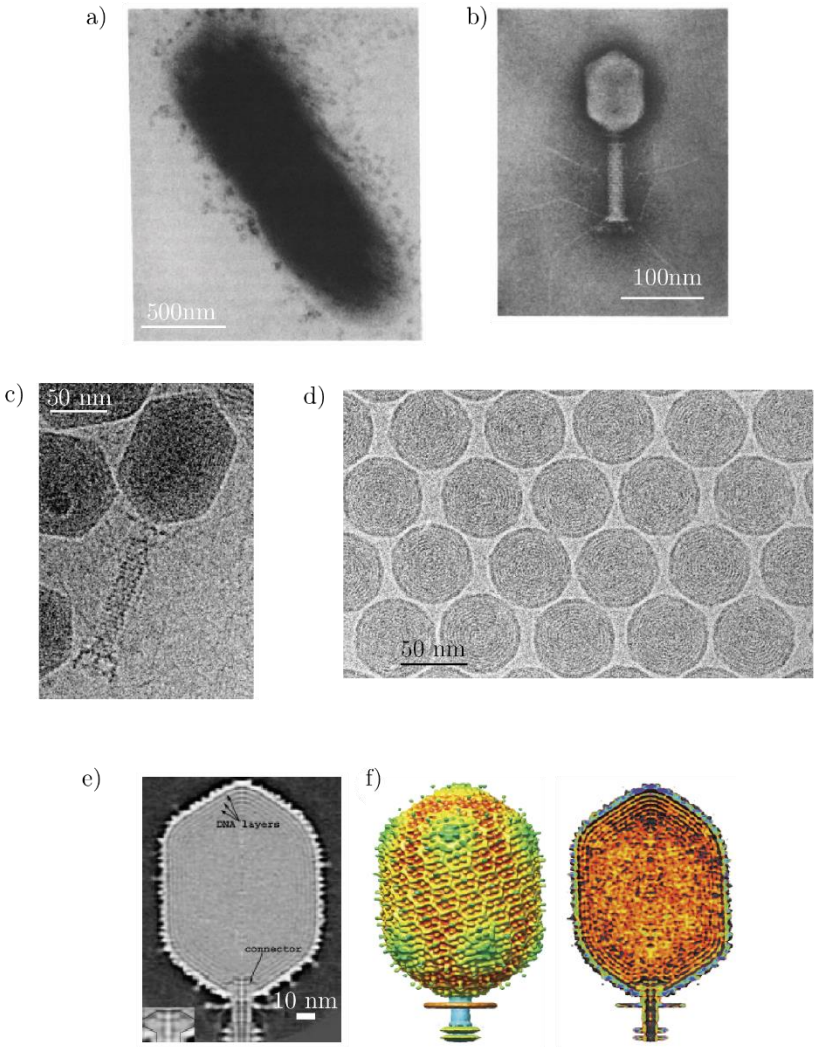


figure 1.6 - Images de microscopie électronique
a) Image de H. Ruska réalisée en 1953 d'une bactérie E.coli, infectée par des bactériophages T2 (Wurtz 1992).
b) Image de microscopie électronique d'un bactériophage T4 réalisée par l'équipe de Wurtz. On peut distinguer les différentes parties de ce type de bactériophage (Wurtz 1992).
c) Image de cryomicroscopie électronique (cryoEM) d'un bactériophage T4. Cette méthode est moins intrusive, le refroidissement rapide du milieu permettant une meilleure conservation des structures (Rossmann et al. 2004).
d) Image par cryoEM d'un crystal de têtes de bactériophages T7. On peut voir l'organisation du génome à l'intérieur de chacune des têtes. (Cerritelli et al. 1997)
e) Reconstruction 3D de la tête du bactériophage T4 à partir de différentes images de cryoEM. On peut voir de nouveau la répartition de l'ADN en couches successives. (Fokine et al. 2004)
f) Densité électronique obtenue par reconstruction 3D de la tête du bactériophage T7 à l'extérieur (à gauche) et à l'intérieur (à droite). On peut ainsi voir les sommets de la capside et les couches successives d'ADN à l'intérieur (Johnson & Chiu 2007).

cherche d'un moyen d'observer le virus responsable de la poliomyélite touchant la famille du directeur de la section recherche de l'entreprise (Kruger et al. 2000). Après cela, H. Ruska continua ses observations en élargissant son panel de virus, comme les bactériophages de la famille T (figure 1.6).

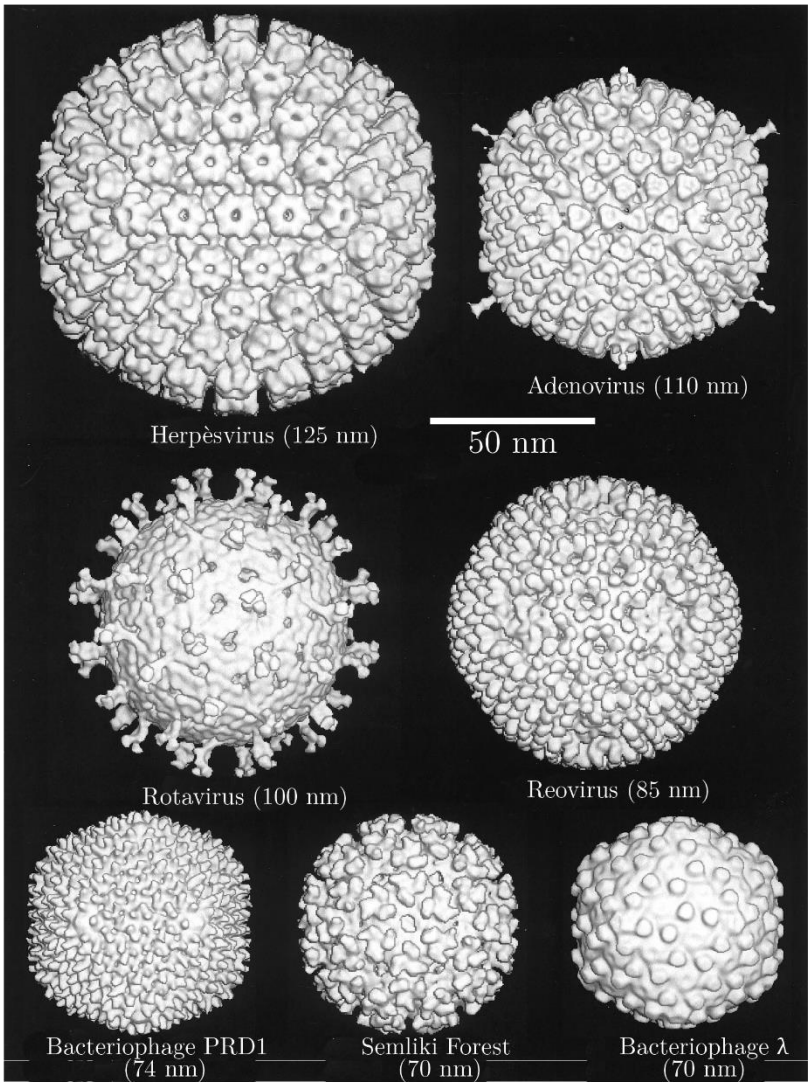


figure 1.7 - Reconstruction 3D à partir d'images par cryoEM de virus icosaédriques
Ces représentations sont obtenues par l'analyse des transformées de Fourier de nombreuses images de virus (indiqués en dessous). Les protéines de structure formant des hexamères (sur les facettes) et des pentamères (au niveau des sommets de l'icosaèdre) sont observables. (Baker et al. 1999)

Mais depuis 1931, la microscopie électronique, et plus précisément le microscope électronique à transmission, est devenue à la fois plus performante et un instrument incontournable pour étudier la structure des virus voire même certaines étapes de l'infection comme avec les bactériophages (figure 1.6.a). Pour plus de renseignements sur cet instrument, on peut se référer à (Castón 2013).

La réalisation d'une image nécessite d'être dans le vide, ce qui peut amener une modification de la structure des virus. Depuis une vingtaine d'année, pour optimiser l'observation, un protocole de refroidissement permet de visualiser des virus, figés dans une solution physiologique. Cette chute de la

température doit être rapide pour que les structures ne s'adaptent pas à la température mais surtout pour empêcher la transition eau – glace diamant qui s'accompagne d'une augmentation du volume d'eau ce qui casserait les structures. En diminuant rapidement la température, on passe en phase amorphe de l'eau gelée. Cette technique, appelée cryo-Microscopie Electronique (cryoEM) est la plus répandue pour l'observation des virus (figure 1.6.c et d).

Cette avancée a initiée la mise en place de nouveaux développements expérimentaux et d'analyses permettant d'obtenir avec une précision quasiment atomique la structure en 3D des protéines constituants la capside. Par exemple, une technique consiste à imager un nombre important de capsides. Par rapport au faisceau d'électrons, elles sont disposées de façon aléatoire. Par une analyse des différentes transformées de Fourier spatiales de chaque image, il est possible de reconstruire l'allure des capsides en 3 dimensions et de représenter les densités électroniques sur les structures. On obtient ainsi une idée précise de l'agencement du génome dans la tête du bactériophage T4 (figure 1.6). Ceci n'est possible que si l'ADN est quasiment à l'état cristallin dans la capside (Cerritelli et al. 1997; Fokine et al. 2004; Johnson & Chiu 2007).

Cette méthode présente l'inconvénient de nécessiter un grand nombre de capsides non polydisperses, c'est-à-dire de tailles identiques. Pour les virus fortement symétriques, les capsides icosaédriques (Baker et al. 1999; Thuman-Commike & Chiu 2000) et les bactériophages – malgré l'asymétrie apportée par la queue du virus (Briggs et al. 2005; Kostyuchenko et al. 2005), cette méthode est efficace (figure 1.7).

En enlevant la membrane lipidique de l'*Herpèssimplex Virus*, la capside du virus enveloppé a pu être étudiée avec cette technique (figure 1.7). Elle présente une structure de type icosaédrique : plusieurs protéines s'arrangeant soit en hexamère soit en pentamère, ces derniers formant les sommets de l'icosaèdre de base (son nombre de triangulation est de 16) (Baker et al. 1999).

Ce n'est par contre pas le cas d'autres virus enveloppés et de certains gros virus non-enveloppés pour lesquels la polydispersité est importante. Une autre méthode est applicable : la cryo-Tomographie électronique

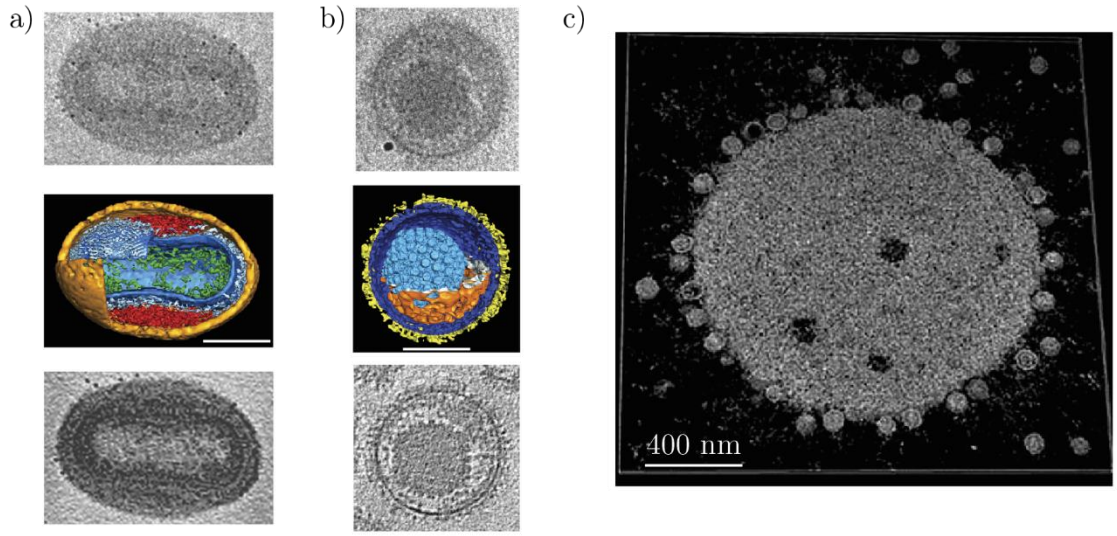


figure 1.8 - Cryotomographie de certains virus humains.
a) Le recoupement d'images par cryoEM d'une unique particule du virus Vaccinia (comme celle en haut) permet de reconstruire le virus en 3D (au milieu) par la méthode de la tomographie et de réaliser des coupes transverses (en bas). La tomographie améliore le contraste de l'image (qui se ramène au rapport signal sur bruit) et met en évidence la présence de couches protéiques autour de la capside de forme cylindrique. La barre représente 100 nm.
b) Même type d'images pour une particule du virus de l'herpès (HSV). La capside présente une structure de type icosaédrique (figure 1.7).

(Murphy & Jensen 2007). Elle consiste à visualiser une unique particule sous une multitude d'angles : pour cela, on pivote l'échantillon petit à petit sur lui-même sur une plage allant de -70° à +70°, à chaque orientation, une image est faite. La particule est alors reconstruite à 3D (figure 1.8) avec une résolution qui peut atteindre de nos jours quelques ångströms. Ce protocole donne ainsi accès à des détails sur la structure à l'échelle de la protéine d'un unique virus à l'instant où il a été figé par le refroidissement (ce qui est généralement impossible lors de la reconstruction en 3D par les transformées de Fourier puisque l'opération de moyennage floute les singularités) (Grünewald & Cyrklaff 2006; Subramaniam et al. 2007). Il permet également de se placer à une échelle légèrement supérieure et observer en 3D un état figé (par le refroidissement) comme des virus contaminants une cellule (figure 1.8) (voir (Iwasaki & Omura 2010)).

Depuis 1950, la microscopie électronique a donc révolutionnée la virologie en donnant la possibilité de « voir » les virus dans un milieu figé, proche de leur état physiologique. Au cours de la même période, les rayons X ont connu aussi un intérêt important pour l'étude de la structure des cristaux de nombreuses molécules et macromolécules.

b. Voir les virus avec les rayons X : la radiodiffraction

Si la cryoEM, et plus précisément les reconstructions en 3D donnent une idée très précise de la structure complète (de l'ordre du nanomètre), la cristallographie par rayons X livre une représentation des protéines constituant les virus avec une précision telle que les atomes sont discernables.

Les rayons X ont été découverts par W. Röntgen à la suite d'expériences sur les rayons cathodiques. La longueur d'onde de ces ondes électromagnétiques est de l'ordre de 10^{-10} m, c'est-à-dire l'écart entre deux atomes. Cette propriété fait de ce type d'ondes un candidat idéal pour réaliser des figures de diffraction de rayons X par des arrangements cristallins. M. von Laue est le premier scientifique à avoir découvert ce phénomène. W. H. Bragg et son fils W. L. Bragg ont alors développé les méthodes permettant, à partir d'une figure de diffraction, de remonter à la structure du cristal, ce qui leur valut le prix Nobel de Physique 1915. L'une des applications les plus connues en biologie est la détermination expérimentale de la structure de l'ADN (Wastson & Crick 1953) par les chercheurs britanniques R. Franklin, M. Wilkins, F. Crick et américain J. Watson (les deux derniers obtinrent le prix Nobel de Médecine en 1962).

R. Franklin, F. Crick et J. Watson ont d'ailleurs été des acteurs importants dans l'émergence de la cristallographie par rayons X de cristaux de virus (Morgan 2003). D. Caspar et A. Klug sont par contre les pionniers de cette discipline en proposant la théorie qui porte leurs noms sur la structure des capsides non complexes (Franklin et al. 1959; Caspar & Klug 1962). Ils proposent que les capsides aient une forme de type géodésique et définissent le nombre de triangulation.

Ces mesures reposent sur le phénomène de diffraction par un réseau tridimensionnel de motifs identiques. Ainsi après cristallisation dans un solvant selon un protocole bien précis, le cristal de virus obtenu est placé sur la trajectoire d'un faisceau de rayons X produit par l'accélération de charges via un synchrotron. L'onde plane, de longueur d'onde proche des dimensions caractéristiques de la maille du cristal, est déviée selon différentes directions bien précises (sur un réseau précis appelé réseau réciproque) (figure 1.9.a). La projection sur un écran donne une carte discrète de points dont la position dépend de la disposition des motifs

les uns par rapport aux autres mais également de leurs formes. Un traitement et une analyse complexes des données s'appuyant sur les transformées de Fourier restitue la position de chaque atome constituant les virus dans l'espace (Verdaguer et al. 2013) (figure 1.9.b).

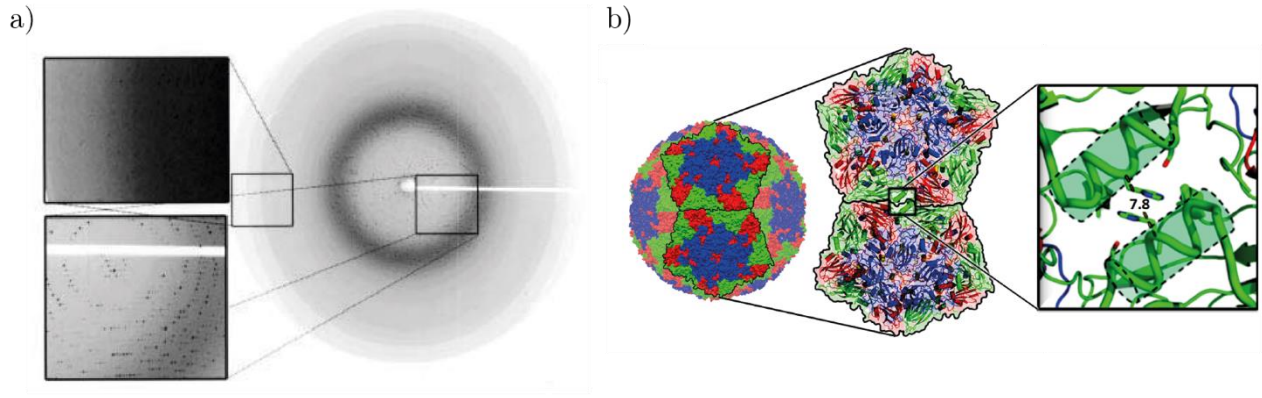


figure 1.9 - Crystallographie par rayons X sur le FMDV.
a) Cliché de diffraction d'un cristal d'un type de FMDV éclairé par une source de rayon X (0,1 nm de longueur d'onde) (Fry et al. 1999).
b) Structure d'un cristal de FMDV avec une résolution de 0,21 nm. Chaque couleur est asocié à un type de protéine. FMDV est donc constitué d'un ensemble de 3 types de protéines. La précision de mesure permet d'isoler les hélices α des protéines (Porta et al. 2013).

La diffraction des rayons X a été avec la microscopie électronique l'un des instruments les plus puissants pour l'étude des virus non enveloppés ou des capsides virales en général. La plus grande difficulté reste la mise en place d'un protocole permettant la cristallisation des capsides sans altérer leurs structures, par évaporation de la solution ou par transfert de liquides. L'obtention d'un cristal bien ordonné sans trop de défauts et de dimension suffisante est cependant de mieux en mieux maitrisée. De nos jours, la PDB, ou *Protein Data Bank*, recense plus de 350 structures de capsides virales allant de petits virus de quelques dizaines de nanomètres à des gros virus d'une centaine de nanomètres de diamètre (comme l'adénovirus humain) (figure 1.10).

Cependant, cette technique présente un inconvénient relatif aux virus enveloppés. Pour obtenir une figure de diffraction cohérente, les virus constituant les nœuds du cristal doivent présenter le même motif. Or, comme déjà indiqué précédemment, les virus avec leurs enveloppes sont fortement poly-disperses. Il est donc très difficile d'obtenir un cristal utilisable pour la diffraction (le virus PM2 possédant une membrane lipidique interne a pu être cristallisé et étudié par diffraction des rayons X (Abrescia et al. 2008)). Cependant, le clivage spécifique du virus et un protocole d'extraction des protéines permettent la réalisation de cristaux de protéines virales constituant ces virus (Verdaguer et al. 2014). Plus de 5000 protéines virales sont cataloguées dans la base de données PDB.

La cristallographie par rayons X a ouvert la voie à la biophysique de précision, avec des résolutions s'approchant de l'atome. Avoir une idée très précise de la structure en 3D d'une protéine virale apporte de nombreuses informations comme sur les mécanismes d'actions de certaines drogues à activité anti-

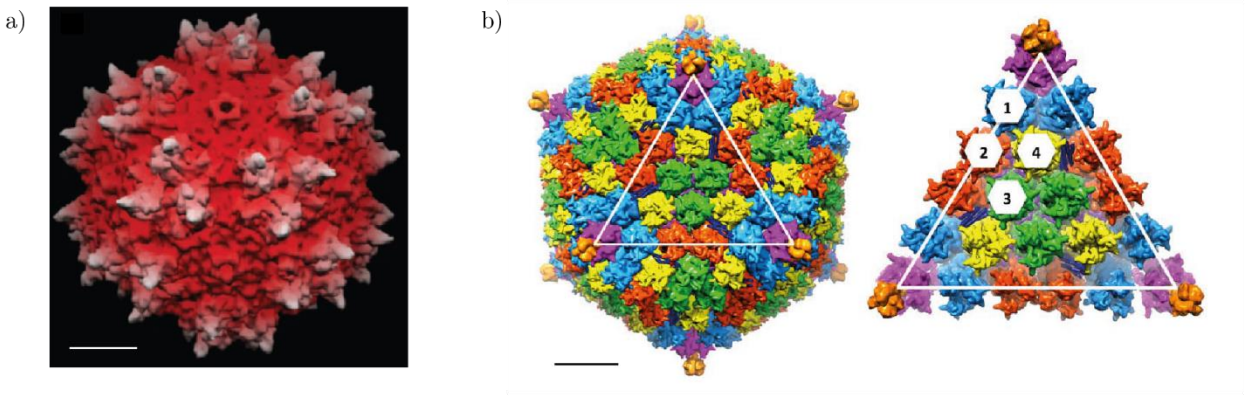


figure 1.10 - Exemple de structures des virus a) AAV et b) AdV.
a) La capside icosaédrique d'un virus AAV a un diamètre de 20 nm. Le code couleur représente la topographie de la surface du virus : plus la couleur tend vers le blanc, plus le point est éloigné du centre. La résolution est de 0,3 nm (Xie et al. 2002). La barre d'échelle représente 4 nm.
b) La capside de l'adenovirus (AdV) a un diamètre de 95 nm. Les quatres types de protéines le constituant sont indiqués par un code couleur. Une facette est représentée à droite, les 3 types d'axes sont ainsi facilement identifiables. La résolution est de 0,28 nm (Reddy et al. 2010). La barre d'échelle représente 20 nm.

enzymatique. Pour exemple, la connaissance combinée de la structure des protéines virales du VIH-1, comme la protéase ou l'intégrase, et de celles de certaines drogues aident à une meilleure connaissance des contacts entre elles lors du traitement et de ses limites (résistance par exemple) (Miller 2011; Arts & Hazuda 2012). Via des contrôles biochimiques pour mimer une étape du cycle viral, il est possible d'établir la configuration dans lequel se trouve une protéine virale. La cristallographie est sensible par exemple aux changements de conformation des protéines. La plateforme protéique avec laquelle les bactériophages P2 se fixent sur la bactérie peut en présence d'ions Ca^{2+} s'ouvrir (figure 1.11), pouvant ainsi laisser passer le génome (Sciara et al. 2010).

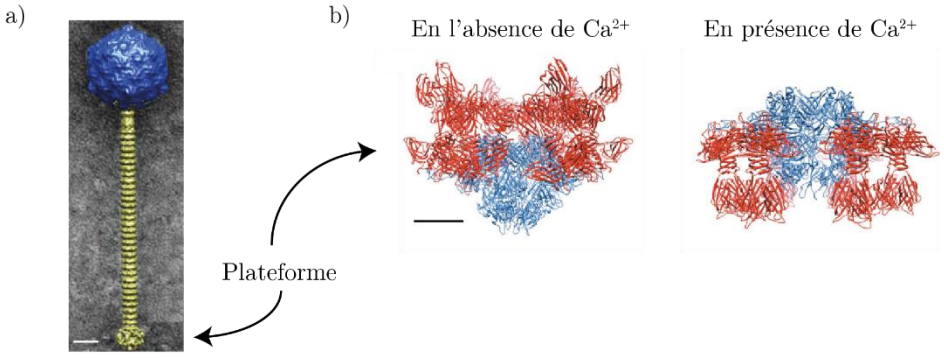


figure 1.11 - Plateforme du bactériophage
a) Cryo-Tomographie du bactériophage P2. La plateforme en bas lui permet de s'ancrer sur une bactérie. Son génome passe par sa queue et la plateforme avant d'être injecté dans la bactérie (Sciara et al. 2010). La barre d'échelle représente 20 nm.
b) Structure cristallographique du portail en l'absence (à gauche) et en présence de Ca^{2+} (à droite). (Sciara et al. 2010; Verdaguer et al. 2014). La barre d'échelle représente 5 nm.

L'observation par cryo-microscopie électronique de virus donne accès à la densité électronique alors que la cristallographie par rayons X permet de résoudre la position des atomes et donc de déterminer la forme

dans les trois dimensions des protéines à la résolution atomique. Le couplage de ces deux techniques offre la possibilité d'augmenter la précision de mesure et de pouvoir mieux discerner les différents éléments du virus comme les protéines, membranes ou encore génome. Il relie également la modification d'une structure protéique (contrôler par cristallographie) sur la morphologie de particules (observées par cryoEM) (Tang & Johnson 2002; Johnson 2013).

Mais si ces techniques offrent d'excellentes résolutions, elles nécessitent de figer les objets étudiés, soit sous la forme de cristaux, soit en refroidissant rapidement l'échantillon. Un traitement préalable des échantillons est nécessaire dans certains cas, comme le dépôt d'une couche de carbone sur les objets étudiés. Ces conditions expérimentales empêchent aussi de faire varier la température ou d'avoir des informations dynamiques.

c. Voir les virus par le toucher : le microscope à force atomique

Plus tardivement après l'avènement des microscopies électroniques ou de la cristallographie par rayons X, est apparue une nouvelle famille de microscopes, ne mettant pas en jeu des principes de rayons lumineux ou cathodiques mais plutôt une sonde, sensible à la nature et à la topographie de la surface qu'ils étudient localement : on désigne d'ailleurs cette famille sous le nom de microscopes à sonde locale. Ces nouveaux instruments ont vu le jour dans les laboratoires s'intéressant à la physique des surfaces, avec l'invention du Microscope à Effet Tunnel (ou STM pour *Scanning Tunneling Microscope*), en 1981, par les ingénieurs G. Binnig et H. Rohrer, de l'entreprise IBM (Binnig et al. 1982) capable de résoudre la maille atomique du silicium. Cependant, le microscope à effet tunnel n'est pas adapté à l'étude d'objets biologiques comme les virus car il nécessite d'imager des objets conducteurs avec une pointe conductrice, contrairement au microscope à force atomique (ou AFM pour *Atomic Force Microscope*).

La sonde de ce dernier microscope est une pointe montée sur un levier, qui à l'identique de l'extrémité du doigt d'un lecteur de braille sur une feuille poinçonnée, balaie la surface étudiée. Lors de la rencontre d'une rugosité importante, le levier va se défléchir, comme la peau du doigt du lecteur sur un point saillant. Si pour ce dernier ce sont les cellules sensorielles du toucher qui indiquent au lecteur « il y a une rugosité », dans le cas de l'AFM, un système de laser et de capteurs optiques permet de mesurer la déformation du levier et donc de connaitre la hauteur de la rugosité. La description du fonctionnement du microscope à force atomique est étoffée dans le chapitre suivant (Chap. 2.I.).

Malgré cette description très simpliste, il est aisé de se rendre compte de la précision de l'instrument si on considère que la longueur du levier est de quelques dizaines de micromètres et que l'extrémité de la pointe (l'équivalent du bout du doigt) ne dépasse pas 10 nm de rayon. La précision du système de mesure fait qu'il est possible d'atteindre sous certaines conditions la résolution atomique (Ishigami et al. 2007). Depuis une vingtaine d'années, les objets biologiques sont étudiés par AFM (Alessandrini & Facci 2005). En effet, ce microscope présente de nombreux avantages pour observer des objets biologiques dans l'air, comme des brins d'ADN (Kalle & Strappe 2012) ou dans un milieu physiologique proche, comme les cellules (Giocondi et al. 2003). Les objets sont préalablement déposés sur une surface plane, puis le balayage de la pointe rend compte de la topographie de la surface.

Comme la cryoEM, la microscopie à force atomique a rapidement été utilisée pour observer les virus (Kuznetsov & McPherson 2011; McPherson & Kuznetsov 2011). La figure 1.12 regroupe quelques images obtenues par AFM de différents virus. Sur la figure 1.12.a, on voit au centre du virus de la mosaïque du tabac (TMV) la structure hélicoïdale. Le pas mesuré est de 23 nm. Sur la figure 1.12.b, la surface de la capside du virus de l'herpès (HSV) est irrégulière. Les protubérances, correspondant aux protéines de structure, s'organisent de manière périodique sur les facettes de l'icosaèdre. Les sommets sont mis en évidence par les ronds noirs. Le virus représenté sur la figure 1.12.c est le bactériophage T4. A gauche, on remarque les différentes parties du virus, la tête en haut, la gaine et la plateforme en bas. Les protéines sont organisées sur les facettes triangulaires, composées chacune de dix hexagones.

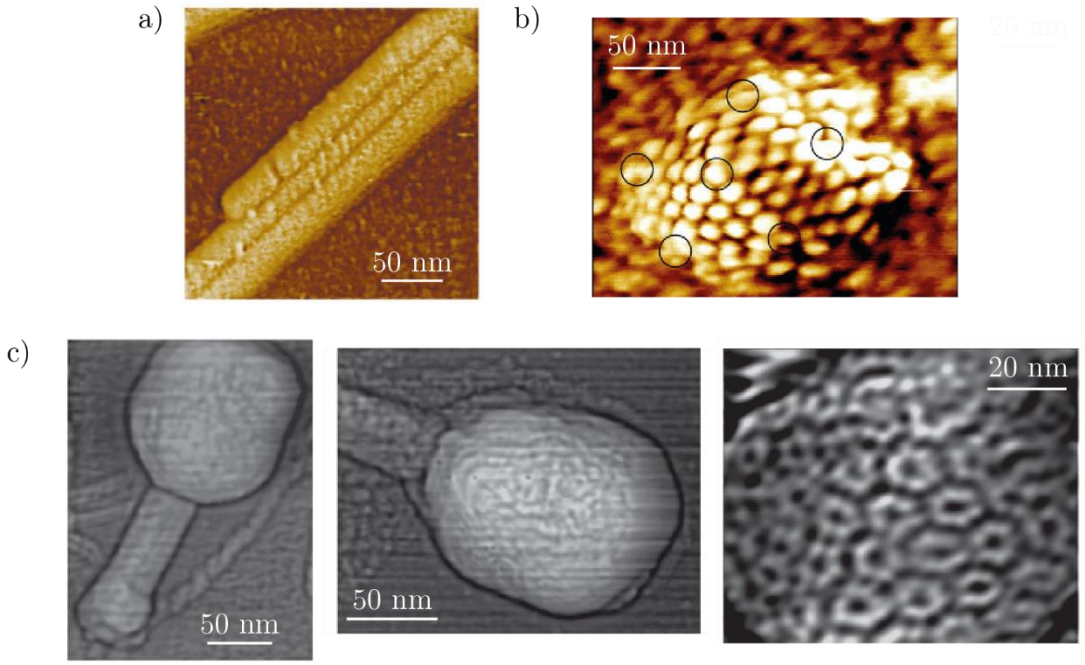


figure 1.12 - Images par AFM dans l'air de différents virus déposés sur du mica.
a) TMV sur mica. On retrouve la morphologie type bâtonnet observée en cryoEM. (McPherson & Kuznetsov 2011).
b) HSV (*herpèsvirus*) sur mica (Plomp et al. 2002).
c) Bactériophage T4 sur mica à différentes échelle (Kuznetsov et al. 2011).

L'AFM est un instrument d'observation d'une surface de haute précision, dans des conditions normales en température et physiologiques en liquide. Cette particularité reste un avantage devant la cryo-microscopie électronique. Il est ainsi possible d'observer les virus dans un milieu où l'expérimentateur contrôle les caractéristiques (concentration ionique, température, …). La modification de la surface sur laquelle est déposé les particules virales permet également d'étudier les affinités entre les virus et certaines couches lipidiques par exemple. En mimant une membrane cytoplasmique par une bicouche lipidique, l'équipe de P. E. Milhiet a ainsi confirmé par AFM certains mécanismes mis en jeu lors de l'entrée du virus de la grippe (Dahmane et al. 2014). L'acide sialique présent sur la membrane cellulaire est suffisant pour permettre la reconnaissance et la fusion du virus enveloppé.

Cependant, il est impossible de savoir ce qu'il « se passe à l'intérieur » des capsides puisque l'AFM repose sur une sonde de surface.

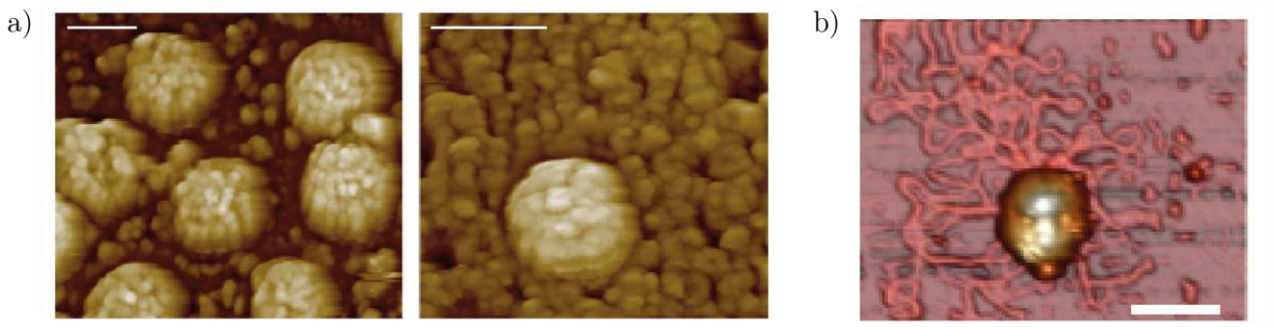


figure 1.13 - Image par AFM a) de la sortie de MLV d'une cellule infectée b) d'un bactériophage ayant éjecté son génome en liquide.
a) La barre d'échelle représente 100 nm (Kuznetsov & McPherson 2011).
b) La barre d'échelle représente 100 nm (Carrasco et al. 2009)

L'AFM n'a que 30 ans et peut réaliser des images de très haute résolution de virus. Les innovations qui lui sont associées offrent de nouvelles perspectives d'étude. Il est maintenant possible de réaliser des images en un temps très court et donc d'observer l'évolution dynamique de la structure de certaines protéines (on parle d'*High Speed AFM*), comme par exemple le moteur biologique rotatif F1-ATPase (Ando 2013).

Ainsi, la cryoEM et la cristallographie offrent la possibilité d'observer l'intérieur des objets biologiques, elles ne permettent pas d'étudier les phénomènes dynamiques, comme l'évolution du virus lors de son cycle. A l'inverse, les évolutions technologiques de l'AFM permet déjà d'observer « en temps réel » l'évolution rapide de certains systèmes biologiques, il est encore impossible d'observer leurs structures internes. Ces contraintes obligent d'employer des méthodes indirectes, comme l'utilisation de mutants, de drogues ou de produits chimiques pour séquencer le cycle viral en différentes étapes (Bernaud et al. 2015).

2. Dynamique du cycle viral

La petite taille des virus a obligé les scientifiques à inventer et exploiter des méthodes d'observation ne faisant pas intervenir directement les ondes électromagnétiques. Cependant, comme nous l'avons souligné dans le paragraphe précédent, ces instruments limitent l'observation directe du virus lors des modifications qu'il subit dans la cellule infectée lors de son cycle viral. Etrangement, c'est grâce à certaines propriétés optiques de certaines molécules et plus précisément à la fluorescence que ce problème a été contourné.

a. Fluorescence et détection de protéines virales

Les microscopes de type optique sont limités par le phénomène de diffractions dès que les dimensions des objets étudiés se trouvent en dessous de la limite d'Abbe d'environ 200 nm. Pourtant, depuis une décennie, de nouveaux instruments d'optique permettent d'outre passer cette frontière en s'appuyant sur le phénomène de fluorescence, dans des conditions spécifiques : ce sont les méthodes de super-résolution.

La microscopie par fluorescence classique existe depuis une cinquantaine d'années. Eclairée par une onde électromagnétique, une molécule peut, sous certaines conditions sur la longueur d'onde par exemple,

absorber les photons associés et se placer dans un état excité. La désexcitation peut entrainer l'émission spontanée et rapide de photons de longueur d'onde différente de l'onde incidente (Wilson & Hastings 1998). Ce phénomène, appelé fluorescence, est couramment utilisé en biologie depuis la découverte et la mise au point du protocole de synthèse de la protéine GFP, *Green Fluorescence Protein* (protéines produites chez certaines méduses émettant naturellement par fluorescence de la lumière verte), en 1962 (Ehrhardt 2003). Si la GFP reste la plus utilisée, d'autres protéines de différentes couleurs sont maintenant synthétisables (Tsien 1998).

Des molécules fluorescentes, comme la fluorescéine, couplées à des anticorps ciblent les protéines étudiées (Fritschy & Hartig 1999). Une autre méthode consiste à produire des protéines fusions composées de la protéine d'intérêt couplé à celle fluorescente. On peut alors détecter la localisation intracellulaires de plusieurs types de protéines en même temps en faisant varier la couleur de fluorescence (Fritschy & Hartig 1999). Allier cette méthode à l'AFM offre la possibilité de cibler la position de l'objet étudié (avec toujours une précision limitée par la limite d'Abbe L_A) par fluorescence afin d'obtenir des images de très haute résolution par AFM (Hecht et al. 2012).

Cette méthode de marquage des protéines par fluorescence reste l'une des plus utilisées pour réaliser des expériences de biochimie (reconnaissance de protéines spécifiques dans un échantillon par exemple que nous verrons par la suite – voir Chap. 3 et Chap. 4).

b. Observer le cycle viral

Cependant, une protéine fluorescente comme la GFP dont le diamètre n'excède pas 5 nm, apparaitra au microscope comme une tâche circulaire d'Airy due à la diffraction de diamètre supérieur à 200 nm.

Depuis une dizaine d'années, de nombreux microscopes optiques, appelés microscopes à super-résolution, ont vu le jour. Bien qu'il soit impossible de « voir optiquement » la structure d'objets biologiques comme les virus, l'utilisation de la fluorescence permet de résoudre des objets dont la taille est inférieure à la limite d'Abbe. On pourrait citer par exemple le microscope PALM (pour *Photo-Activated Localization Microscopy*) inventé par E. Betzig (en 2006), le STORM (pour *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) inventé par M. J. Rust (en 2006 également) ou encore le microscope STED (pour *STimulated Emission Depletion*) inventé par S.W. Hell. Betzig et Hell reçurent le prix Nobel en 2014 pour leurs inventions qui révolutionnèrent la microscopie optique. Permettant des résolutions inférieures à quelques dizaines de nanomètres, ces microscopes ont vite trouvé leur utilité dans le domaine de la biologie (Liu et al. 2015; Kamiyama & Huang 2012; Leung & Chou 2011).

Le principe du PALM repose sur des protéines fluorescentes photoactivables, Leurs propriétés de fluorescence peuvent être modifiées si on les éclaire avec une lumière de grande intensité. En jouant sur un faible taux d'activation, il est possible d'activer un nombre très restreint de protéines fluorescentes isolées à une longueur d'onde bien précise pendant un temps restreint avant d'être détruites. Les positions des centres d'émission de fluorescence sont relevées avec une précision très importante (inférieure à quelques dizaines de nanomètres), à condition qu'elles soient éloignées de quelques centaines de nanomètres pour éviter tout recouvrement des tâches d'Airy. Au fur et à mesure de l'activation, la superposition des localisations donne la

répartition des protéines (Betzig et al. 2006; Hess Girirajan T, Mason M 2006). Pour le microscope STORM, deux protéines fluorescentes sont liées. Sous l'éclairage faible d'un faisceau, la première protéine fluoresce et excite la deuxième protéine qui a son tour émet de la lumière à une certaine longueur d'onde pendant quelques instants. Le faible nombre de sources lumineuses et leurs éloignements permet de remonter facilement à leurs localisations (Rust et al. 2006).

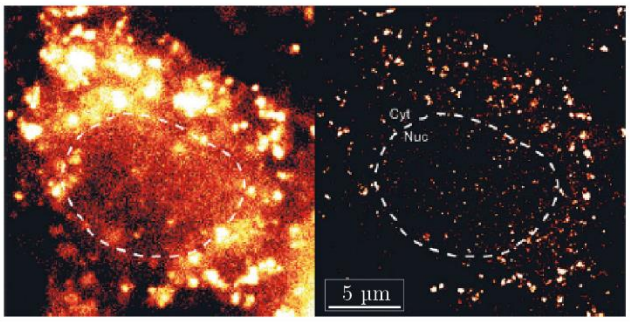


figure 1.14 – Image du noyau d'une cellule infectée par le VIH-1 de microscopie par fluorescence (à gauche) résolue par PALM (à droite). (Lelek et al. 2012)
L'intégrase, enzyme virale du virus VIH-1 est marqué par une protéine fluorescente photoactivable.
La frontière en pointillé est la membrane nucléaire.

La précision de ces deux techniques se situe couramment autour de 40 nm mais peut atteindre 15 nm.

Bien que la résolution n'atteigne pas celles des microscopes électroniques, ces différentes méthodes de microscopie ont montré leur efficacité pour l'étude de certaines protéines virales (Grove 2014; Colberg-Poley et al. 2015). La localisation de zones d'entrée du virus de la grippe a pu être mise en évidence en ciblant ses protéines d'enveloppe HA avec une résolution de 40 nm (Hess et al. 2007). En marquant l'actine cellulaire avec une autre protéine fluorescente, les images de super-résolution ont révélé une co-localisation entre l'actine et les protéines HA de part et d'autre de la membrane de la cellule hôte (Gudheti et al. 2013). Par ailleurs, la migration du génome à l'intérieur de la cellule hôte peut ainsi être suivi, comme pour la capside du VIH-1 (Lelek et al. 2012). La migration des protéines virales, dans le cytoplasme de l'hôte, lors de la formation des nouveaux virus est également rendu visible via la fluorescence, comme les différentes protéines du VIH-1 pour remonter à un scénario d'assemblage à la membrane (Chojnacki & Müller 2013).

De manière plus générale, ces études ont mis en évidence le caractère dynamique du cycle viral avec une modification des structures du virus tout au long des différentes étapes. En contact avec un microenvironnement changeant, le virus adopte des formes variées, sous la forme de virion, de génome viral et de protéines s'assemblant pour créer de nouveaux virions. Les propriétés physiques sont donc amenées à changer également, qu'elles soient morphologiques (voir Chap. 1.II.1) ou mécaniques.

3. Propriétés mécaniques du virion

Les virus, comme nous l'avons vu dans la première partie, peuvent avoir une structure physique bien définie, sous la forme de virions. Cette structure est soumise aux contraintes environnementales, qu'elles soient thermiques, chimiques (avec les changements de pH à l'échelle du système hôte voire de la cellule) ou encore

mécaniques (au travers de forces électrostatiques par exemple). Les propriétés physiques sont par conséquent amenées à s'adapter au microenvironnement pour maximiser l'efficacité de l'infection. Les biophysiciens ont mis en place différentes méthodes pour quantifier ces propriétés mécaniques.

Par exemple, l'assemblage des protéines de structure et la mise en place du génome à l'intérieur de la capside formée doivent nécessairement faire intervenir des interactions entre la capside (en formation ou déjà formée) et le génome.

a. Pression interne dans les capsides

L'encapsidation du génome à l'intérieur de la capside se fait selon deux mécanismes possibles (Mateu 2013; Hagan 2014):

- Les protéines de structure s'assemblent autour du génome formant la capside protéique (c'est le cas de la capside mature du VIH-1). Ce type d'assemblage suit de nombreuses règles contrôlant par exemple la longueur du génome encapsidé. Des observations par diffusion des neutrons sur le virus CCMV, *Cowpea Chlorotic Mottle Virus*, montrent une proportionnalité entre cette longueur et le nombre de protéines formant la capside (Tresset et al. 2014). Ces résultats expérimentaux et plusieurs modèles numériques proposent que les interactions électrostatiques entre la charge négative du génome et la charge positive des protéines de structure soient en grande partie à l'origine de cette sélectivité (Erdemci-Tandogan et al. 2014).
- Les protéines s'autoassemblent pour constituer la capside vide. Le génome est ensuite introduit à l'intérieur par l'action d'un moteur moléculaire (c'est le cas du virus AAV).

Par exemple, l'encapsidation de l'ADN double brin des bactériophages à structure mixte se fait à partir d'une tête immature préalablement assemblée (figure 1.15.a). Un moteur biologique relié à l'ADN se fixe au niveau du portail de la tête. En présence d'ATP, le moteur injecte le double brin d'ADN dans la tête, ce qui aura pour effet de modifier la structure de cette dernière lui donnant sa forme mature icosaédrique (Casjens 2011; Rossmann & Rao 2012).

Une expérience historique très célèbre a été proposée par l'équipe de C. Bustamante pour mesurer la force mécanique développée par le moteur pour faire entrer l'ADN de 19 300 paires de bases du bactériophage φ29 (Smith et al. 2001). Cette expérience s'appuie sur les pinces optiques (figure 1.15.b). Ce dispositif utilise un laser focalisé par un objectif de microscope sur une bille A transparente pour la piéger dans un puits de potentiel et une bille B dont la position fixe est contrôlée par l'expérimentateur. Entre les deux se trouve un brin d'ADN accroché par un bout sur A par de la biotine streptovadrine. L'autre extrémité est reliée au portail de la tête d'un bactériophage φ29, fixée par des anticorps sur la bille B. L'ADN utilisé est la réunion de celui du bactériophage φ29 et une partie de celui du λ, donnant un génome artificiel de 34 700 paires de bases. Les deux billes sont éloignées pour que la tension de l'ADN soit de 5pN, mesurée grâce aux pinces optiques. En présence d'ATP, le moteur moléculaire commence son processus d'encapsidation d'ADN convertissant l'énergie chimique, produite par la réaction $ATP \longrightarrow ADP + Pi$ (environ $20k_BT$ par ATP consommé), en travail mécanique. L'ADN à l'extérieur va se tendre au fur et à mesure qu'il rentre à l'intérieur de la capside. La tension du brin augmente, tendant à rapprocher les deux billes. Dans un premier temps, un système de rétroaction sur la position de B sert à maintenir la tension à 5 pN pour suivre l'entrée du génome (figure 1.15.c). La vitesse d'entrée est d'environ 100 paires de bases par seconde puis décroit fortement jusqu'à atteindre une valeur nulle

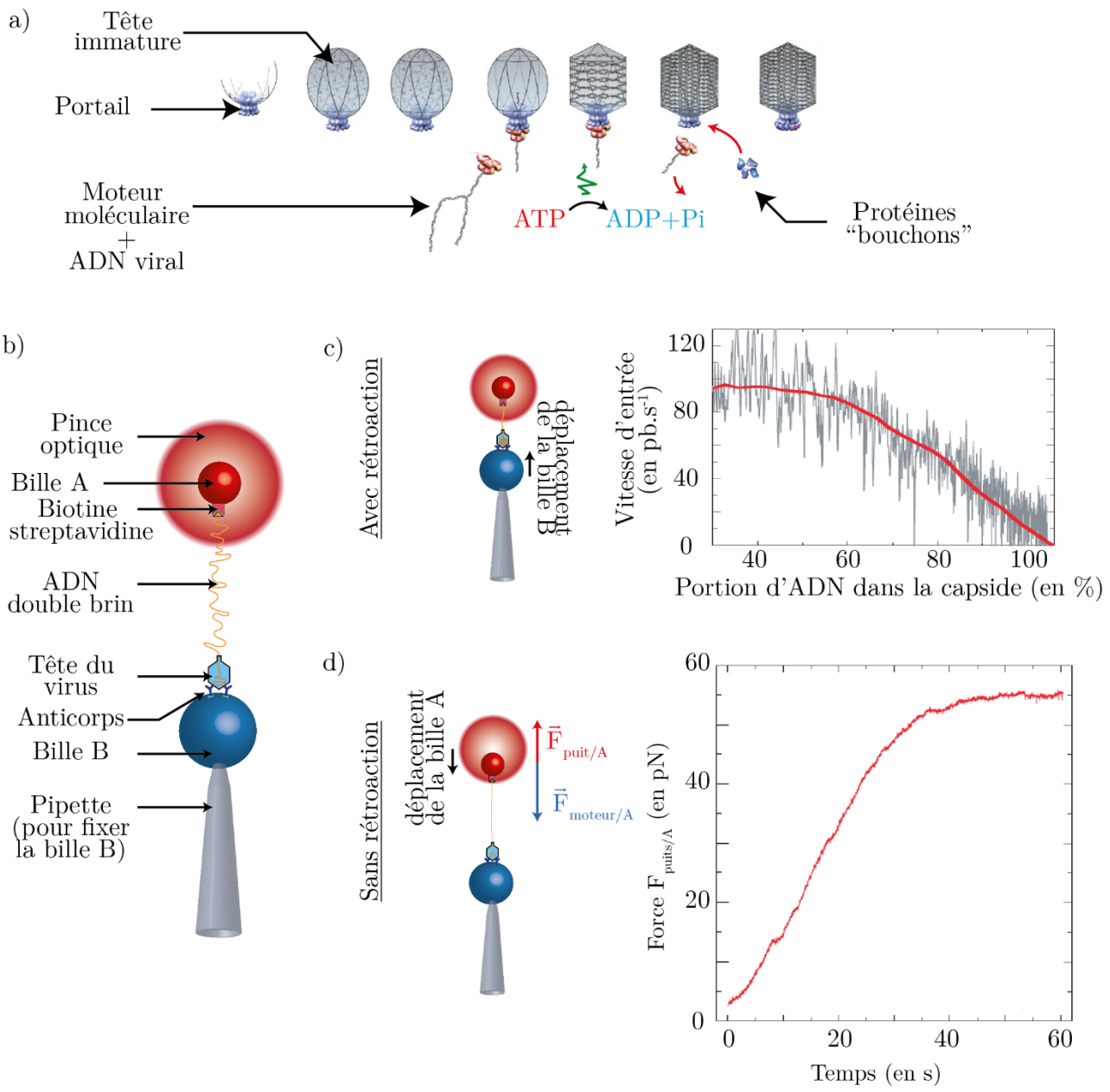


figure 1.15 - Moteur moléculaire et compaction de l'ADN dans une capside virale

a) Scenario d'encapsidation de l'ADN du bactériophage φ29. Les protéines de la tête s'auto-assemblent autour du portail pour donner une capside immature. Le moteur et l'ADN se fixent sur le portail. En présence d'ATP, le moteur convertit l'énergie chimique produite par l'hydrolyse de l'ATP en travail mécanique menant au pompage du génome dans la capside. A la fin, le moteur se détache et des protéines se rassemblent à la sortie pour créer une sorte de « bouchon » empêchant la sortie de l'ADN compacté avant la prochaine infection du virus mature (Rossmann & Rao 2012).

b) Description du montage d'après (Smith et al. 2001). La pince optique crée un puits de pontentiel harmonique : la force appliquée sur la bille A est proportionnelle à la distance entre le centre du piège et celui de la bille. La pipette permet à l'expérimentateur de déplacer la bille B (Smith et al. 2001).

c) Avec la rétroaction sur la position de B, la force de tension de l'ADN est constante (5pN). A cette force, la vitesse d'encapsidation est initialement d'environ 100 bases par secondes puis diminue avec le remplissage simultanée de la tête jusqu'à une valeur nulle lorsqu'on est proche de 100% du génome dans la capside (Smith et al. 2001).

d) Sans la rétroaction, seule la bille A est mobile. Le moteur se trouvant sur la bille B tire alors via l'ADN la bille A qui est piégé dans le puits de potentiel. Plus la bille A s'éloigne du centre du puits, plus la force $F_{puits/A}$ augmente. La force maximale développée par le moteur est de 57 pN (Smith et al. 2001).

pour une longueur d'ADN légèrement supérieure à celle du génome sauvage. Plus la capside se remplit, plus la pression interne augmente jusqu'à ce que le moteur ne développe une force suffisante et finisse par caler. Dans un second temps, la bille B est maintenue immobile de même que la position du piège (figure 1.15.d).

Toujours en présence d'ATP, la tension du brin d'ADN augmente, contrant la force produite par la pince optique, faisant rapprocher la bille A. La distance maximale parcourue dans le puits de potentiel créé par la pince optique permet de remonter à la force maximale capable d'être développée par le moteur. Elle est de 57 pN : dans cette configuration, la conversion énergie chimique / travail mécanique est de l'ordre de 30%. La pression interne importante peut expliquer le mode de contamination particulier des bactériophages, qui après avoir été reconnu par les récepteurs bactériens, se fixent sur la membrane et éjectent une grande partie de son génome spontanément dans la bactérie, sous l'effet de la pression très importante dans la capside (Ponchon et al. 2005).

Cette expérience a été la première a démontré l'existence d'une pression interne dans la capside, pression pouvant faciliter l'éjection future du génome viral.

De nombreuses approches numériques ou analytiques proposent une explication de l'existence d'une pression interne exercée par le génome sur les parois de la capside (Tzlil et al. 2003; Purohit et al. 2003). Plusieurs paramètres physiques rentrent en jeu :

- La fraction volumique occupée par le génome dans la capside de volume v_{cap} (en nm^3). Il s'agit de la proportion réelle du volume occupé par le génome par rapport à celui accessible dans la capside. Pour le calcul, chaque base est modélisé par un cylindre de hauteur h représentant la distance entre deux bases et de rayon R égal à celui de la chaine génomique. La fraction volumique d'un génome de N bases est donnée par :

$$f = \frac{\pi R^2 h N}{v_{cap}} \tag{1.1}$$

  Pour un génome d'ADN ou d'ARN double brin, h = 0,34 nm et R = 1 nm (Calladine et al. 2004).
  Pour un génome d'ADN ou d'ARN simple brin, nous prendrons h = 0,34 nm comme pour l'ADN double brin, et un rayon R = 0,5 nm. Il est à noter que l'estimation de h est très grossière puisqu'elle dépend fortement de la séquence du génome, des ions autour du génome et de la température (Seol et al. 2007; Chen et al. 2010). C'est pour cela que toutes les fractions volumiques ou les rayons de giration calculés par la suite ne sont que des ordres de grandeur.
  La fraction volumique de l'ADN double brin dans le bactériophage T7, où N = 48500 paires de bases, est de 0,6, ce qui est proche de la fraction volumique maximale de 0,74 correspondant à un réseau cristallin compact (figure 1.16).
- La longueur de persistance du génome l_p. Il s'agit de la longueur typique sur laquelle le polymère maintient sa forme malgré les déformations induites par l'agitation thermique. Plus elle est importante, plus il est difficile de courber le polymère. Celle des génomes double brin est d'environ 50 nm (Smith et al. 1996) tandis que celle des simple brins serait de vingt à cinquante fois moins importante (Smith et al. 1996; Chen et al. 2012). Dans un milieu non contraint, en solution par exemple, le polymère se gonfle du solvant, comme une éponge humide, pour occuper un espace beaucoup plus grand que son volume propre. Le rayon de giration R_g est défini comme le rayon de la sphère qu'occuperait tout le

polymère libre. Pour un génome constitué de N bases (ou paire de bases) de longueur b, R_g est estimé à :

$$R_G = \sqrt{\frac{Nbl_p}{6}} \tag{1.2}$$

dans le modèle d'une chaine gaussienne de longueur Nb (représentée par des bâtonnets non chargés rigides de longueur l_p connectés aux extrémités et dont les orientations sont équiprobables).
Par exemple, pour le bactériophage **λ**, le génome recouvre en solution une sphère de 370 nm de rayon, soit un volume environ 400 fois plus grand que celui permis par la capside. Ceci peut justifier en partie la pression interne importante dans le virus.

- Les interactions électrostatiques entre le génome et la capside sont également importantes. Il est d'ailleurs à noter que le rayon de giration R_g calculé précédemment est sous-estimé : la répulsion électrostatique à l'intérieur de la pelote statistique du polymère même tend à augmenter le volume occupé. Cet effet sera diminué avec une forte concentration en ions monovalents (comme Na^+ ou Cl^-) ou une faible concentration en ions divalents (comme Mg^{2+}).

Pour minimiser l'énergie, le génome s'organise dans la capside. Ainsi, le double brin d'ADN du bactériophage forme une phase organisée, quasi cristalline, avec une fraction volumique du génome proche de 0,74, en suivant la paroi interne de la tête comme le décrit la figure 1.16 (Cerritelli et al. 1997).

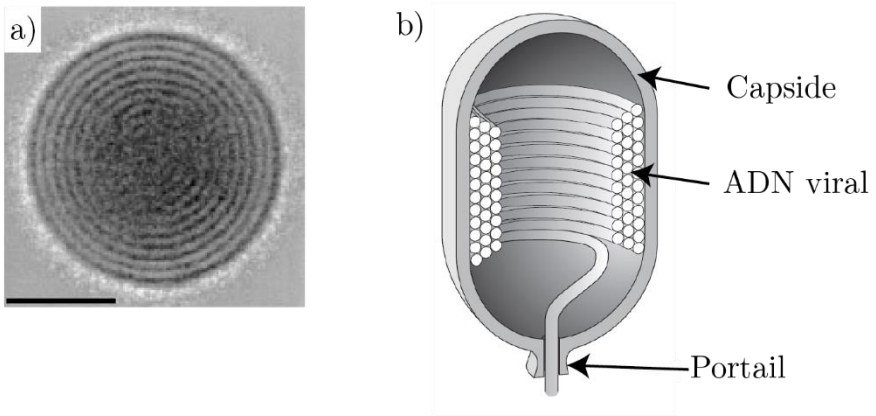


figure 1.16 - Reconstruction par moyennage d'images cryoEM de l'intérieur d'une tête du bactériophage T7.
a) Vu de dessus de l'image moyennée obtenue sur 77 têtes de bactériophages T7. On peut voir des couches concentriques correspondant à l'ADN du virus (Cerritelli et al. 1997).
La barre d'échelle représente 25 nm.
b) Représentation schématique du génome viral dans la tête (Phillips 2009).

b. Déformer mécaniquement le virus

L'utilisation du microscope à force atomique a été détournée de sa fonction primaire d'instrument d'observation pour sonder les propriétés mécaniques de certaines surfaces. Ces expériences, appelées nano-indentations mécaniques, ont été alors adaptées par les biophysiciens pour déterminer les propriétés mécaniques des capsides virales (De Pablo & Mateu 2013) .

Le principe de la nano-indentation par AFM est d'utiliser la pointe reliée à son levier comme un système venant appuyer et déformer la capside. Lors de cette opération, le levier se déforme également. Cette modification de sa courbure est suivie par le système laser et capteur optique, donnant une courbe représentant la déflexion du levier en fonction de son déplacement vertical : la courbe de force. En connaissant les caractéristiques mécaniques du levier et sa déflexion lors de l'appui sur le virus, on remonte à la déformation de la capside. Différents modèles existent pour caractériser la capacité de la capside à se déformer (Attard 2007; De Pablo & Mateu 2013).

Le modèle le plus simple reste le modèle linéaire : la capside est modélisée par un ressort de constante de raideur k_{vir}, exprimée en N/m. Plus k_{vir} est grand, plus la capside est difficile à déformer et donc plus elle est rigide. Cette constante de raideur dépend de la géométrie de la capside. Ce modèle a été appliqué sur de nombreuses expériences d'indentation pour caractériser la déformation des virus (Roos et al. 2010; Mateu 2012). En jouant sur certains paramètres biologiques, il est possible d'obtenir des capsides virales vides, sans génome à l'intérieur, ou des capsides pleines ou encore figée dans un état biologique correspondant à une étape de leur cycle viral. Le tableau 1.1 résume certaines de ces expériences. On peut remarquer que les raideurs des virus, qu'ils soient enveloppés ou non, semblent du même ordre de grandeur excepté pour le virus VIH-1 sous sa forme immature. Durant le cycle viral de ce virus enveloppé (voir Chap. 1.III.3), à sa sortie de la cellule hôte, le virion se trouve sous une forme dite immature où la capside de forme sphérique occupe tout l'espace à l'intérieur de l'enveloppe. Dans sa forme mature, conséquence du clivage de la protéine virale Gag en trois protéines, la capside est conique et n'occupe qu'une partie du volume accessible. Cette différence de structure semblerait être à l'origine d'un changement de rigidité d'un ordre de grandeur (Kol et al. 2007).

Virus	Structure	Morphologie	Configuration	Taille	Raideur k_{vir}
Bactériophage λ (Ivanovska et al. 2007)	Mixte	Tête icosaédrique	Vide	Diamètre ≃ 50nm	0,13 N/m
			Pleine		0,23 N/m
Bactériophage φ29 (Hernando-Pérez et al. 2012)	Mixte	Tête pseudo-icosaédrique	Vide	52 nm grand axe 42 nm petit axe	0,23 N/m
			Pleine		0,33 N/m
HSV-1 (Roos et al. 2009)	Enveloppé	Capside icosaédrique	Vide	Diamètre ≃ 125 nm	0,33 N/m
			Pleine		0,33 N/m
VIH-1 immature (Kol et al. 2007)	Enveloppé	Capside conique	Mature	Diamètre ≃ 100 nm	0,22 N/m
		Capside sphérique	Immature	Diamètre ≃ 120 nm	3,16 N/m

tableau 1.1 - Constantes de raideurs de certains virus mesurées par nano-indentation AFM

Un autre modèle est souvent utilisé : celui de la coque élastique. Ce modèle ne prend plus en compte la déformation globale du virion mais plutôt de combien celui-ci s'est déformé lorsque la pointe a appuyé sur lui, on parle d'indentation. La contrainte mécanique est reliée par une loi de puissance à cette indentation. Le

coefficient de proportionnalité dépend de *E*, le module d'Young. Sa valeur mesure l'élasticité intrinsèque de l'objet déformé indépendamment de sa forme : plus *E* est grand, moins l'objet se déforme facilement. Cependant, si *E* ne dépend pas de l'aspect de la capside, son obtention est très largement dépendante de la géométrie puisque les lois utilisées dépendent de la forme du contact entre le virus et la pointe. Cela nécessite donc des analyses plus complexes, numériques via les éléments finis par exemple, permettant de remonter à E ou de mettre en place des modèles robustes permettant de remonter aux propriétés mécaniques des objets biologiques (Vella et al. 2012). Les virus présenteraient un module d'Young de l'ordre du GPa (Hartschuh et al. 2008), ce qui est trois ordres de grandeur supérieur par rapport à d'autres systèmes comme des vésicules de tailles équivalentes (Liang et al. 2004).

Pour mesurer la fragilité physique des virus, c'est-à-dire la modification irréversible de la structure, une autre grandeur est prise en compte : la force maximale de rupture. L'apparition d'une cassure sur la courbe de force laisse une signature visible. Plus une capside est fragile, plus la distance parcourue par la pointe avant une cassure est faible (Buenemann & Lenz 2007; Roos et al. 2010; Hernando-Pérez et al. 2014). Un autre paramètre pour mesurer la fragilité d'un virus est sa fatigue mécanique face à de faibles indentations répétées (Ortega-Esteban et al. 2013), induit par un réarrangement progressif voire un arrachage de protéines de la structure.

En contrôlant biologiquement la présence ou l'absence de génome à l'intérieur de la capside, on peut mesurer directement son influence sur la capside protéique. Le génome peut ne pas avoir d'influence sur la raideur du virus, comme pour HSV (tableau 1.1 et (Roos et al. 2009)). Par contre, dans le cas du bactériophage λ, la présence de l'ADN prend une part importante de la rigidité et de la stabilité de la capside. En contrôlant la longueur d'ADN encapsidée, l'équipe d'A. Evilevitch a montré une dépendance entre la fraction volumique d'ADN à l'intérieur et la constante de raideur de la capside, mettant ainsi en évidence un lien étroit entre pression interne et propriété mécanique (Ivanovska et al. 2007).

L'un des avantages de l'AFM est la facilité à pouvoir changer le milieu environnant des virus lors de la mesure mécanique.

Augmenter la force ionique en ajoutant des ions monovalents dans l'environnement, capable de passer au travers de l'édifice protéique du virus (capsides perméables aux ions), a pour conséquence une diminution de la constante de raideur mesurée sur la capside pleine de HSV contrairement au cas de la capside vide (Sae-Ueng et al. 2014). Cette évolution s'interprèterait comme une fluidification de l'ADN viral fortement compacté dans la capside, puisque les ions monovalents écranteraient les interactions dans le génome, facilitant sa sortie de la capside. Ce résultat justifierait la disparité d'infectiosité entre différents types de cellules neuronales dont la concentration saline varie fortement de l'un à l'autre.

Les ions divalents peuvent également avoir un effet sur les propriétés mécaniques mesurées. Alors que la constante de raideur de capsides vides de bactériophage λ ne semble pas être affectée par une augmentation de la concentration en ions Mg^{2+}, de 10 mM à 70mM, restant autour de 0,13 N/m, celle de capsides pleines est fortement modifiée passant de 0,23 N/m à 0,15 N/m (Evilevitch et al. 2011). Ce comportement peut être interprété par l'existence de la pression interne, exercée par l'ADN sur les parois de la capside pouvant être réduite quand la concentration en ions divalents augmente. La création de ponts ioniques Mg^{2+}, à l'intérieur du brin a pour conséquence une compaction de l'ADN et donc de diminuer la contrainte exercée par le génome sur la paroi interne de la capside.

En couplant la haute résolution de l'imagerie AFM et ces expériences de nano-indentation, il est possible de tester l'anisotropie des propriétés mécaniques. Les capsides icosaédriques possèdent des axes de symétries principaux, d'ordres 5, 3 et 2 (figure 1.17). L'équipe de P.J. de Pablo a mesuré la constante de raideur du virus MVM, *Minute Mice Virus*, selon les trois axes (Carrasco et al. 2006). En l'absence de génome, la constante de raideur est la même, autour de 0,58 N/m. Par contre, en présence de génome, on observe une forte différence : 0,6 N/m selon l'axe d'ordre 5, 0,8 N/m selon l'axe d'ordre 3 et finalement 1,4 N/m selon l'axe d'ordre 2. Cette forte anisotropie s'explique par un modèle d'arrangement inhomogène de l'ADN à l'intérieur de la capside, privilégiant une direction particulière par rapport aux autres à travers des zones d'interactions importantes (figure 1.17). Ces expériences renforcent l'idée du rôle structurant du génome.

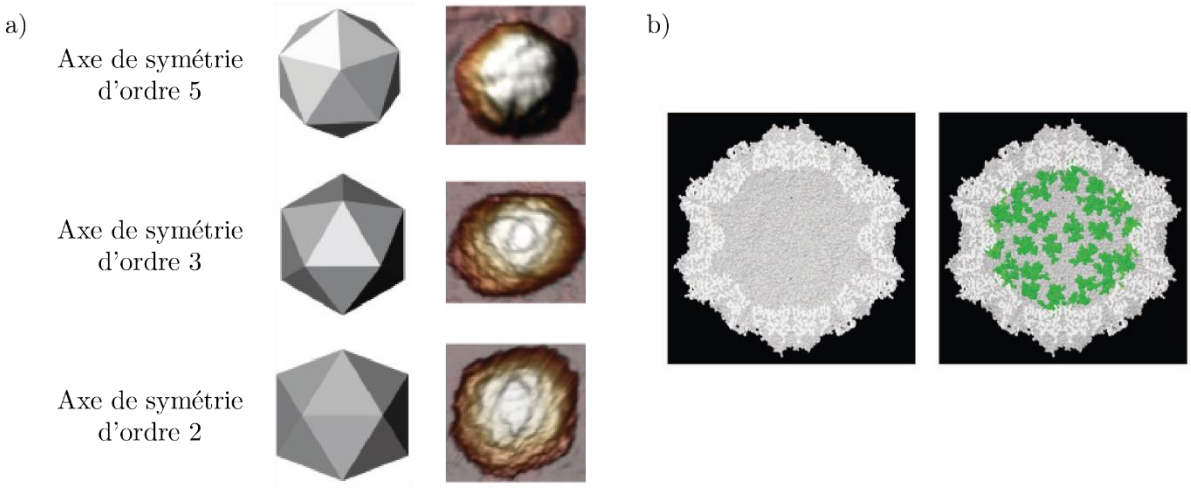


figure 1.17 - Anisotropie des propriétés mécaniques des virus icosaédriques (Carrasco et al. 2006)
a) Définition des axes de symétrie d'un icosaédre et images par AFM du virus MVM selon ces axes.
b) Reconstruction cristallographique de la capside de MVM (à gauche) et du virion contenant l'ADN dont les zones de contact avec la capside sont représentées en vert (à droite). Le diamètre de la capside est de 26 nm.

c. Mesure de la pression interne

La mesure expérimentale de la pression interne a nécessité une approche originale. L'idée est dans un premier temps de déclencher artificiellement la sortie du génome à l'extérieur de la capside sans détruire la capside, par le biais d'un chauffage ou grâce à une enzyme. En imposant artificiellement une pression externe, en utilisant la pression osmotique (contrôlée par la concentration en polymères non chargés ajoutés à l'extérieur), il est possible de contrôler la quantité du génome sorti. Une méthode biochimique ou optique permet de connaitre la longueur du génome resté à l'intérieur (voir Chap. 4.IV). Une loi expérimentale relie la concentration minimale de polymère inhibant toute éjection et la pression interne du virus (Parsegian et al. 1986).

Ce protocole a été utilisé pour l'étude de virus enveloppés, comme HSV (Bauer et al. 2013), et pour les bactériophages λ (Evilevitch et al. 2003; Evilevitch et al. 2005). Dans les deux cas, la pression interne mesurée atteignait 20 atm, ce qui correspond à l'ordre de grandeur de la pression dans une bouteille de Champagne !

4. Interactions protéines virales / récepteurs cellulaires

L'entrée du génome dans la cellule cible peut se faire avec la capside ou par injection directement dans le cytosol. Mais quel que soit le scénario d'entrée, le virus doit au préalable être reconnu par la cellule cible. Des interactions spécifiques entre les protéines virales d'enveloppe et les récepteurs cellulaires enclenchent le mécanisme qui mènera au passage de la particule ou génome dans le cytoplasme.

Pour quantifier ces interactions, le microscope à force atomique est utilisé en couplant la grande résolution d'une image AFM sur une surface de plusieurs micromètres carrés et la capacité à pouvoir caractériser les interactions entre la pointe et la surface via la mesure de la déflexion du levier lors de son approche et surtout de son retrait de la surface sur chacun des pixels qui constituent l'image (Heinz & Hoh 1999). En superposant l'image avec les interactions mesurées, on réalise ce qu'on appelle de la spectroscopie de force (figure 1.18).

Il est possible de se restreindre à un seul type d'interaction en fonctionnalisant la pointe, c'est-à-dire en greffant biochimiquement par des anticorps l'extrémité de la pointe. Les courbes de force auront un profil très particulier lorsque la pointe se trouvera sur un antigène correspondant : on cartographie ainsi les affinités des objets se trouvant sur la surface avec les structures associées à la pointe (Puchner & Gaub 2009).

Par exemple, en associant une protéine d'enveloppe virale à la pointe, on peut mesurer la force maximale d'adhésion entre celle-ci et un récepteur fixé sur la membrane cellulaire. Cette méthode permet de mieux comprendre quel récepteur est privilégié lors de la reconnaissance du virus par la cellule. En étudiant plus précisément les courbes de force associées, les interactions entre protéines d'enveloppe et récepteurs peuvent être caractérisées. Lors de la reconnaissance, le contact entre la protéine virale et la protéine cellulaire, bien que fort, ne dure qu'un temps fini, temps mesurable grâce à l'AFM. Connaitre cette grandeur détermine la constante cinétique de désorption. Cette dernière mesure a été réalisée par l'équipe de D. Wirtz (Dobrowsky et al. 2013) pour le virus VIH-1. Ils ont montré quantitativement que l'adhésion du virus à la cellule était plus importante lorsque la reconnaissance se faisait grâce au couple récepteur CD4 / corécepteur CCR5 par rapport

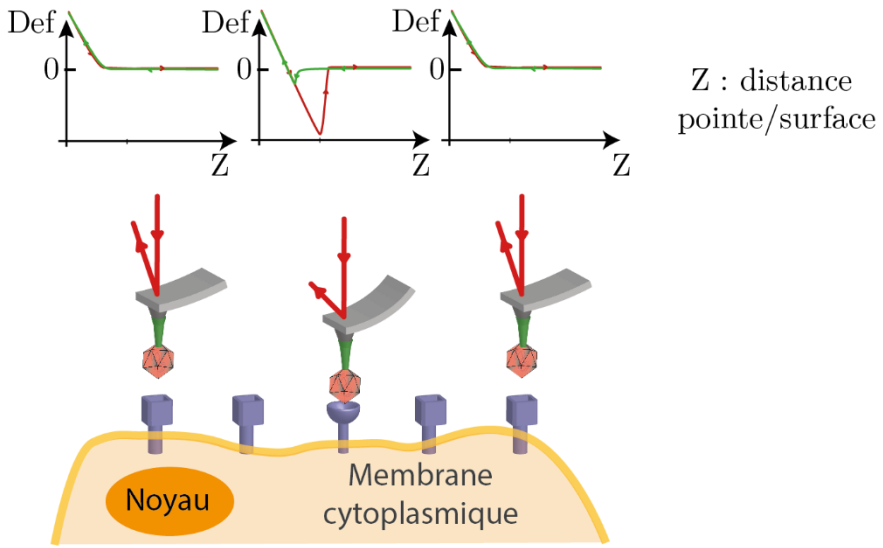


figure 1.18 – Schéma de principe de la spectroscopie de force avec une pointe fonctionnalisée par un virus balayant la surface d'une cellule où se trouvent des récepteurs.
La forme des courbes de déflexion en fonction de la distance pointe/surface obtenues sur chacun des récepteurs est différente si il y a une faible affinité (à gauche et à droite) ou forte (au centre) lorsqu'on approche le levier (en vert) et surtout lorsqu'on éloigne le levier (en rouge).

au couple CD4 / CXCR4. Ils ont ainsi confirmé une observation faite en virologie montrant une plus grande infection lorsque le corécepteur engagé est CCR5.

En fonctionnalisant la pointe non pas par une protéine, mais par un virion de la grippe entier, l'équipe de A. Herrmann (Sieben et al. 2012) a montré que plusieurs liaisons s'établissaient entre les récepteurs cellulaires et les protéines d'enveloppe HA (hémagglutinine) du virus de la grippe.

Ainsi, l'utilisation d'instruments expérimentaux, comme le microscope à force atomique, issus du domaine de la physique a permis de visualiser des objets biologiques jusqu'alors invisibles par les microscopes optiques. Le champ d'étude des virus s'est alors élargi à l'étude des structures des protéines, de leurs associations pour s'assembler sous la forme de capsides, de leurs interactions avec le génome et le microenvironnement.

En mimant les différentes étapes d'un cycle viral ou en observant directement le déplacement des particules virales dans les cellules hôtes, la biophysique des virus permet de mieux comprendre les paramètres rentrant en jeu dans le cycle viral en particulier liées aux modifications importantes de la structure.

La Physique appliquée à la Virologie a également apporté des concepts originaux, peu fréquemment associé aux objets biologiques. Les notions de fragilité d'un virus, de rigidité ou encore de pression interne justifieraient certaines observations faites en virologie.

C'est dans cette optique que mon travail de thèse s'est focalisé sur l'utilisation de ces méthodes pour l'étude des propriétés physiques de deux virus, le rétrovirus enveloppé VIH-1 et le virus icosaédrique AAV.

III. Le cas des rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus enveloppés appartenant au groupe VI de la classification de Baltimore. Leur génome est un ARN, d'orientation dite positive : cela implique que, pour qu'il y ait intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte, une étape de rétrotranscription, passant d'un ARN à un double brin d'ADN, doit exister (d'où leur nom). Cette transformation est favorisée par la présence d'une protéine virale dans le virion initial, appelée rétrotranscriptase (RT).

Cette famille de virus contient par exemple des virus oncogènes, à l'origine de cancers chez l'hôte, comme le premier rétrovirus humain découvert, HTLV-1, pour *Human T-Lymphotropic Virus I*, en 1981 par l'équipe de Robert Gallo (Coffin et al. 1998). Une autre sous-famille est constituée par les *lentivirus*, ou « virus lents » du fait de leurs longues périodes d'incubation. Le virus de l'immunodéficience humaine, ou VIH, appartient à cette sous-famille.

1. L'exemple du VIH-1

En 1981, deux publications, l'une par le *Center for Disease Control* de Los Angeles et le second par celui d'Atlanta, font état d'un taux anormalement important d'hommes homosexuels souffrant de sarcomes de Kaposi, tumeurs cutanées liées à l'infection d'un certain type du virus de l'herpès dont les lésions sont visibles et pour certains, liés à une pneumocystose (infection pulmonaire aigue). En 1982, de nombreux cas sont reconnus quel que soit le sexe et l'orientation sexuelle des personnes. La crise sanitaire est déclarée aux Etats Unis, puis dans le monde. Le sigle AIDS, pour *Acquired ImmunoDeficiency Syndrom* (SIDA en français, pour *Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise*) est adopté.

Les recherches de R. Gallo sur les rétrovirus poussent la communauté scientifique à désigner le virus HTLV comme étant à l'origine de l'épidémie. En 1983, l'équipe de L. Montagnier découvre une activité retrotranscriptase, signature des rétrovirus, et une apoptose importante des lymphocytes T contaminés, non observés pour les HTLV ainsi qu'une non reconnaissance des anticorps de HTLV (Barré-Sinoussi et al. 1983). Une image par microscopie électronique a permis de voir la sortie de virus d'un lymphocyte T (figure 1.19). La découverte de ce nouveau rétrovirus vaudra à F. Barre Sinoussi et L. Montagnier le prix Nobel de Médecine en 2008. L'isolation du virus, qui sera par la suite appelé VIH-1 pour Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1, et son étude s'est poursuivi jusqu'à maintenant (Pleskoff 2011). En 1986, l'équipe de L. Montagnier découvre un nouveau type du virus, nommé VIH-2.

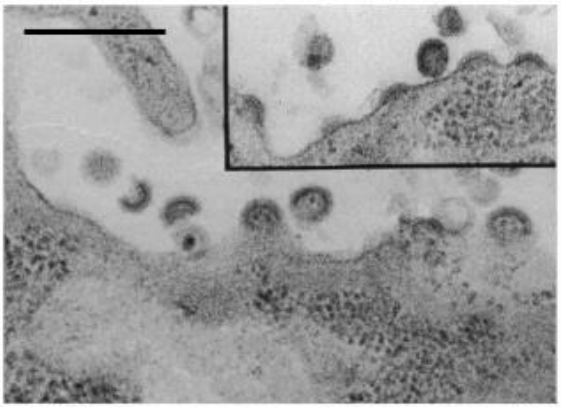


figure 1.19 - Image par microscopie électronique de 1983 d'un lymphocyte produisant des virions (Barré-Sinoussi et al. 1983).
La barre d'échelle représente 400 nm.

A travers le monde, la pandémie reste d'actualité avec 35 millions de personnes contaminées. A l'échelle mondiale, en 2012, 2,3 millions de personnes ont été infectés par le VIH. Dans les années 90, ce

nombre montait à 3,5 millions de personnes. Cette diminution peut être due aux nouveaux traitements, un accès à des infrastructures de santé et sociale facilité, des évolutions sociales et sociétales ainsi que des moyens de préventions importants (Cardin & Messager 2013). Cependant, les moyens de luttes restent très inhomogènes à travers le monde reflétant une disparité du taux de contamination, pouvant être encore très important dans certaines régions (comme l'Afrique du Nord ou l'Asie du Sud Est) (ONUSIDA 2013).

Bien qu'ils aient montré leurs efficacités comme traitement contre la réplication du VIH, comme traitement prophylaxique (post exposition) ou comme traitement préventif, les nouveaux traitements ne permettent pas la destruction des particules virales dans le patient (ANRS 2015). Ils consistent en un cocktail de médicaments appelé multithérapie dont les principes actifs diminuent voir arrêtent l'activité enzymatique de certaines protéines rétrovirales intervenant dans différentes étapes du cycle viral. Par exemple, l'AZT, pour azidothymidine, et la Névirapine sont des inhibiteurs de la rétrotranscriptase (Pleskoff 2011), agissant ainsi sur une étape du cycle viral en la bloquant cinétiquement.

La transmission du virus se fait par voie sexuelle , sanguine ou verticale de la mère au fœtus et au bébé (Shaw & Hunter 2012). Le VIH-1 se répliquent dans des cellules spécifiques du système immunitaire (les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques) et les cellules micro-gliales du système nerveux (Swanstrom & Coffin 2012), selon un cycle viral bien précis (figure 1.20) qui peut se séparer en deux phases, tardive et précoce (Freed 2001).

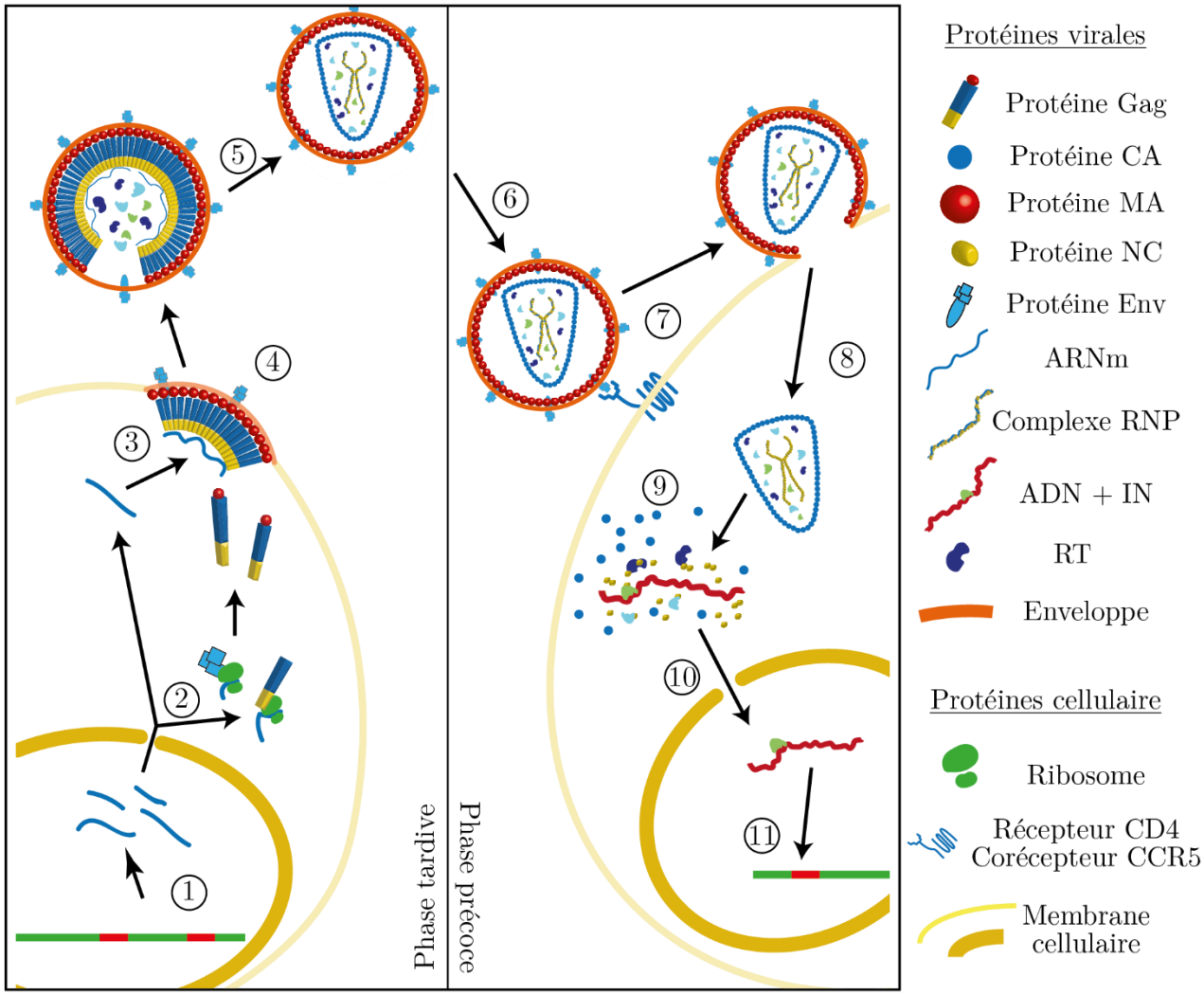
2. La phase tardive du cycle viral.

Lors de cette phase, la machinerie de la cellule infectée est détournée par différentes protéines virales régulatrices pour produire des particules infectieuses capables de contaminer de nouvelles cellules.

a. La phase tardive

1. Le génome viral (figure 1.21.b), présent dans l'ADN de la cellule infectée est transcrit en d'une part les ARNs messagers (ou ARNm) qui mèneront aux différentes protéines virales et d'autre part en ce qui deviendra le génome viral présent sous la forme de deux brins d'ARNs identiques de polarité positive dans les futurs particules virales.
2. La traduction des brins d'ARNm produit les polyprotéines Gag, Gag-Pol et Env et diverses autres protéines nécessaires aux différentes étapes du cycle viral. (Karn & Stoltzfus 2012).
3. Après migration dans le cytoplasme de la cellule infectée, les protéines Gag s'assemblent à proximité de la membrane lipidique pour qui elles ont une forte affinité à l'une de leur extrémité. Les protéines Env se placent également sur la membrane cytoplasmique (Sundquist & Krausslich 2012). Un enchainement de bases particulières sur le génome, appelé signal ψ, favorise l'assemblage sur deux simple brins viraux identiques de Gag qui présente une forte affinité à l'autre extrémité pour l'ARN (son affinité pour l'ARN viral est multiplié par 20 en présence de ψ). Des amas de protéines Gag sont alors formés à la surface de la cellule, étudiés par microscopie PALM par l'équipe de S. Manley (Gunzenhäuser et al. 2012).

a) Cycle viral



b) Génome viral

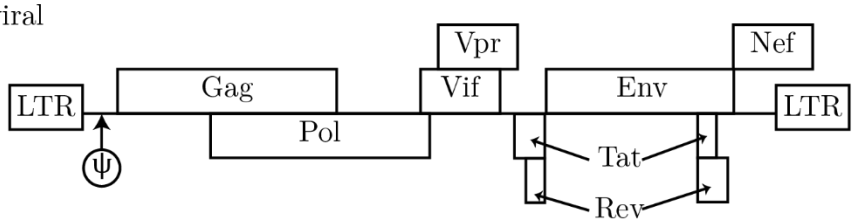


figure 1.20 - Cycle viral du VIH-1

a) Cycle viral du VIH-1. Phase tardive : 1) Transcription des gènes viraux présents dans le génome de la cellule infectée avec la production d'ARN messagers et des deux brins d'ARN viraux. 2) Traduction (après épissage) : le ribosome cellulaire produit les protéines de structure, les protéines accessoires, les protéines régulatrices et les enzymes viraux. 3) L'ARN viral et les protéines Gag migrent vers la membrane cytoplasmique. 4) Le bourgeonnement d'une particule virale immature qui se retrouve à l'extérieure de la cellule primaire. 5) Maturation du virion. La particule mature est maintenant infectieuse.

Phase précoce : 6) Reconnaissance de la protéine d'enveloppe par le récepteur CD4 et le co-récepteur CCR5 d'une cellule. 7) Fusion des membranes. 8) Entrée du core à l'intérieur de la cellule saine. 9) Libération du génome viral. A la fin de cette étape, la rétrotranscription complète de l'ARN en ADN a été faite par le rétrotranscriptase virale (RT). 10) Entrée dans le noyau. 11) intégration dans le génome de la cellule par la protéine intégrase (IN).

b) Génome du VIH-1. Lors de l'étape de maturation, le clivage de Gag mène aux protéines de structure MA, CA, NC et p6, le clivage de Pol mène aux protéines enzymatiques (RT, PT et IN). Env sont les glycoprotéines d'enveloppe. Les limites LTR présentent des signaux intervenant par exemple dans l'étape de rétrotranscription. Le signal ψ est un enchainement de bases nécessaire à l'encapsidation du génome dans le virus lors de l'étape 3.

4. L'étape de bourgeonnement mène à la production d'une nouvelle particule qui emmène avec elle une partie de la membrane cytoplasmique. Celle-ci est immature et bien qu'elle présente les protéines d'enveloppe à sa surface, elle ne peut contaminer de nouvelles cellules saines (Sundquist & Krausslich 2012).
5. Une faible activité auto-protéolytique de Gag-Pol mène à la formation des trois enzymes virales : la retrotranscriptase RT, l'intégrase IN et la protéase virale PR. Cette dernière clive les poly-protéines Gag-Pol et Gag en quatre entités distinctes. La protéine matricielle MA présente une forte affinité pour la bicouche lipidique. La protéine NC a une forte affinité pour l'ARN viral formant un complexe appelé RNP. Finalement les protéines CA s'autoassemblent autour du complexe RNP formant la coque protéique du virus enveloppé VIH-1 (Sundquist & Krausslich 2012).

Le virion est alors mature et capable d'infecter et de se répliquer dans une autre cellule.

b. Structure des particules (figure 1.21)

La microscopie électronique a permis dès la fin des années 80 de connaitre et de comprendre la structure des virions du VIH-1 (figure 1.21.a), sous leurs formes matures à partie d'images à très haute résolution (Briggs et al. 2003). Ces observations ont ainsi révélé la grande polydispersité en taille des particules virales (figure 1.21.b).

La bicouche lipidique couplée à une matrice interne de protéines MA entoure la capside virale. Des glycoprotéines d'enveloppe Env se répartissent sur cette membrane et permettent la reconnaissance des récepteurs cellulaires.

La capside virale, que nous appellerons par la suite core, est une coque protéique constituée d'environ 1500 protéines CA, s'organisant en hexamères et en pentamères pour former une structure conique (Briggs & Kräusslich 2011). Environ 250 hexamères de protéines CA et exactement 12 pentamères forment le core du VIH-1 (figure 1.21.c). La présence des 12 pentamères est obligatoire pour former les calottes aux extrémités du core.

La forme conique du core reste la plus couramment représentée. Cependant des observations par cryoEM ont montré l'existence d'autres configurations, cylindrique par exemple. L'équipe de W.I. Sundquists a obtenu des structures coniques et cylindriques (avec un ratio 2 pour 3) grâce à un protocole d'auto-assemblage de poly-protéines NC-CA en solution *in vitro* (Ganser et al. 1999). L'équipe de H.G. Kraüslich a, quant à elle, purifié des cores du VIH-1 à partir de particules produites par transfection de cellules (Welker et al. 2000). Ils ont estimé que seulement 10% des cores étaient cylindriques. La configuration cylindre correspond à une répartition égale (6 et 6) des pentamères de part et d'autre de la partie centrale du core. La configuration conique correspond par contre à une répartition 5 et 7 (figure 1.21.d).

La formation de ces structures particulières se fait lors de l'étape 5 de maturation. Une partie des protéines CA obtenues lors du clivage des 2500 polyprotéines Gag (Briggs & Kräusslich 2011) s'assemblent dans le volume accessible de la membrane lipoprotéique. Dans une telle configuration, la contrainte géométrique apportée par l'enveloppe pourrait imposer au core des caractéristiques morphologiques et

mécaniques particulières. Cette hypothèse est testée par une approche statistique de la morphologie des cores dans le Chap. 3.I.

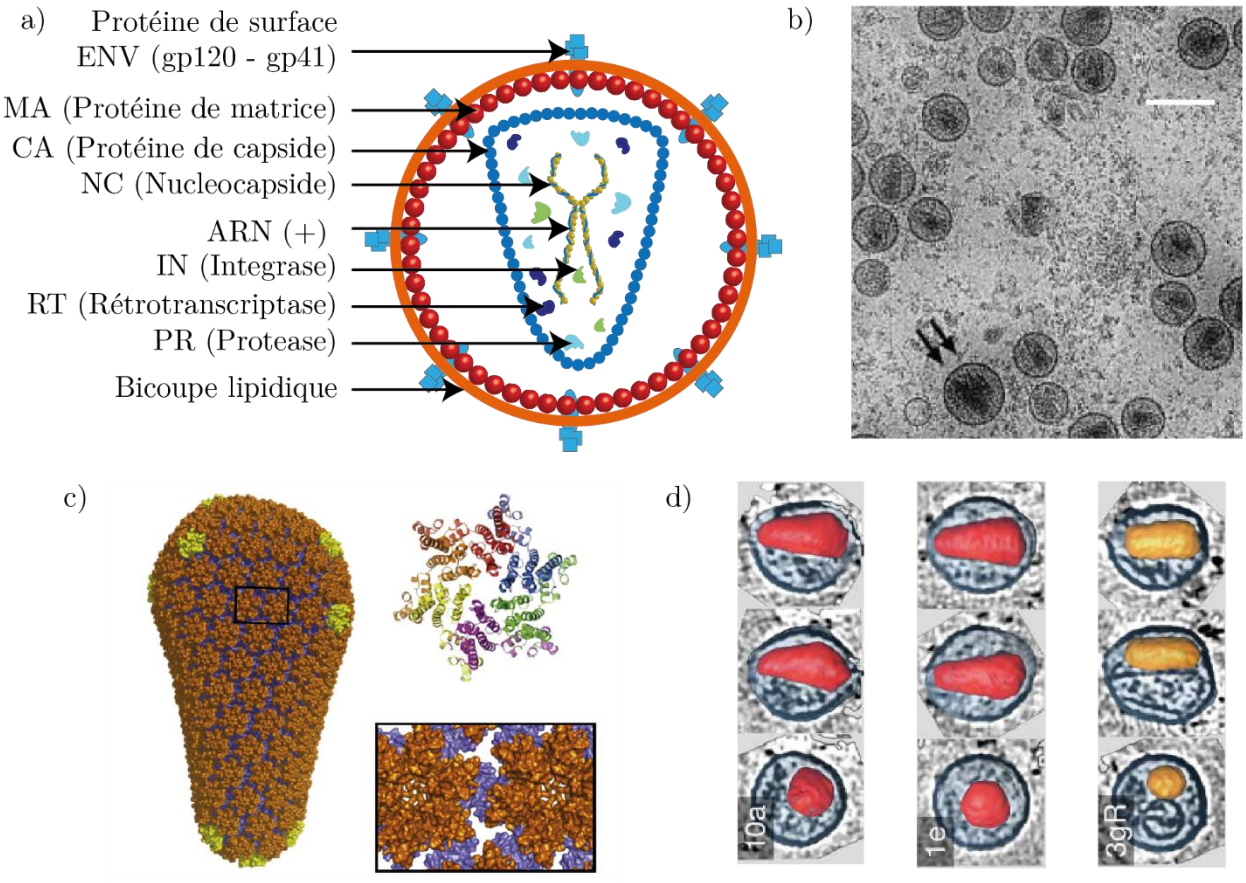


figure 1.21 - Le virus VIH-1

a) Schéma simplifié de la structure du VIH-1 sous sa forme mature. La bicouche lipoprotéique où se trouvent les protéines Env, entoure le core viral constitué des protéines CA qui protège le génome, deux simple brins d'ARN complexés avec les protéines NC. Certaines enzymes virales, comme la réverse transcriptase (ou rétrotranscriptase), l'intégrase ou la protéase sont présents à l'intérieur du core.

b) Image de cryoEM de pseudoparticules du virus VIH-1 produites artificiellement (Briggs et al. 2003), par transfection sur cellules saines (voir Chap. 2.II.a). Certaines particules présentent deux cores à l'intérieur de la membrane lipidique (flèches noires).

c) Reconstruction de la densité électronique de l'agencement des hexamères de CA (en orange) par rapport aux pentamères (en jaune). A droite, représentation cristallographiques des six protéines CA formant l'hexamère. (Briggs & Kräusslich 2011)

d) Recontruction par cryotomographie de trois cores du VIH-1 selon trois directions. En rouge, des cores de type conique, en jaune, un core de type cylindre (Benjamin et al. 2005).

La capside renferme, en plus des deux copie du génome de type ARN simple brin d'environ 9000 bases complexés avec des protéines NC, des enzymes virales comme la rétrotranscriptase (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (PT), jouant un rôle important dans les différentes étapes du cycle viral (Frankel & Young 1998). Au total, on dénombre quinze protéines : les glycoprotéines d'enveloppe (Env formée de SU à la surface et de TM de part et d'autre de la membrane), les protéines de structure (MA, CA, NC et p6), les enzymes virales (RT, IN, PT) (Katz & Skalka 1994), les protéines régulatrices (Tat et Rev) et les protéines accessoires (Nef, Vif, Vpr, et Vpu). Les protéines régulatrices ont pour rôle de détourner la machinerie cellulaire : Rev contrôle quel

ARNm est transcrit et Tat a pour rôle d'amplifier la production d'ARNm viraux et du génome viral. Les protéines accessoires optimisent chacune des étapes du cycle viral, en perturbant par exemple les signaux des fonctions immunologiques de la cellule hôte. Elles ne devraient donc ne pas avoir d'effet sur les propriétés morphologiques des virions. Utilisant le microscope à force atomique pour comparer la morphologie des pseudoparticules virales[2] avec ou sans protéine régulatrice, nous avons mené une étude statistique pour valider cette hypothèse. Les résultats sont exposés dans le Chap. 3.II.1.

Lors de l'étape 5 de maturation (Carlson et al. 2008; Sundquist & Krausslich 2012), la particule passe d'une forme immature où la coque protéique de Gag et la membrane lipidique semblent avoir une symétrie sphérique (figure 1.22.a). Cependant, les travaux de l'équipe de J.A. Briggs ont mis en évidence l'existence de trous dans la couche constituée d'environ 2500 polyprotéines Gag des particules immatures comme le présente la reconstruction par tomographie de la figure 1.22.d (Schur et al. 2014). Selon les travaux d'I. Rousso, les propriétés mécaniques des virions immatures présentent une constante de raideur dix fois plus importante

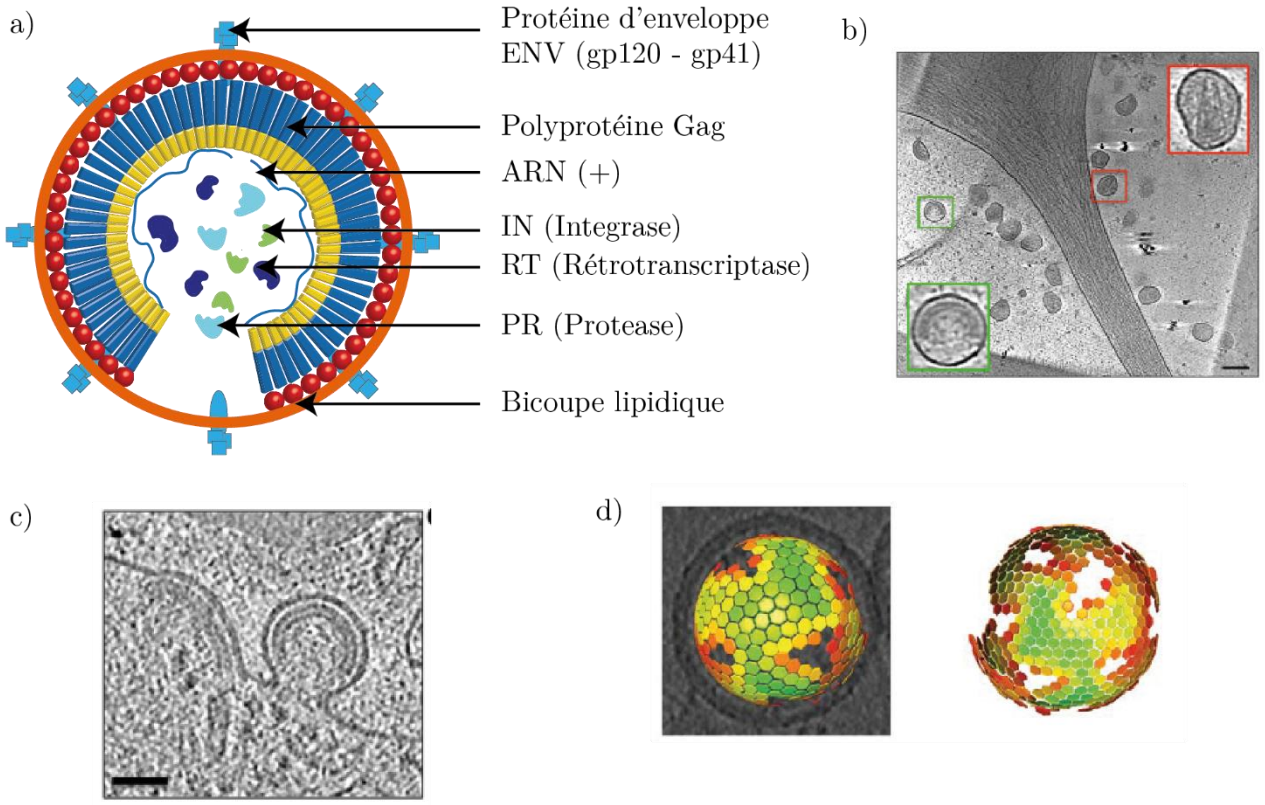


figure 1.22 - Forme immature du virion du VIH-1
a) Schéma simplifiée d'une particule immature. La couche Gag n'est pas présente sur toute l'enveloppe.
b) Image par cryoEM de pseudoparticules matures (en orange) et de pseudoparticules immatures (en vert). Cette dernière forme semble présenter un trou dans la couche interne, c'est-à-dire la couche de Gag (Woodward et al. 2015).
c) Image par cryoEM du bourgeonnement d'une particule. Le trou observé sur les particules immatures pourrait être lié au mécanisme de bourgeonnement (Woodward et al. 2015).
d) Reconstruction par tomographie de particules VIH-1, vue de « face » à gauche et vue de dessous. (de Marco et al. 2010)

[2] Les pseudoparticules virales sont obtenues non pas par des cellules infectées mais après transfection de plasmides codant pour les protéines virales et permettant la réplication du génome pour produire des particules virales contenant en partie le génome viral ((Bernaud et al. 2015)).

que les virions matures. Cette diminution de rigidité au cours de l'étape 5 pourrait s'expliquer par le réarrangement des protéines intervenant après l'action de la protéase sur les polyprotéines Gag. En utilisant les stratégies d'analyse de la morphologie des virus, nous avons voulu confronter ces observations avec nos résultats d'analyse statistique sur la morphologie mesurée par AFM (Chap. 3.II.c).

Lors de l'étape 4 du bourgeonnement, la forte affinité entre une extrémité de Gag et l'ARN viral portant le signal ψ facilite la production de particules immatures avec un génome à l'intérieur. En l'absence de ce signal ψ, l'assemblage se fait autour de brins d'ARN cellulaires, de taille inférieure à celle de l'ARN viral. Les quantités de nucléotides incorporées dans les deux cas sont sensiblement les mêmes mais l'ARN viral semble avoir un rôle structurant sur les particules de rétrovirus (Muriaux et al. 2001). Grace aux outils qu'offre l'AFM, nous avons voulu vérifier cette hypothèse par des méthodes physiques (voir Chap. 3.III).

Les particules matures sont alors capables d'infecter de nouvelles cellules saines et d'intégrer leurs génomes à l'intérieur, au cours de la phase précoce.

3. La phase précoce du cycle viral

Plusieurs scénarios d'entrée dans la cellule sont proposés (Wilen et al. 2012). Dans ce qui suit, je ne présenterai que succinctement le cycle le plus répandu dans la littérature.

a. Phase précoce (figure 1.20.a)

6. La reconnaissance du virion du VIH-1 par la future cellule contaminée se fait par l'intermédiaire de la protéine cellulaire CD4 qui reconnait la protéine d'enveloppe Env (et plus précisément la partie SU) (Wilen et al. 2012).
7. Le mécanisme de fusion des membranes est enclenché avec l'intervention du corécepteur cellulaire CCR5. Le core rentre alors dans le cytoplasme cellulaire (Melikyan 2014).
8. Le core, en détournant les protéines cellulaires de transport (moteurs moléculaires, cytosquelette…) migre dans le cytoplasme. En marquant l'intégrase virale par fluorescence, l'équipe de C. Zimmer a pu suivre, grâce à un microscope PALM, le déplacement du core dans le cytosol, traversant les différents compartiments de la cellule (Lelek et al. 2012 et figure 1.14).
9. En présence de nucléotides (dNTPs) naturellement présent au sein du core et dans le cytosol, la rétrotranscriptase virale catalyse la création de l'ADN virale double brin à partir de l'ARN viral simple brin en passant par un intermédiaire ARN-ADN (Katz & Skalka 1994; Hu & Hughes 2012). En parallèle, la structure du core se désassemble, libérant le génome viral ainsi que les protéines virales dans le cytosol.
10. L'ADN viral rentre dans le noyau en passant par les pores nucléaires aidé par des protéines virales et cellulaires.
11. La protéine IN catalyse son intégration dans le génome cellulaire (Craigie & Bushman 2012).

La cellule est alors infectée et peut produire de nouvelles particules virales en suivant la phase tardive du cycle.

De nombreux facteurs cellulaires entrent en jeu pour limiter certains processus du cycle viral. Les facteurs de restrictions cellulaires, comme les IFITMs vont modifier les propriétés physiques des membranes cellulaires pour diminuer l'entrée du virus dans le cytosol (étapes 7 et 8) ou encore inhiber la production de protéines virales (étape 2) menant à une diminution de l'infectiosité (Tartour et al. 2015).

b. Désassemblage et rétrotranscription

Les liens entre le désassemblage des protéines CA constituant le core et la rétrotranscription sont encore largement discutés par la communauté scientifique (Arhel 2010; Ambrose & Aiken 2014). L'ordre chronologique de ces deux étapes n'est encore pas connu.

De travaux récents ont montré, par des expériences biologiques, que le passage de l'ARN simple brin à l'ADN double brin pouvait jouer un rôle important dans la déstabilisation du core (Hulme et al. 2011). D'un point de vue physique, l'augmentation importante de la pression interne à l'intérieur du core semble pouvoir justifier cette hypothèse. Le Tableau 2 résume les grandeurs géométriques présentées au Chap. 1.II.3, à savoir la fraction volumique du génome dans le core du VIH-1 (en le modélisant grossièrement par un cône de rayon à la base de 50 nm et d'une longueur de 100 nm) et son rayon de giration. Le volume de giration occupé par un brin d'ARN en solution est d'environ 2,9 fois celui de la capside à comparer avec celui d'un double brin d'ADN qui est de 260 fois. L'augmentation de la pression interne lors de la rétrotranscription pourrait fortement aider au désassemblage du core, libérant ainsi le génome sous forme d'ADN double brin dans le cytosol. Un modèle physique a été proposé par l'équipe de R. Bruinsma pour justifier une décapsidation contrôlée uniquement par la rétrotranscription (Rouzina & Bruinsma 2014).

Génome	Bases[3]	Rayon du brin	Pas entre deux bases	Persistance l_p	Fraction volumique f	Rayon de giration R_g	Volume de giration
ARN Simple brin	9000	0,5 nm	0,34 nm	~ 2 nm	0,075	32 nm	2,9 fois v_{cap}
ADN Double brin	9000	1 nm	0,34 nm	50 nm	0,3	160 nm	260 fois v_{cap}

Tableau 2 - Fraction volumique et rayon de giration en fonction du génome à l'intérieur du core VIH-1.

Nous avons initié, grâce aux capacités d'imagerie mais également aux mesures nanomécaniques de l'AFM, une étude de particules dont la RT était mutée ou non, pour contrôler la cinétique de la rétrotranscription. Le but de cette expérience était de voir dans quelle mesure la décapsidation du core du VIH-1 pouvait être induit par la rétrotranscription au sein du core, c'est-à-dire le passage d'un simple brin d'ARN à un hybride ARN/ADN (Chap. 3.II.b et Chap. 3.IV).

[3] Ou paires de bases.

IV. Le cas des vecteurs viraux

Pour se répliquer, les virus utilisent la machinerie de réplication, de transcription et de traduction de la cellule cible. Ce détournement permet de produire toutes les protéines nécessaires à la réplication de nouveaux virus à partir du génome viral. Détournant ce scenario, la recherche médicale propose un traitement original de certaines maladies génétiques, qui présentent une déficience dans un ou plusieurs facteurs cellulaires et qui consiste dans la possibilité de transférer le gène codant pour le facteur manquant dans le tissu affecté. Ces thérapies géniques consistent pour la plupart à utiliser des virus génétiquement modifiés pour introduire un gène particulier dans une cellule cible dans le but d'exprimer des protéines d'intérêts (Robbins & Ghivizzani 1998). Les virus ainsi modifiés portent le nom de vecteur viral.

Plusieurs contraintes s'imposent sur le choix du vecteur :

- La sécurité : la pathogénicité du virus doit être nulle ce qui implique une bonne maitrise de l'intégration du génome du vecteur dans la cellule pour éviter toute mutagénèse insertionnelle. La réponse immunitaire doit également être faible. La recombinaison, processus de fusion entre deux virus, doit être nulle.
- Le ciblage et l'expression : les vecteurs doivent cibler un type précis de cellules et pouvoir amener jusqu'à celles-ci un brin de taille conséquente (généralement supérieur à 3000 paires de bases) dont la stabilité d'expression soit suffisante pour une production efficace des protéines d'intérêt.
- La production : les vecteurs doivent pouvoir être efficacement produits en grande quantité et dans des conditions de sécurité adaptés à leurs utilisations chez l'homme.

Parmi les virus utilisés, le virus adéno-associé, AAV pour *Adeno Associated Virus*, représente actuellement un outil de choix pour la thérapie génique de certaines maladies affectant le foie, la rétine ou encore les muscles (Mingozzi & High 2011).

1. L'exemple : le virus AAV

Le virus AAV a été découvert en 1965 dans une préparation d'adénovirus simiens par l'équipe de R. Atchison, B. Casto et W. Hammon (Atchison et al. 1965), ce qui lui a donné son nom (figure 1.23). En 1967, il est isolé dans des biopsies humaines (Blacklow et al. 1967). De nos jours, plus de 150 variants du virus ont été découverts. AAV appartient à la famille des *Parvoviridae* dans la classification de l'ICTV et forme la totalité du genre des *dependoparvovirus*. Treize sérotypes[4], notés d'AAV1 à AAV13, sont actuellement disponibles. Le sérotype AAV2 reste le plus étudié d'un point de vue biologique.

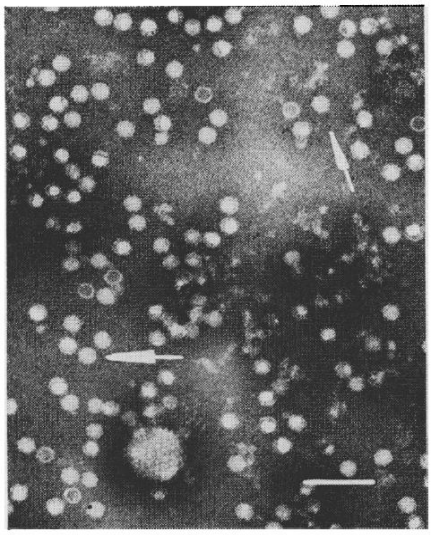


figure 1.23 - Image de microscopie électronique d'un échantillon issu d'une préparation d'adenovirus (Atchison et al. 1965).
Les flèches blanches (et tous les autres points similaires) sont des virus AAV. En bas à gauche, un adénovirus environ cinq fois plus gros.
La barre d'échelle représente 100 nm.

[4] Les virus appartenant au même sérotype présentent la même réponse devant un cocktail d'anticorps, ou serum.

Comme l'indique leur genre, il s'agit d'un virus dépendant, c'est-à-dire qu'il a besoin d'une co-infection avec un autre virus pour pouvoir se répliquer. Les virus *helper* ou auxiliaires connus sont les adénovirus AdV, les herpèsvirus HSV-1 et HSV-2 et le papillomavirus HPV-16. En l'absence de virus auxiliaire, l'AAV peut infecter la cellule cible et s'établir en latence dans le noyau.

Peu d'études épidémiologiques ont été menées sur l'infection par AAV, car n'a été associé à aucune pathologie bien qu'environ 80% de la population ait déjà été contaminée par l'AAV (Calcedo et al. 2009).

2. Structure et cycle viral

a. Un virus icosaédrique

Le génome du virus AAV sauvage est un ADN simple brin de 4700 bases (figure 1.24.a et 24.b) encadré par deux répétitions terminales inversées (ITR pour *Inverted Terminal Repeat*). Ces deux séquences de 145 bases sont des palindromes et forment une structure secondaire. Ils servent d'origines de réplication et sont nécessaires pour l'encapsidation du génome dans la capside. Grace à la présence de différents cadres de lectures (*rep*, *cap1* et *cap2*) et de trois promotteurs, le génome viral code pour trois protéines de structure (VP1, VP2 et VP3), quatre protéines régulatrices (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40) et une protéine accessoire AAP.

AAV est un virus non-enveloppé de forme icosaédrique (figure 1.24.c). Les trois protéines de structure VP1, VP2 et VP3 s'assemblent, sous le contrôle de la protéine AAP (Naumer et al. 2012), pour former une capside icosaédrique (T = 1) d'environ 23 nm de diamètre selon un ratio 1 : 1 : 10 (Venkatakrishnan et al. 2013; Xie et al. 2002; Nam et al. 2007; DiMattia et al. 2012).

Les 3 protéines VP sont issues du même cadre de lecture et diffèrent par leur partie N-terminale. En particulier, les protéines VP1 et VP2, possèdent un domaine N-terminal qui est absent dans VP3, la protéine la plus abondante dans la capside. De même une partie N-terminale de VP1 est absente de VP2 (figure 1.24.b). La capside du sérotype AAV2 a été observée par cryoEM, sans génome (Kronenberg et al. 2001) et avec génome (Kronenberg et al. 2005). La première étude a montré la présence de globules sur la face interne de la capside correspondant aux extensions N-terminales des protéines VP1 et VP2 : vu de l'extérieur de la capside, les trois protéines apparaissent identiques. VP1 et VP2 se placeraient sur certaines arrêtes de l'icosaèdre. La deuxième étude a mis en évidence une externalisation de la région N-terminale des protéines VP1 et peut être de VP2 lors d'un chauffage des capsides pleines à des températures de l'ordre de 65°C. Ce ne serait par contre pas le cas pour les capsides AAV2 vides.

En plus de former la structure de la capside, les protéines VPs assurent également différentes fonctions dans différentes étapes du cycle viral comme la reconnaissance par le récepteur cellulaire, l'entrée dans le cytoplasme et le transport jusqu'au noyau.

Les propriétés mécaniques de ces capsides n'ont pas encore été étudiées par des expériences de nano-indentation. Par contre, le virus MVM (*Minute Virus of Mice*) qui appartient également à la famille des parvovirus, présente une géométrie icosaédrique de 26 nm équivalente à AAV et sa constante de raideur a été estimée autour de 0,6 N/m par l'équipe de C. Mateu (voir Chap. 1.II.3 et (Carrasco et al. 2006)).

b. Assemblage des virions

Dans une cellule infectée, le génome AAV se maintient dans le noyau sous une forme épisomale (ADN double brin circulaire) ou intégrée (figure 1.25). Ce n'est qu'après une co-infection par un virus *helper* que le génome AAV peut être transcrit et donner naissance à des nouvelles particules virales. Les protéines Rep, produites en priorité, jouent différents rôles dans le cycle viral, notamment dans la transcription et la réplication de l'ADN viral (Snyder et al. 2011). Elles jouent également un rôle dans l'étape d'encapsidation du génome dans les capsides vides néoformées. Les protéines VP s'assemblent en capside vide, les protéines Rep se positionneraient au niveau des axes de symétrie d'ordre 5, d'après les différentes études cristallographique. Elles possèdent une activité hélicase qui en présence d'ATP initie une ouverture du double brin d'ADN viral et insère alors un simple brin dans la capside (King et al. 2001; Timpe et al. 2005).

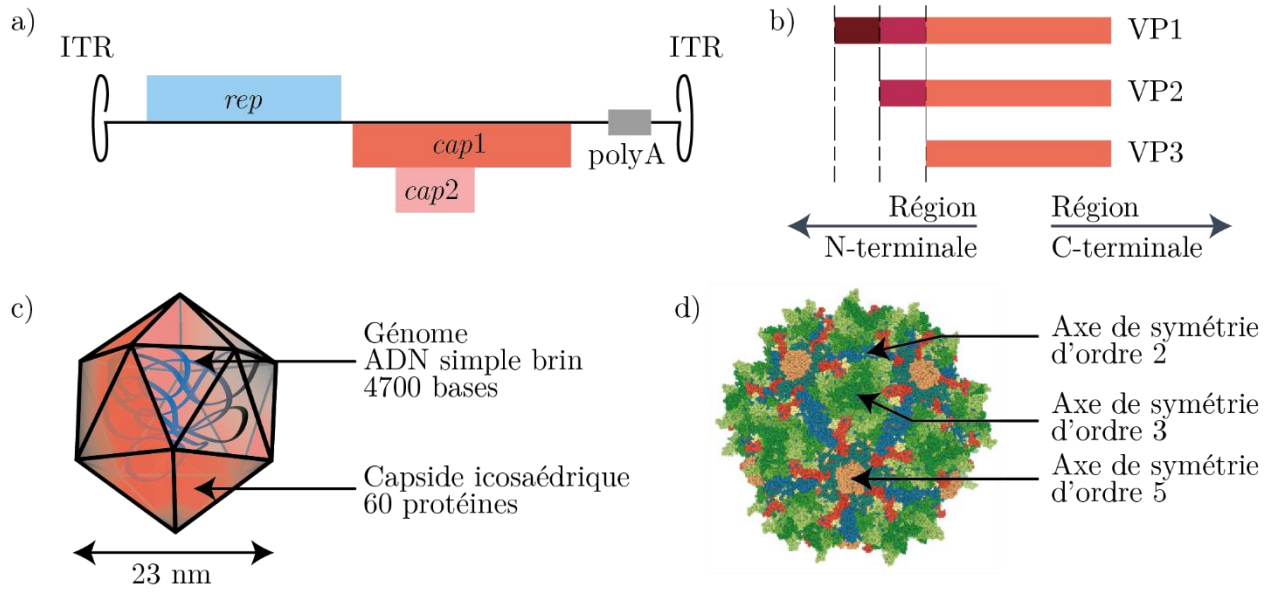


figure 1.24 - Génome du virus AAV et structure de la capside AAV.
a) Le génome de l'AAV sauvage est constitué d'une molécule d'ADN simple brin de 4700 bases. Le cadre *rep* code pour quatre isoformes de la protéine régulatrice Rep. Le cadre *cap*1 code pour trois isoformes de la protéine de structure VP. Le cadre *cap*2 code pour la protéine accessoire AAP. Les trois gènes viraux sont transcrits à partir de trois promoteurs différents et un signal de poly-adénylation (polyA) unique.
b) Représentation schématique du transcrit cap1 produisant les trois isoformes de protéines VP. Chaque couleur représente une région identique entre chaque isoformes.
c) Schéma très simplifié de la capside AAV. Cinq protéines VP1, cinq VP2 et cinquante VP3, codées par *cap1* forment une capside icosaédrique.
d) Reconstruction cristallographique d'une capside AAV (sérotype AAV8 - (Nam et al. 2007)). Les protéines Rep se positionneraient au niveau des axes d'ordre 5. Les protéines VP1 et VP2 se positionneraient au niveau des axes d'ordre 2 (Kronenberg et al. 2001).
L'orientation du schéma et de la reconstruction sont les mêmes. On peut ainsi remarquer les différents axes de symétrie.

c. Phase précoce du cycle viral

Les étapes principales de la phase précoce du cycle infectieux sont représentées dans la figure 1.25 illustrant de manière simpliste les différentes étapes de la phase.

L'étape 1 est la fixation du virion à la surface de la cellule infectée. La nature du récepteur dépend du sérotype d'AAV (Millet et al. 2013). Une fois fixé sur son récepteur, une chaine de signaux mettant en jeu des corécepteurs initie une étape d'endocytose (Ding et al. 2005; Nonnenmacher & Weber 2012). Le virus est alors transporté à l'intérieur de l'endosome jusqu'au noyau, utilisant différents moteurs moléculaires et microtubules du cytosquelette (étape 2). Les particules sont ensuite libérées à proximité de la membrane nucléaire avant de pénétrer, grâce à sa petite taille, dans le noyau sans se désassembler (étape 3). A l'intérieur du noyau, la capside se désassemble pour libérer le génome simple brin (étape 4). Celui-ci est alors converti en un ADN double brin, grâce à des ADN-polymérases cellulaires. En l'absence de virus auxiliaire, le génome s'établit en latence soit par la formation d'un épisome viral ou par son intégration dans le génome cellulaire.

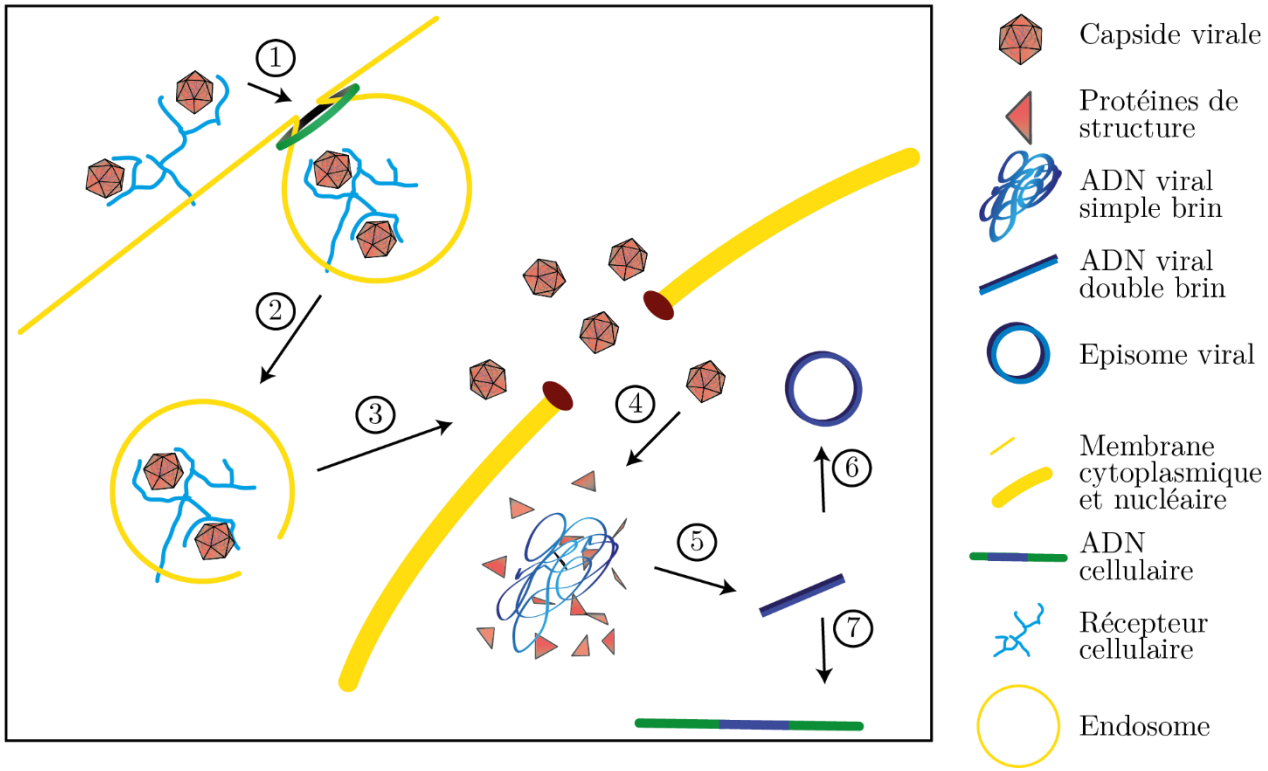


figure 1.25 - Phase précoce du cycle viral du virus AAV
1. Le récepteur cellulaire reconnait la particule virale. Un mécanisme d'endocytose mène à la formation d'un endosome. 2. Les particules sont transportées le long de la voie endosomale où ils subissent une étape de maturation. 3. Les virus sortent de l'endosome tardif au niveau de la membrane nucléaire où il y aura accumulation. 4. Les virions entrent dans le noyau. Une étape de décapsidation libère le génome viral. 5. Le simple brin est répliqué pour donner un génome double brin. Une persistance est alors observée sous la forme 6. d'un épisome viral ou 7. d'une intégration dans l'ADN cellulaire.

Au cours de l'entrée dans la cellule et leur cheminement vers le noyau, les capsides d'AAV sont soumises à différentes contraintes biologiques (reconnaissance avec leurs récepteurs, endocytose …), chimiques (force ionique, …) ou physique (pression externe et interne…). Nous avons étudié grâce à l'AFM les paramètres morphologiques et mécaniques du sérotype AAV8 (Chap. 4.I) pouvant intervenir tout au long du cycle viral. Nous avons également mis en place un protocole de déstabilisation pour mesurer la stabilité thermique de ces particules virales afin de mieux comprendre l'étape 4 de désassemblage.

1. AAV : un vecteur pour la thérapie génique

Son absence de pathogénicité et d'activité de réplication (en l'absence de virus *helper*) font du virus AAV un outil de choix pour la thérapie génique (Gonçalves 2005; Mingozzi & High 2011; Grieger & Samulski 2012). Produire les vecteurs viraux AAV consiste alors à produire des capsides virales, dans lesquelles on substitue le génome viral par un génome recombinant. Les vecteurs ainsi créés selon un protocole de transfection (voir Chap. 2) entrent dans les cellules cibles en suivant la phase précoce du cycle viral. L'étape de désassemblage mènera à la libération dans le noyau non pas d'un génome viral mais d'un génome recombinant dont la composition, contrôlée, code la production de protéines d'intérêt.

Pour être efficace au transfert de gènes, le vecteur AAV doit être suffisamment stable pour aller jusqu'au noyau pour éviter que le génome recombinant soit perdu. Mais il doit être également suffisamment instable pour pouvoir se décapsider une fois dans le noyau afin de libérer son ADN. Connaitre les propriétés physiques, à la fois morphologiques et mécaniques, au cours de la phase précoce pourrait permettre de mieux comprendre le cycle viral afin d'optimiser l'infectiosité des vecteurs AAV et donc l'efficacité de transfert de gènes.

a. Le ciblage : 13 sérotypes

Treize sérotypes d'AAV isolés à partir de cellules en culture ou tissus de primates sont actuellement disponibles (Asokan et al. 2012). La composition de la séquence en acides aminés reste très proche pour la plupart d'entre eux : Entre AAV2 et AAV8 par exemple, 82% des séquences sont identiques, et tandis qu'entre AAV2 et AAV9, 81% et entre AAV9 et AAV8 cela s'élève à 84% (Zinn & Vandenberghe 2014). Les zones présentant le maximum de variabilité de composition se trouvent à la périphérie de la capside et sont pour la plupart impliquées dans la reconnaissance et la fixation aux récepteurs cellulaires.

Cette variabilité de comportement se retrouve également dans la spécificité des cellules cibles des particules, ce qui est déterminant pour la thérapie génique. L'ensemble des sérotype d'AAV sont capables

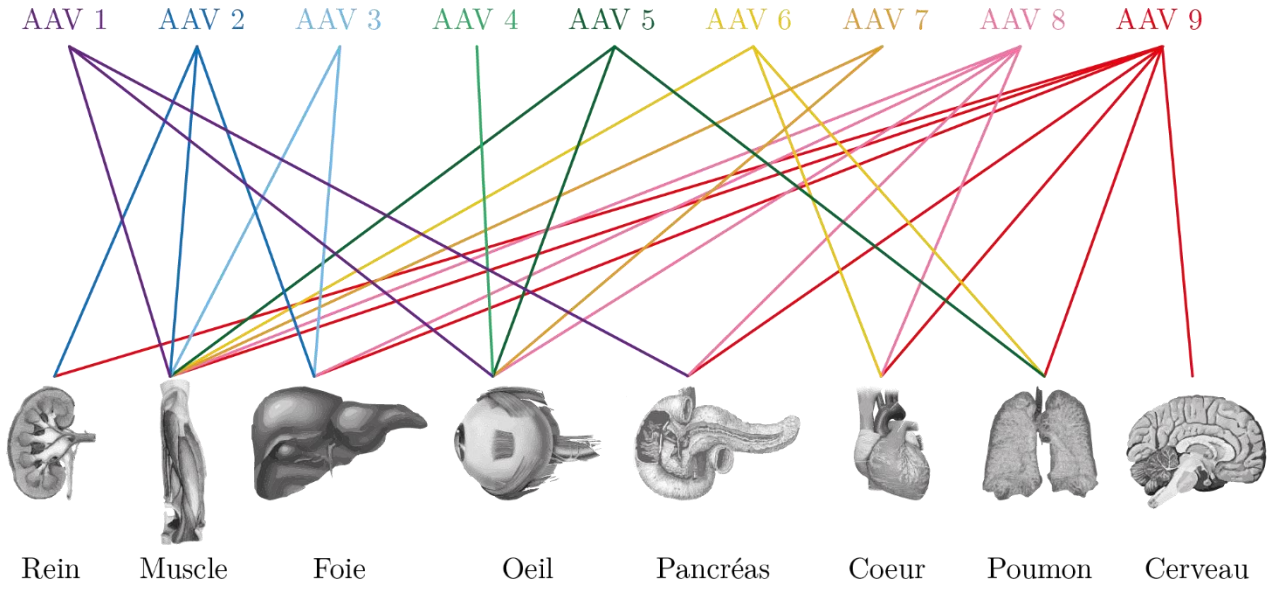


figure 1.26 - Spécificité des cellules cibles en fonction du sérotype. (Millet et al. 2013)

d'infecter à peu près tous les types cellulaires. Cependant des spécificités de ciblage existent : ainsi l'AAV8 et l'AAV9 sont très efficaces dans le foie. En revanche seul l'AAV9 peut infecter efficacement le muscle cardiaque. De plus, bien que les deux sérotypes aient été décrits comme capables d'infecter tous les tissus après injection systémique dans la circulation sanguine, l'AAV9 semble être le plus stable *in vivo* et le plus apte à traverser la barrière hémato-méningée. Ainsi les différences entre deux sérotypes se traduisent par une efficacité de transfert différente et donc des propriétés biologiques différentes. On s'attendrait à des différences de propriétés physiques. En s'appuyant sur des expériences de calorimétrie différentielle à balayage, l'équipe de B. Bothner a montré une différence de température de désassemblage des capsides vides selon le sérotype d'AAV considéré (Rayaprolu et al. 2013).

Si les structures des capsides AAV8 et AAV9 ont été résolues par cristallographie (figure 1.27) (Nam et al. 2007; DiMattia et al. 2012), la comparaison des comportements des deux sérotypes face à différentes contraintes physiques n'a pas été réalisée. Dans ce travail, nous avons privilégié une approche par AFM pour mettre en parallèle les propriétés morphologiques et les propriétés mécaniques des deux sérotypes avec leurs différences biologiques (Chap. 4.II). Les stabilités thermiques d'AAV8 et d'AAV9 ont également été comparées.

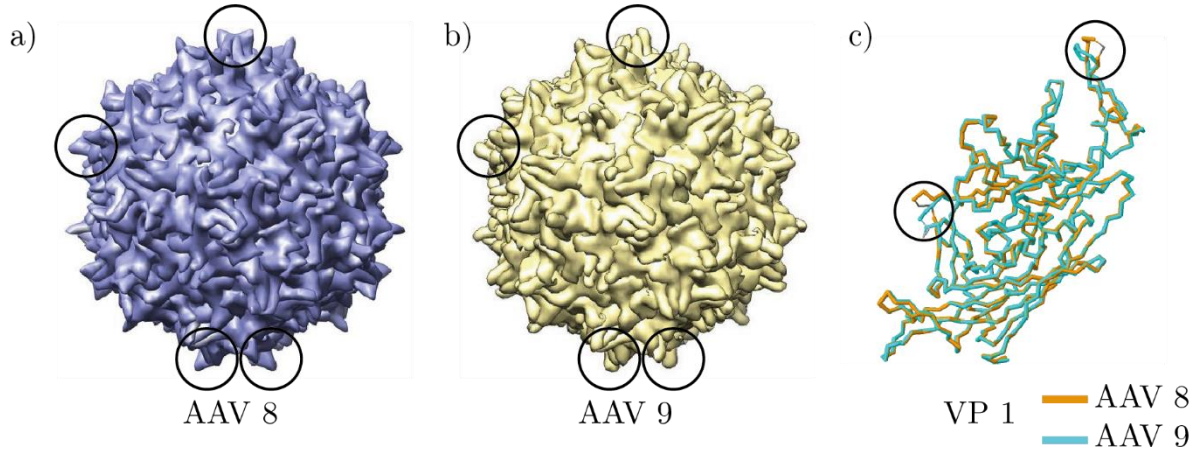


figure 1.27 - Comparaison cristallographique des capsides AAV8 et AAV9
Reconstruction cristallographique de a) AAV8 (Nam et al. 2007) et de b) AAV9 (DiMattia et al. 2012). Certaines protubérances diffèrent entre les deux sérotypes (comme indiqué par les cercles noirs).
c) Comparaison de la structure 3D de la protéine VP1 du sérotype AAV8 (en orange) et de AAV9 (en cyan) (méthode *JFatCat* sur *RCSB Protein Data Bank*). Les structures à 3D se superposent sauf à de rares endroits entourés d'un cercle noir.

b. L'efficacité de transfert de gène : effet de l'acidité du milieu

Comme nous l'avons décrit précédemment (figure 1.25), le transport des particules d'AAV de la membrane cytoplasmique jusqu'au noyau se fait à l'intérieur d'un endosome. Au cours de son passage dans le cytoplasme, l'endosome, initialement désigné comme précoce, subit des modifications importantes résultantes d'une baisse importante du pH intraluminal et d'une augmentation de l'activité des protéases. Le microenvironnement dans lequel se trouvent les virus passe d'un pH neutre (pH = 7), à acide (pH $\simeq$ 5) (Geisow & Evans 1984). Cette acidification du milieu occasionnerait une modification de la structure de la

protéine VP1. En particulier une modification de la structure de l'extrémité N-terminale, initialement à l'intérieur de la capside selon une étude cristallographique (Venkatakrishnan et al. 2013), faciliterait sa sortie hors de la capside, à l'instar de l'augmentation de la température (Kronenberg et al. 2005). La partie externalisée aurait une activité auto-protéolytique (Salganik et al. 2012) ainsi qu'une activité phospholipase (Girod et al. 2002). Cette dernière activité permettrait la sortie des particules de l'endosome et une accumulation au niveau de la membrane nucléaire (Nonnenmacher & Weber 2012). Ces différentes modifications de la structure sont décrites comme une maturation de la capside. Des études récentes par fluorescence ont permis de caractériser la stabilité thermique des capsides AAV2 par fluorescence en fonction du pH (Horowitz et al. 2013) montrant une stabilité thermique plus importante des capsides dans un milieu ayant un pH acide par rapport à un milieu neutre (figure 1.28).

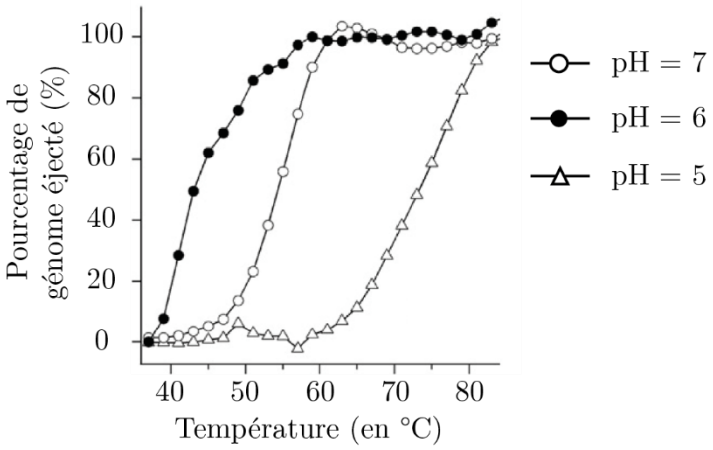


figure 1.28 - Stabilité thermique de capsides AAV2 ayant un génome simple brin pour différents pH du milieu (Horowitz et al. 2013).
Evolution de la fluorescence émise par une solution à pH = 7 (cercle noir), à pH = 6 (disque noir) et à pH = 5 (triangle) de vecteur AAV2 contenant un génome simple brin de 4700 bases en fonction de la température de chauffage. Les capsides sont incubées dans une solution de pH contrôlé en présence d'un intercalent d'ADN simple (et double brin) fluorescent. La température augmente progressivement de 2°C en 2°C, avec des paliers de 5 min. L'apparition d'un signal fluorescent traduit l'éjection du génome recombinant à l'extérieur de la capside. L'intensité lumineuse émise, proportionnelle à la quantité de génome à l'extérieure, est mesurée pour chacune des températures jusqu'à 80°C. Le pourcentage de génome éjecté est donc égal à l'intensité normalisée. La température d'éjection T_m est définie comme la température pour laquelle 50% du génome est à l'extérieur de la capside. Plus le pH est faible, plus T_m est grande.

Comprendre l'évolution des propriétés physiques, à la fois morphologiques et mécaniques au cours de la maturation de la capside, permettrait de mieux comprendre le rôle de l'environnement proche de la capside et les conséquences de cette maturation sur la stabilité des particules dans le but d'optimiser le transfert du gène jusqu'au noyau. Nous proposons donc une étude par AFM de l'effet du pH sur les particules d'AAV8 (Chap. 4.III).

c. La production de vecteur : effet de la longueur et de la nature du génome

Les protéines d'intérêt sont codées à partir d'un génome plus ou moins long selon la taille des protéines. Plus le génome est long, plus il occupe du volume dans la capside, et on peut s'attendre, comme

nous l'avons vu dans une partie précédente (Chap. 1.II.3), à ce que la pression interne augmente ce qui peut entraîner une déstabilisation de la capside. Connaitre les effets de la longueur du génome sur la stabilité de la capside est donc crucial pour optimiser la production de vecteurs viables et le transfert du génome dans la cellule cible.

Dans le cas d'un ADN simple brin, l'encapsidation du génome dans la capside se fait comme la production de virion sauvage. Il est inséré par Rep sous la forme simple brin dans des capsides vides préalablement formées. L'activité hélicase sépare le double-brin d'ADN et introduit dans la capside un simple brin. La présence des ITRs aide à l'encapsidation (Timpe et al. 2005). Il a été montré qu'il existe une longueur optimale du génome, proche de celle du virus sauvage, d'environ 5000 bases (Wu et al. 2010). Les génomes de longueurs supérieures à cette limite peuvent être endommagés lors de cette étape du cycle (Dong et al. 2010).

Le Tableau 3 résume les différentes grandeurs géométriques citées dans le Chap. 1.II.3, la fraction volumique f d'occupation du génome dans la capside dont le rayon interne est de 10,8 nm (v_{cap} = 5400 nm^3 - donnée cristallographique issue de (Xie et al. 2002)) et le rayon de giration R_g de l'ADN, en fonction de la nature et de la longueur du génome. L'ajout de 1000 bases au génome simple brin ne permet pas d'atteindre un volume de giration de l'ordre de celui des bactériophages.

Les travaux de l'équipe de A. Asokan étudient également la stabilité thermique des capsides en fonction de la longueur du génome (Horowitz et al. 2013). S'appuyant sur des images par MET, cette étude ségrégue deux types de populations après une incubation de 30 minutes des capsides à différentes températures : les capsides vides et les capsides pleines (figure 1.29.a). Un décompte des capsides pleines montrent une plus grande fragilité des capsides ssAAV2 ayant un long génome (figure 1.29.b) ce qui suggère une fois de plus un rôle de la pression interne dans la déstabilisation des capsides virales.

Génome	Bases[5]	Rayon du brin	Pas entre deux bases	Persistance l_p	Fraction volumique f	Rayon de giration R_g	Volume de giration
ADN Simple brin	4700	0,5 nm	0,34 nm	~ 2 nm	0,23	23 nm	11 fois v_{cap}
ADN Simple brin	3700	0,5 nm	0,34 nm	~ 2 nm	0,18	20 nm	8 fois v_{cap}
ADN Double brin	2300	1 nm	0,34 nm	50 nm	0,45	81 nm	405 fois v_{cap}

Tableau 3 - Fraction volumique et rayon de giration en fonction du génome à l'intérieur de la capside AAV.

Pour augmenter l'expression du transgène porté par le vecteur et s'affranchir de la conversion de l'ADN simple brin en double brin nécessaire à la transcription du vecteur (étape 5 sur la figure 1.25), il a été proposé de produire des vecteurs AAV contenant un génome dit *self complementary* (McCarty et al. 2001; Grieger & Samulski 2012) : le génome encapsidé dans ce cas est constitué de deux ADN simple brin

[5] Ou paires de bases.

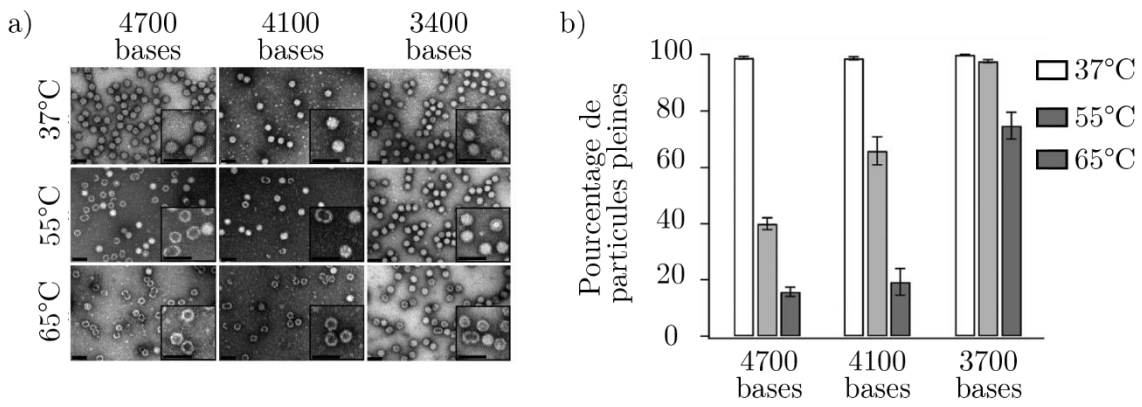


figure 1.29 - Stabilité thermique de capsides ssAAV2 pour différentes longueurs de génome (Horowitz et al. 2013).

a) Image par MET de capsides ssAAV2 chauffées pendant 30 minutes à différentes températures. Deux populations de particules sont présentes sur les images : les capsides pleines (apparaissant comme des disques gris) et les capsides vides (apparaissant comme des cercles gris).

b) Evolution du pourcentage de particules pleines en fonction de la longueur du génome encapsidé au départ pour trois températures de chauffage.

complémentaires reliés entre eux par une ITR adoptant ainsi une structure de type double brin (figure 1.30). Les vecteurs sont alors appelés scAAV par rapport aux particules conventionnelles contenant un génome ADN simple brin dénommées ssAAV pour *single stranded*). La longueur effective du code génétique est donc divisée par deux, environ 2300 paires de bases si on se repère par rapport au génome sauvage. Aucune étude n'a proposé un mécanisme d'encapsidation de ce type de génome.

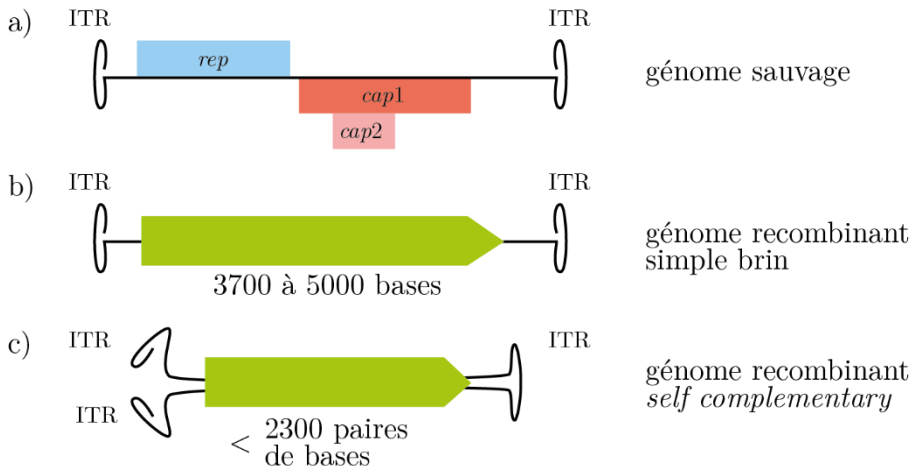


figure 1.30 - Représentations des génomes a) sauvage et recombinants b) simple brin et c) *self complementary*

Le volume occupé par l'ADN en solution est plus de 400 fois plus grand que celui accessible dans la capside et environ 40 fois plus grand que l'ADN simple brin de 4700 bases (Tableau 3). Cette situation est proche du cas des bactériophages et devrait donc générer une pression interne importante.

On s'attend ainsi à voir une grande différence de comportement des propriétés physiques, morphologique, mécanique et de stabilité thermique, entre des particules ssAAV et scAAV. L'étude récente de l'équipe de A. Asekan s'est attachée également à comparer la stabilité thermique de ces deux types de vecteur

pour le sérotype AAV2 (Horowitz et al. 2013). Par des expériences reposant sur la détection d'ADN éjecté par fluorescence, ils montrent de manière surprenante une plus grande stabilité des capsides scAAV par rapport à ssAAV quelle que soit la longueur du génome (figure 1.31.a). Parallèlement, en s'appuyant sur des images par MET, ils proposent que l'ADN simple brin éjecté est fortement compacté alors que l'ADN *self complementary* est linéaire (figure 1.31.b).

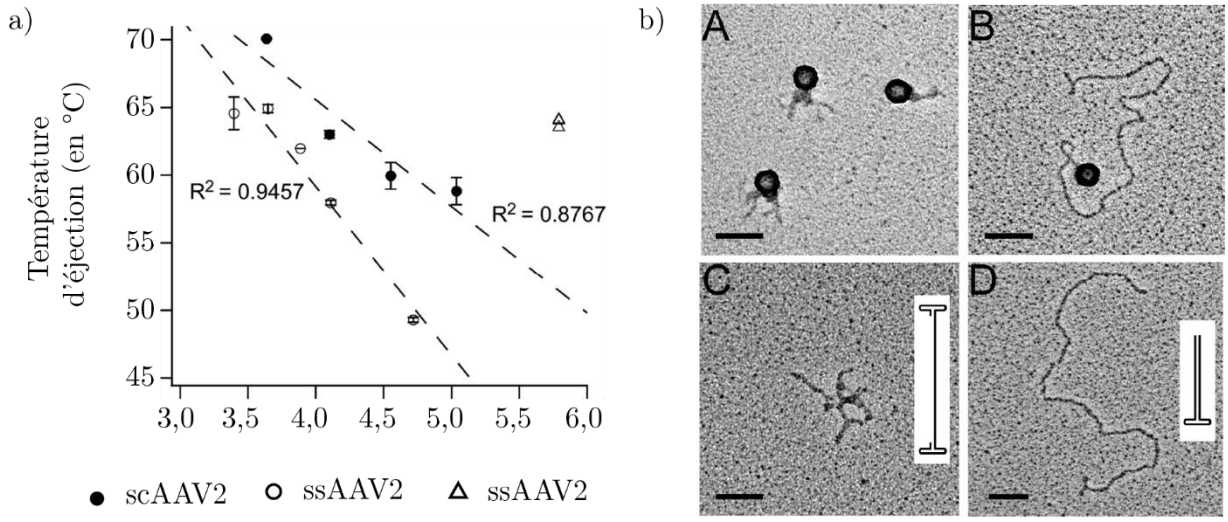


figure 1.31 - Comparaisons de la stabilité de vecteurs ssAAV2 et scAAV2 (Horowitz et al. 2013).
a) Température d'éjection du génome simple brin (cercle noir) et *self complementary* (disque noir) à l'extérieur de la capside AAV2 en fonction de la longueur effective (en configuration simple brin). On observe que pour chaque longueur, scAAV2 éjecte son génome à partir d'une température plus importante que ssAAV2 ce qui traduit une stabilité thermique plus grande.
b) Image par microscopie électronique de capsides ssAAV2 (A et C) et scAAV2 (B et D) chauffées à 65°C. L'ADN simple brin éjecté semble être compacté sur lui-même alors que l'ADN *self complementary* est linéaire.

Ces résultats sont donc surprenant et vont à l'encontre de l'hypothèse sur l'effet de la pression interne : en effet, la pression interne est plus importante dans le cas où le génome se trouve sous forme double brin ce qui diminue la stabilité thermique des capsides.

Nous proposons une étude comparée de la morphologie et de la stabilité des capsides AAV8 et AAV9 contenant des génomes de natures et/ou de longueurs différentes, grâce à l'imagerie par AFM (Chap. 4.IV). Cette étude complète les travaux de A. Asokan, publiés après le début de nos expériences, par l'utilisation du microscope à force atomique. Nous avons également proposé une adaptation des expériences de mesure de la pression interne pour les capsides scAAV2, dans le but de comparer cette pression interne à celle, importante, présente au sein des bactériophages (Chap. 4.V).

V. Conclusion

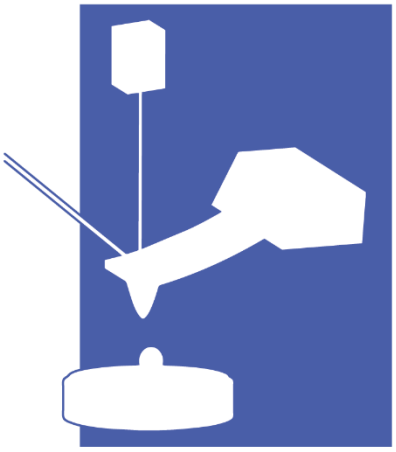
Les virus représentent la famille d'entités biologiques la plus répandue sur Terre. Pourtant, malgré cette prédominance, leur étude a été et reste difficile, tout d'abord, historiquement, à cause de leurs très petites tailles, puis à cause de leurs grandes variabilités et de leur sensibilité aux conditions environnementales.

Grâce à l'utilisation de techniques issues de la Physique Expérimentale (AFM, cristallographie…) ou exploitant des concepts physiques (comme la cryoEM ou la microscopie super-résolution par fluorescence), les virus ont dévoilé un grand éventail de formes, de tailles et de stratégies d'infection des cellules cibles. Mais ces instruments ont également fourni des informations sur les propriétés mécaniques des capsides (avec les pinces optiques ou l'AFM).

Mon travail de recherche s'est concentré sur deux virus, le virus VIH-1 et le virus AAV. Le premier, responsable d'une pandémie mondiale, présente un cycle viral complexe, avec plusieurs étapes d'assemblage (lors du bourgeonnement et de la maturation) et de désassemblage (lors de la maturation et de la libération du génome dans le cytoplasme). L'utilisation d'instruments comme l'AFM permet d'acquérir des informations à l'échelle du virus unique pour comprendre les différents paramètres pouvant contrôler l'évolution du virus au cours de l'infection d'une cellule. Le second virus, non pathogène, est un outil biotechnologique important en thérapie génique. Connaitre le lien entre les propriétés biologiques et les paramètres physiques imposés par la structure et le microenvironnement du virus donne des indications pour optimiser le transfert de gènes codant pour des protéines d'intérêt.

Mais étudier ces objets biologiques impliquent des protocoles précis ainsi que des méthodes d'analyse adaptées (voir Chap. 2.) pour extraire des données les informations pertinentes à l'étude du VIH-1 (voir Chap. 3) et du virus AAV (voir Chap. 4).

Chapitre 2 Une étude expérimentale par AFM



Nous avons vu dans la première partie les problématiques de mon travail de recherche. Différentes stratégies expérimentales ont été mises en œuvre pour essayer de répondre à ces questions.

Cette étude s'appuie principalement sur des expériences exploitant un microscope à force atomique ou AFM (*Atomic Force Microscope*). Cependant d'autres approches expérimentales ont été abordées comme la diffusion statique de la lumière (SLS, *Static Light Scattering*) par des particules AAV en suspension dans une solution tampon ou des techniques classiquement utilisées en biochimie (*WesternBlot* et *DotBlot*).

Cette partie s'attachera dans un premier temps à décrire le microscope à force atomique, son principe général et les différents modes de fonctionnement que j'ai exploités durant ma thèse. Dans un deuxième temps, je décrirai les différentes étapes des expériences réalisées par l'AFM ainsi que les méthodes d'obtention et d'analyse des données obtenues. Les expériences de SLS ou de biochimie seront décrites dans le chapitre IV, où les protocoles et les résultats seront discutés.

I. Le microscope à force atomique

Le microscope à force atomique fait partie de ces outils d'investigation de l'infiniment petit qui ont émergé dans le domaine de la physique des surfaces vers la fin du 20ème siècle. Cet instrument a révolutionné ce pan de la physique expérimentale car il a permis l'étude de la topographie de surfaces, à l'échelle nanométrique mais également, dans certains cas, de la mécanique de ces surfaces.

1. Principe général

a. Le microscope à effet tunnel.

Le microscope à effet tunnel est ce qu'on peut appeler l'ancêtre du microscope à force atomique et des autres microscopes à sonde locale. Inventé en 1981 par les ingénieurs de *IBM* Gerd Binnig et Heinrich Rohrer (Binnig et al. 1982; Binnig & Rohrer 2000), il utilise un phénomène ondulatoire : l'effet tunnel.

Montée sur un levier rigide conducteur, une pointe dont l'extrémité, également conductrice, se termine par une portion de sphère de quelques nanomètres de diamètre parcourt une surface elle-même conductrice à quelques nanomètres de distance (figure 2.1). Une forte différence de tension est imposée entre la surface et le levier permettant ainsi à des électrons de passer de l'une à l'autre par effet tunnel. L'intensité du courant est alors non nulle et dépend fortement de la distance entre la pointe et la surface : plus elle est petite, plus le passage par effet tunnel des électrons est facilité, plus l'intensité augmente. En réalisant une boucle de rétroaction sur la position de la pointe pour conserver une intensité constante, on remonte à une carte de la topographie couplée à ses propriétés conductrices (qui peuvent être considérées, selon l'étude, comme

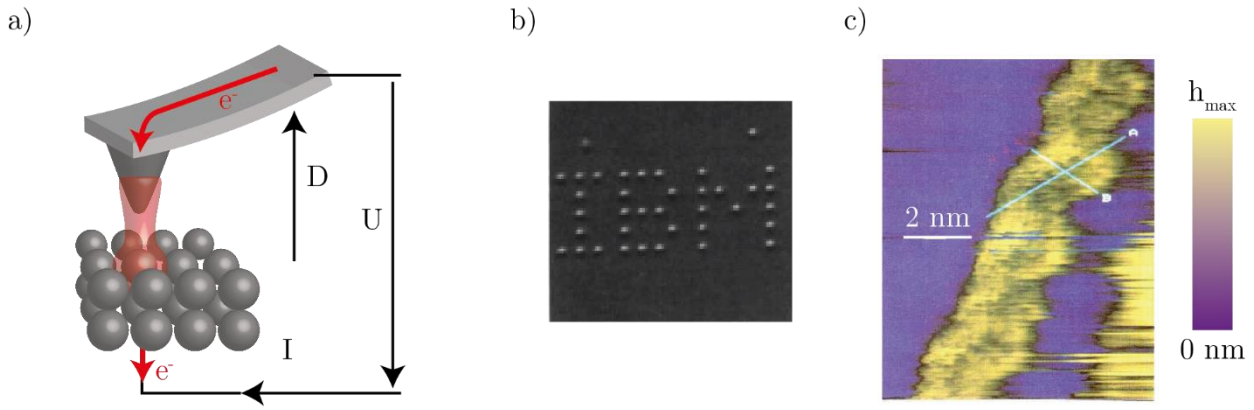


figure 2.1 - Microscopie à effet tunnel (STM)
a) Schéma très simplifié du microscope à effet tunnel. Les électrons sous l'effet de la différence de potentiel U se déplacent de la pointe vers la surface conductrice. Si la distance entre la pointe et le la surface est assez faible, le comportement ondulatoire des électrons leur permet de plus ou moins passer par effet tunnel. Une rétroaction sur la position du levier D pour garder l'intensité I constante lors du balayage de la pointe sur la surface permet d'obtenir une cartographie de la surface et donc de la morphologie des objets déposés.
b) La manipulation, atome par atome, d'atomes par STM a permis de placer ces atomes de Xenon pour inscrire l'anagramme de l'entreprise sur une surface d'un cristal de Nickel (Eigler & Schweizer 1990).
c) Image d'un brin d'ADN, déposé sur un cristal de graphite orienté (HOPG) (Driscoll et al. 1990).

homogènes sur toute la surface). La résolution de cette microscopie atteint l'échelle atomique avec la possibilité de modifier la position des atomes, les uns par rapport aux autres (Eigler & Schweizer 1990) (figure 2.1).

La contrainte la plus importante est que la surface doit être conductrice, ce qui empêche une visualisation directe d'objets biologiques. Cependant, un traitement préalable a permis d'observer de l'ADN (Driscoll et al. 1990) ou encore un ou des virus (figure 2.1).

Mais ce microscope a surtout été à l'origine de nombreux autres outils permettant de visualiser des structures microscopiques et d'en étudier certaines propriétés physiques, comme l'AFM.

b. Description du microscope à force atomique.

Le microscope à force atomique appartient également à la famille des instruments d'observation de surfaces à l'échelle microscopique par l'intermédiaire d'une sonde (figure 2.2) appelée famille des instruments à sonde locale.

A l'instar du microscope à effet tunnel, la sonde est constituée d'une pointe généralement pyramidale d'une dizaine de micromètres de haut dont l'extrémité peut être assimilée à une demi-sphère dont le rayon n'excède pas la dizaine de nanomètre. Elle est montée à l'une des extrémités d'un micro-levier souple d'une centaine de micromètres encastré de l'autre côté dans un support, appelé *chip*. Les dimensions de cette pointe la rendent sensible à des interactions faibles lorsqu'on l'approche d'une surface à quelques nanomètres. Le levier va alors se défléchir, la pointe étant attirée ou repoussée selon la nature de l'interaction. Pour pouvoir suivre sa déflexion, le levier est éclairé par un laser qui, réfléchi, va frapper une photodiode à quatre quadrants.

La mesure de la tension de chaque quadrant, V_1, V_2, V_3 et V_4, permet de connaitre la position du spot laser sur la photodiode (figure 2.2) :

La position horizontale est proportionnelle à :

$$Hor = \frac{(V_1 + V_3) - (V_2 + V_4)}{(V_1 + V_2) + (V_3 + V_4)} \tag{2.1}$$

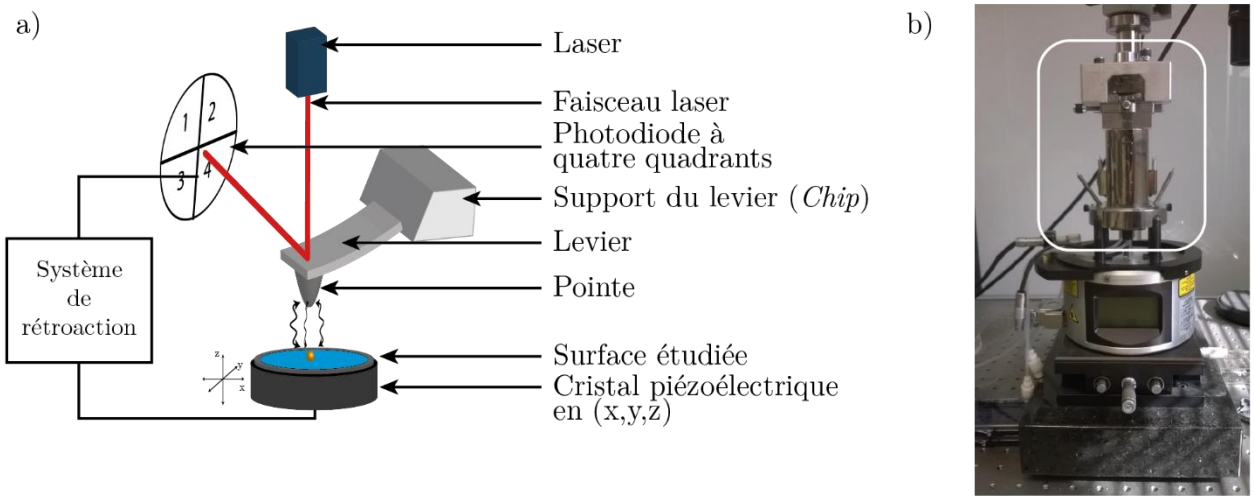


figure 2.2 – Le microscope à force atomique (AFM)
a) Schéma simplifié de l'AFM.
b) Photographie du microscope à force atomique utilisé au laboratoire (MultiMode 8 de Bruker). Le cadre en blanc correspond au schéma du a). Une partie importante de l'AFM est l'électronique qui n'apparait pas sur cette photographie.

La position verticale est proportionnelle à :

$$Vert = \frac{(V_1 + V_2) - (V_3 + V_4)}{(V_1 + V_2) + (V_3 + V_4)} \tag{2.2}$$

L'intensité lumineuse totale réfléchie est alors donnée par :

$$Sum = V_1 + V_2 + V_3 + V_4 \tag{2.3}$$

La normalisation par la *Sum* des paramètres *Hor* et *Vert* évite que de possibles fluctuations naturelles de l'intensité initiale du laser au cours d'une manipulation soient interprétées par le système comme des déflexions du levier.

c. Une sonde d'interaction.

Le principe du microscope à force atomique repose sur ces forces ayant une portée allant jusqu'à la centaine de nanomètres (interactions de Van der Waals, interaction électrostatique, interaction par pont capillaire), pour observer des objets microscopiques préalablement déposés sur une surface (comme du mica plan ou du verre). Cette dernière est ensuite placée en dessous de la pointe, sur un cristal piézoélectrique, permettant de déplacer la surface dans les trois directions x, y et z (figure 2.2.a). Grâce à un mouvement de la surface, à la fois vertical et horizontal, on peut ainsi cartographier les interactions entre la pointe et la surface via la position du levier.

La déflexion du levier dépendra de la nature et l'intensité de l'interaction entre la pointe et la surface mais également de la distance entre ces deux éléments.

On est ainsi capable, en un point donné de la surface, de suivre l'évolution de la déflexion du levier en fonction de l'approche puis du retrait du *chip* (en faisant varier la distance pointe-levier) et de caractériser la nature de l'interaction : on parle de courbe de déflexion. Comme nous le verrons dans une partie suivante (Chap.2 I. 3.), le levier lors de cette opération se comporte comme un ressort de raideur k_{lev} (figure 2.3.a). En multipliant la déflexion par sa constante de raideur, on mesure la force exercée par la pointe sur la surface plus ou moins souple : on parle de courbe de force. Par le principe d'action-réaction de Newton, l'évolution de la courbe de force lors de l'approche et lors du retrait du levier donne une idée de la nature de l'interaction entre la pointe et la surface (figure 2.3).

Les distances d'effet dépendent de la nature des interactions (du contact dans le cas du contact sphère/plan, à quelques dizaines de nanomètres pour l'appui sur des polymères brossés en passant par les centaines de nanomètres pour les interactions électrostatiques). Le système de détection de la déflexion, et donc de la mesure de force, présente une grande sensibilité de l'ordre du centième de nanomètres, ce qui pour des leviers couramment utilisés donne une sensibilité de la dizaine de piconewtons.

2. Imagerie

En exploitant ses qualités de sonde d'interaction, localement, l'AFM permet de cartographier les interactions sur une surface balayée par la pointe.

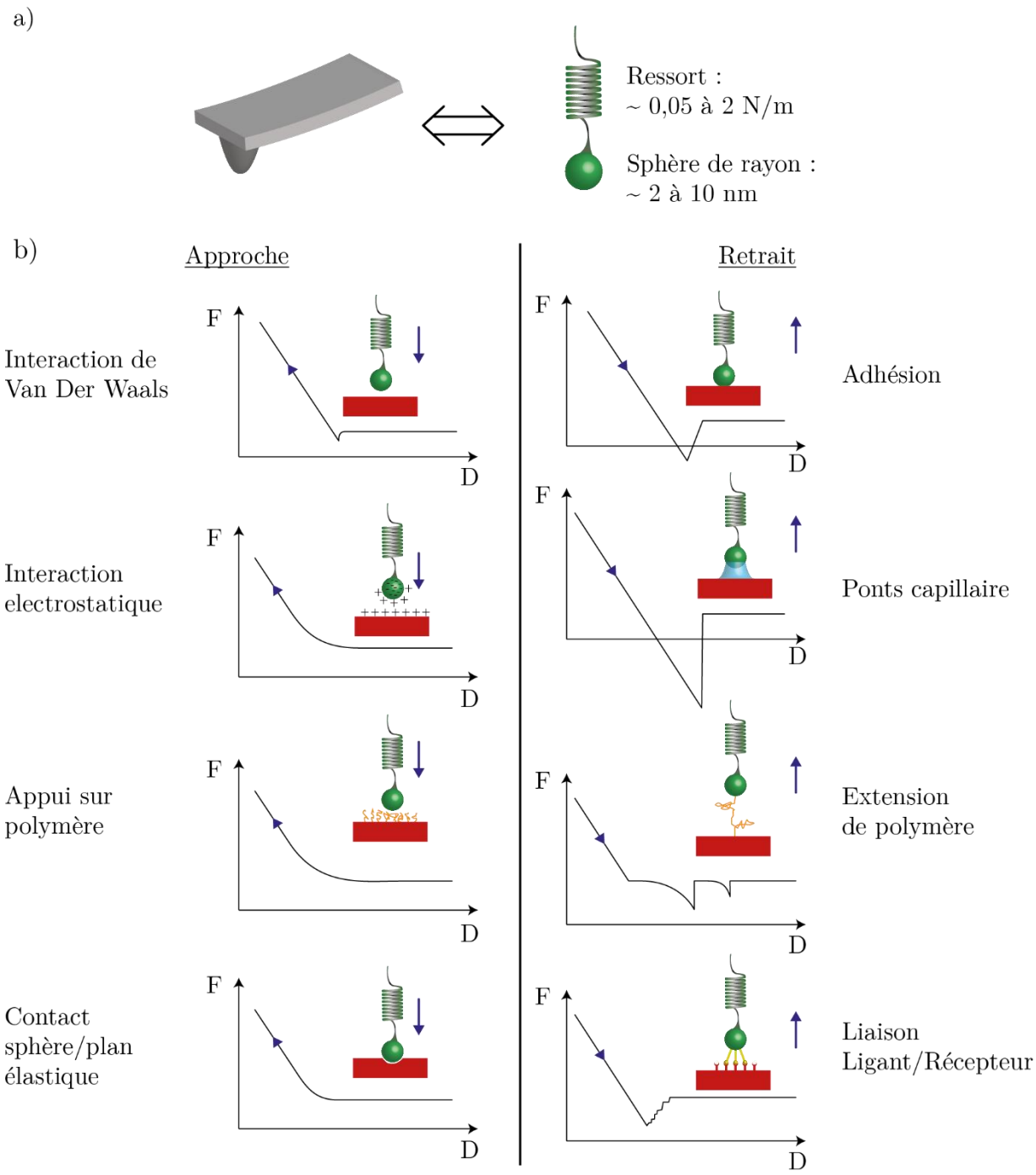


figure 2.3 - Evolution de la force exercée par la pointe sur la surface (F) en fonction de la distance levier-surface (D)
a) Modélisation du levier d'AFM par un ressort.
b) A gauche, lors de l'approche de la pointe sur la surface. A droite, lors du retrait de la pointe. La flèche bleue sur les courbes ainsi que sur les schémas indiquent la direction du déplacement de la pointe. L'ajustement de ces courbes par des modèles complexes permet de remonter à différentes grandeurs physiques particulières comme la distance de Debye dans le cas des interactions électrostatiques ou encore l'énergie de liaison entre un liguant et le récepteur associé (voir Chap. 1 sur la mesure des interactions de liaisons). Cette figure s'inspire de (Heinz & Hoh 1999).

a. Principe général et rétroaction

Pour imager une surface, le logiciel définit un quadrillage où se fera en chaque pixel une mesure (figure 2.4.a). Sous l'effet de l'interaction entre la surface et la pointe à proximité de celle-ci, le levier va se déformer. En déplaçant la pointe d'un pixel à l'autre, on suit l'évolution de la déflexion du levier et donc de l'amplitude de l'interaction sur toute la surface balayée par l'intermédiaire des tensions aux bornes de la photodiode. Seulement, cette méthode ne donne aucun contrôle sur la force d'appui de la pointe sur la surface, pouvant mener à un endommagement de la pointe et/ou de la surface. On préfère utiliser une boucle de rétroaction pour maintenir la déflexion du levier constante en chacun des points de la surface lors du déplacement horizontal de celle-ci en jouant sur son déplacement vertical (figures 2.2 et 2.4.b). Le comportement de type ressort du levier et la donnée du déplacement vertical récupérée en chacun des pixels de la surface, conduit à une cartographie des interactions entre la pointe et la surface. Si ces interactions sont de même nature, la carte obtenue révèle la topographie de la surface à un facteur constant près.

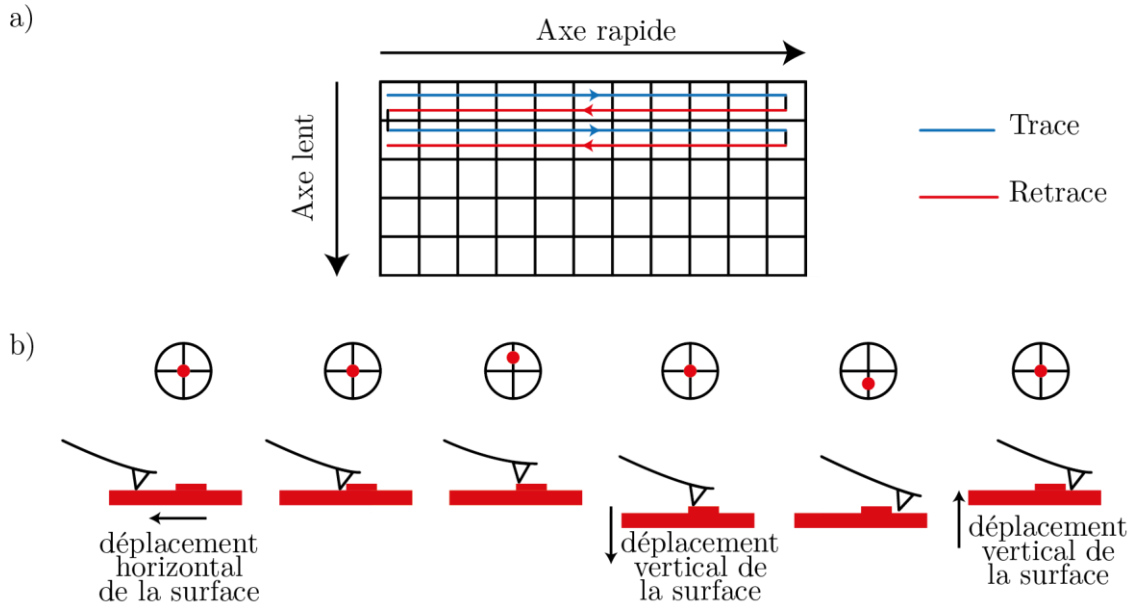


figure 2.4 - Imagerie par AFM
a) Pixellisation. Lors de la réalisation d'une image, un quadrillage est réalisé sur une partie de l'échantillon étudiée. A chacun des pixels, un mécanisme de rétroaction permet de réaliser une cartographie des interactions en mesurant la déflexion du levier.
b) *Mode contact*. Lorsque la pointe rencontre un obstacle ou un trou, le levier se défléchit déplaçant le spot laser sur la photodiode. La tension n'est plus la valeur consigne de la boucle de rétroaction. Le cristal piézoélectrique abaisse la surface pour revenir à la tension de consigne.

b. Les modes d'imagerie

Plusieurs modes d'imagerie existent. Selon la nature de l'objet étudié, dans notre cas des virus déposés sur une surface, un mode sera à privilégier par rapport à un autre. Je décris ici très brièvement les différents modes. Pour plus de renseignements, se référer à (Eaton & West 2010).

Le mode décrit dans la partie précédente (Chap. II.2.a) est appelé *Mode Contact* puisque la pointe est proche de la surface voire en contact en chaque pixel de mesure. Il permet dans certaines conditions

(l'échantillon doit être placé dans un milieu proche du vide et la pointe doit être particulièrement fine) d'avoir une résolution proche de l'Angstrom, c'est-à-dire de distinguer les atomes d'une surface très plane (Ishigami et al. 2007). Cependant, l'utilisation de ce mode n'est pas adaptée à des échantillons biologiques qui doivent

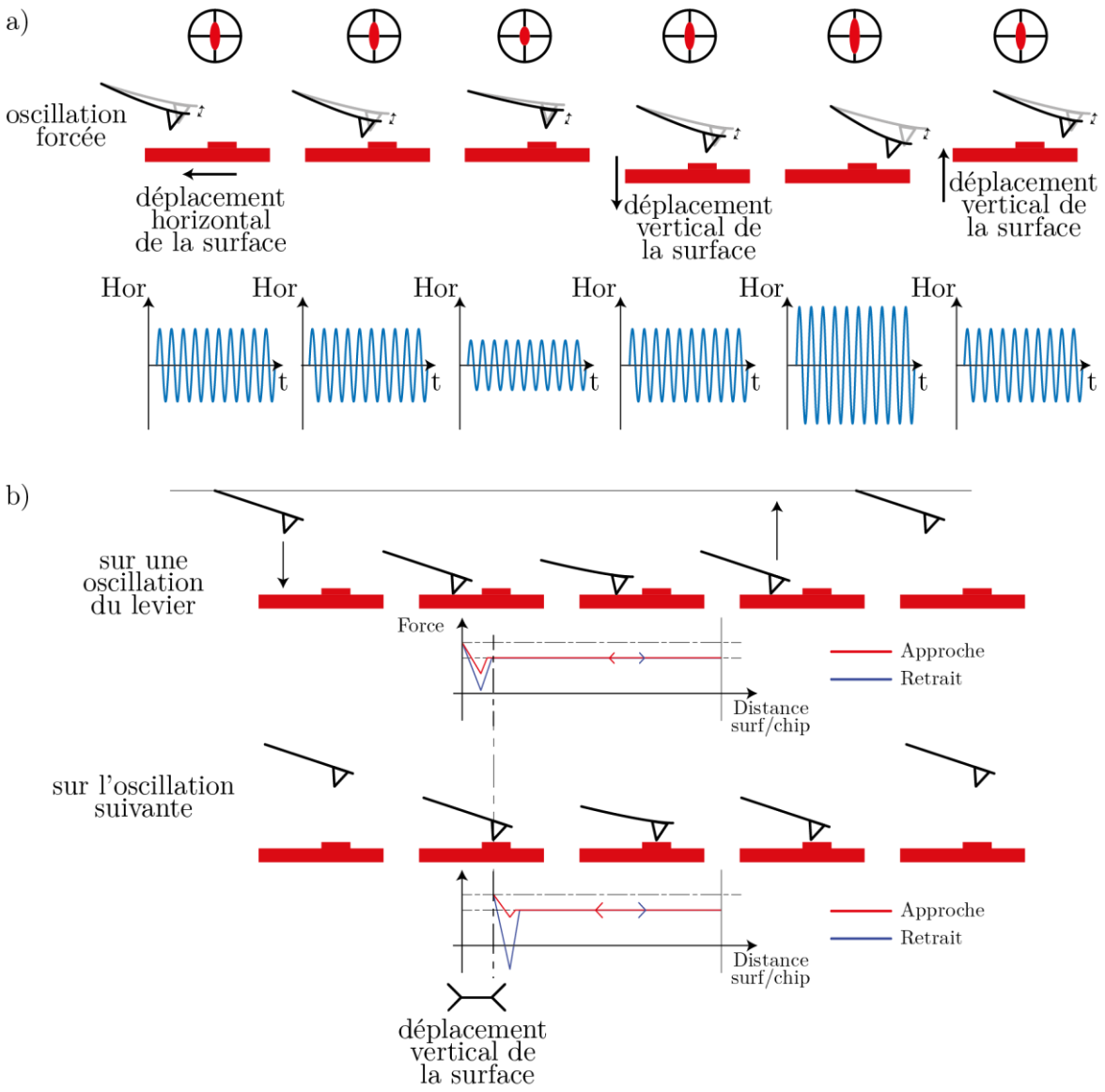


figure 2.5 - D'autres modes d'imagerie

a) *Mode Tapping*. Le levier est mis à osciller à une fréquence proche de sa fréquence de résonance. Lors de l'approche d'un obstacle ou du vide, des interactions entre la surface et la pointe font apparaitre des phénomènes non linéaires modifiant l'amplitude d'oscillations. La tâche sur la photodiode (superposition des différentes positions du spot laser dont la position oscille nécessairement) est donc modifiée, changeant ainsi la tension. La boucle de rétroaction force le déplacement vertical de la surface pour revenir à la consigne.

b) *Mode Peak Force*. Le levier est mis sous oscillation à une fréquence très inférieure (2 kHz ou 8 kHz) à sa résonance (entre 100 et 300 kHz) selon une sinusoïde pour que le levier ne se déforme pas et avec une amplitude imposée, entre 20 et 50 nm. Sur chaque pixel, l'AFM réalise une approche jusqu'à atteindre une valeur de consigne puis un retrait. La mesure de cette courbe de force est suivie via la photodiode. Si la distance parcourue par la pointe est différente de la consigne par la présence d'un obstacle par exemple, le système de rétroaction commande à la surface de se déplacer pour revenir à la configuration initiale. L'information de ce déplacement est conservé pour imager la surface.

être observées généralement en liquide ou dans l'air. De plus, le *Mode Contact* est une méthode trop intrusive et peut endommager les objets biologiques fragiles à cause de forces de frictions latérales, importantes lors du balayage.

Le mode appelé *Mode Tapping* lui est alors préféré (figure 2.5.a). Le levier, éloigné de la surface, est préalablement mis sous oscillation à une fréquence proche de sa résonnance, grâce à un cristal piézoélectrique annexe, avec une amplitude de sa déflexion autour de 20 nm. Après avoir positionné la surface sous le *chip* et approché la pointe, sous l'effet des changements d'interactions avec la surface, l'amplitude va être modifiée. La rétroaction verticale s'attache alors à conserver cette amplitude constante en chaque point de mesure. L'obtention de la topographie de la surface se fait avec une très faible intrusion puisque la pointe oscillante ne s'approche de la surface que par intermittence et toujours de haut en bas limitant ainsi les frictions latérales.

Le *Mode Peak Force* couple les deux précédents en contrôlant l'interaction entre la pointe et la surface tout en assurant un contact intermittent (figure 2.5.b). Le levier est mis en oscillation à une fréquence très faible (environ 2 ou 8 kHz) devant sa fréquence de résonance (plusieurs centaines de kHz) avec une amplitude constante, parcourant à chaque période une centaine de nanomètres. Cette excitation n'entraine pas une déformation du levier. La rétroaction se fait en conservant l'interaction maximale entre la pointe et la surface, lors de l'approche du levier, constante. Ce dernier mode est de plus en plus utilisé pour l'étude des virus (et des systèmes biologiques) car il présente l'avantage d'être peu intrusif avec un contrôle direct de la force d'appui (contrairement au *Tapping Mode* contrôlant l'amplitude d'oscillation).

c. Paramètres de contrôle

Plusieurs paramètres rentrent en jeu pour obtenir une image par AFM. En dehors du type de pointe utilisée, certains paramètres sont communs aux différents modes :

- Les dimensions de la surface observée, allant de quelques nanomètres à plusieurs micromètres.
- La pointe balaie la surface ligne par ligne, en réalisant le profil des interactions dans un sens (la trace) puis dans l'autre (la retrace) : l'image obtenue peut être constituée soit des lignes de type trace, soit à celles de type de retrace. On définit respectivement l'axe rapide et l'axe lent selon et orthogonal à la direction des lignes.
- La résolution de l'image, c'est-à-dire le nombre de pixels qui la constitue. En chacun de ces points, la boucle de rétroaction est réalisée plusieurs fois pour obtenir le déplacement vertical nécessaire. Plus la résolution est importante, plus le temps nécessaire pour l'obtention d'une image est grand.
- La vitesse de déplacement de la pointe pour réaliser une ligne de l'image. Plus cette vitesse est élevée, plus le temps nécessaire pour obtenir l'image est court. En contrepartie, la pointe doit plus interagir en moyenne avec la surface (en se rapprochant) au risque de s'abimer ou d'endommager les objets visualisés.
- Un dernier paramètre, appelé le gain, présent dans les deux modes, contrôle l'efficacité de la boucle de rétroaction, de type *Proportionnel Intégral Dérivatif*.

D'autres paramètres expérimentaux sont propres aux modes d'observation.
Pour le m*ode Tapping*, on pourrait citer :

- L'amplitude d'oscillation *A* du levier, loin de la surface (par le biais du cristal piézoélectrique annexe). Il s'agit du paramètre de contrôle à conserver constant lors de la réalisation d'une image.
- La fréquence d'oscillation *f* du levier, proche de sa fréquence propre.
- La distance moyenne du levier *D*.

Pour le *mode Peak Force*:

- La force maximale atteinte lors d'une courbe de force (de quelques dizaines de piconewtons au nanonewton). Plus ce paramètre est élevé, plus la pointe appuie sur la surface stabilisant l'image et diminuant les imperfections au risque d'endommager la particule. Il s'agit du paramètre de contrôle à conserver constant lors de la réalisation d'une image.
- La fréquence de réalisation des courbes de force (2kHz ou 8kHz). Plus la fréquence est grande, plus la vitesse de déplacement de la pointe peut être augmentée sans fortement détériorer la qualité de l'image.
- La distance parcourue par le levier lors d'une courbe de force. Cette distance doit être suffisamment grande pour avoir une plage où la pointe n'est pas en interaction avec la surface.

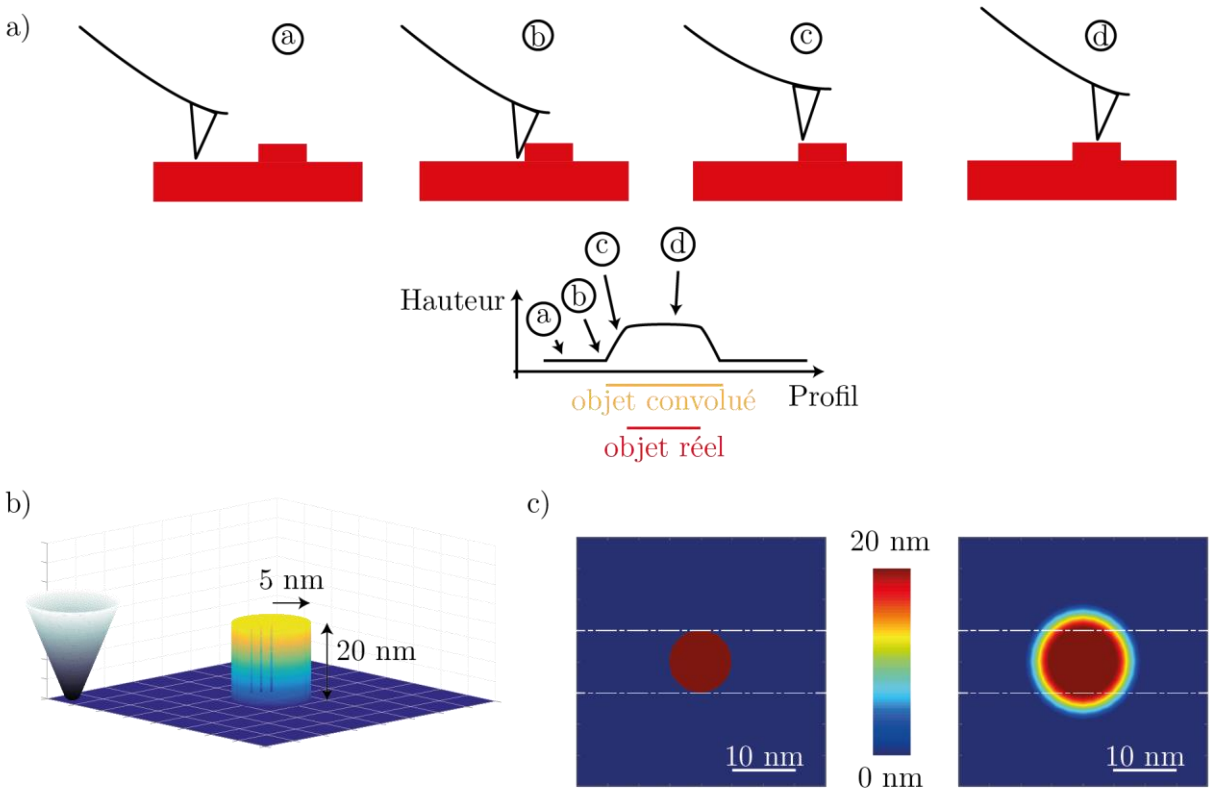


figure 2.6 - Convolution par la pointe
a) Principe de la convolution. La dimension finie de la pointe va convoluer les objets sur la surface. Les objets apparaissent plus larges mais ont la même hauteur apparente.
b) Modélisation de la réalisation d'une image AFM en mode contact. La pointe de forme conique, d'angle de 20° dont l'extrémité est une sphère de 2 nm, parcourt la surface où se trouve un cylindre de rayon 5 nm et de hauteur 20 nm (voir Annexe A).
c) Image réelle du cylindre (à gauche) et image obtenue grâce à l'AFM modélisé (à droite). L'objet apparait bien plus large que ce qu'il n'est en réalité.

d. Résolution

Souvent, comme cela a été le cas au début de ce paragraphe, on souligne que la résolution de l'AFM peut atteindre l'ångström et permet ainsi d'observer des atomes à la surface d'un cristal. En plus de nécessiter un protocole particulier, cette résolution en (x,y) est fortement limitée par la dimension de la pointe.

En effet, plus son extrémité sera large, plus elle va couvrir, à un instant donné, une grande zone de la surface, moyennant les interactions avec elle. Les objets seront alors convolués par le profil de la pointe, atténuant la rugosité et augmentant la taille des objets.

En annexe (Annexe A) ainsi que sur la figure 2.6.b, on peut voir une modélisation simple de l'imagerie par AFM, que j'ai réalisée grâce à Matlab et avec l'aide de Philippe Capdepuy, ingénieur de recherche chez *Humarobotics* et chez *Generation Robots* ainsi qu'une courte étude analytique de la convolution.

Pour ce qui concerne nos images, la résolution en (x,y) est de l'ordre de quelques nanomètres.

La résolution en z dépend de la qualité du suivi de la déflexion. Pour notre AFM, cette résolution est autour de l'Angstrom. Les hauteurs des objets ne sont pas sensibles à la convolution de la pointe (figure 2.6). Cependant, il est important de rappeler que les images obtenues sont des cartes d'interactions et non directement la topographie de la surface. Ainsi, on s'attend à ce qu'un double brin d'ADN déposé sur une surface présente une hauteur de 2 nm (le diamètre de la double hélice) alors qu'il apparait avec une hauteur de 1 nm. Les données obtenues par AFM ne peuvent pas être considérées absolues mais nécessitent d'être comparées les unes aux autres de manière relative.

3. Propriétés mécaniques

L'avantage de l'AFM en comparaison avec d'autres microscopies de même résolution réside dans sa capacité à obtenir des informations sur les propriétés mécaniques des objets présents sur la surface.

a. Principe général

En approchant le levier vers la surface, la pointe va appuyer sur l'objet se trouvant dessous. Selon ses propriétés mécaniques, après contact, l'objet va se déformer en même temps que le levier va se défléchir. De même, après avoir appuyé sur l'objet, le retrait de la pointe permet de revenir à l'état initial où l'objet et la pointe ne sont plus en interaction, à condition que l'appui n'ait pas cassé l'objet. On parle alors d'une expérience d'indentation à l'échelle nanométrique, ou nano-indentation (figure 2.7). Le suivi de la déflexion, toujours grâce au faisceau laser et à la photodiode à quatre-quadrants, nous donne accès à une courbe de la déflexion du levier (ou de force) en fonction de la distance entre le support-levier et la surface composé d'une approche puis d'un retrait.

b. Courbe d'approche sur une surface dure

Dans le cas où la pointe appuie sur une surface dure, seul le levier se déforme. La courbe associée présente deux zones (figure 2.7) :

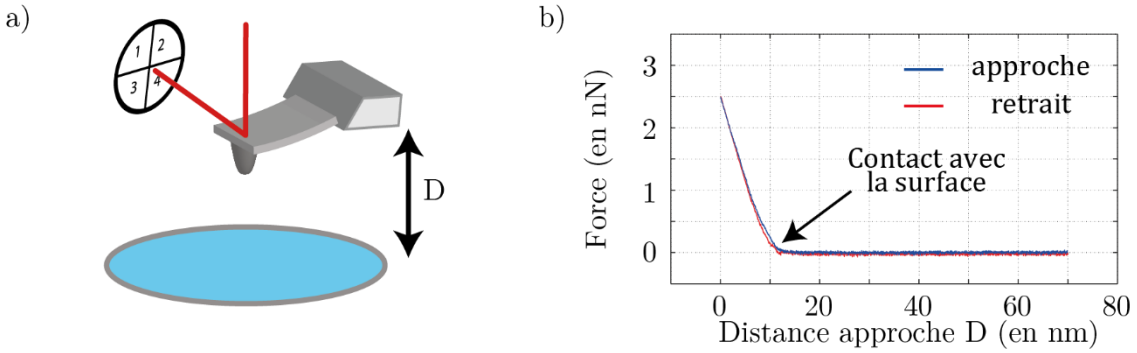


figure 2.7 - Expérience d'indentation
a) Description du système. La pointe va se rapprocher de la surface progressivement, diminuant la distance D. Le levier va se déformer après le contact comme se comprimerait un ressort de raideur k_{lev}. Après avoir atteint une déflexion maximale consignée par l'expérimentateur, le *chip* va revenir à sa position initiale, redonnant au levier sa courbure initiale.
b) Exemple de courbes d'indentation sur une surface dure. (En bleu) Courbe d'approche. (En rouge) Courbe de retrait.

- La première zone est constante, le levier n'est pas déformé, sa déflexion est nulle.
- La deuxième zone est linéaire, le levier se déforme proportionnellement à la descente du support-levier.

Cette déformation est analogue à celle d'un ressort de raideur k_{lev}. Un modèle a été proposé par Sader (Sader 1998) pour décrire le levier comme une poutre encastrée d'un côté, libre de l'autre, dans un fluide plus ou moins visqueux. Dans ce modèle, k_{lev} est relié aux dimensions du levier.

Le passage d'une courbe de déflexion en courbe de force se fait alors facilement puisque la force exercée par la pointe sur la surface est obtenue par multiplication de la déflexion par k_{lev}.

c. Courbe d'approche sur une surface molle

Les virus que nous étudions sont des objets relativement mous. Sous l'appui de la pointe, l'objet va se déformer selon ses propriétés mécaniques et le levier va également être défléchi.

L'étude du régime de déformation, sous la condition de pouvoir appliquer certains modèles mécaniques, donne accès aux propriétés mécaniques de l'objet (voir Chap. 2.IV.4).

d. Paramètres de contrôle

La réalisation de courbes de force, approche et retrait, oblige le contrôle de différents paramètres. J'en cite ici les principaux :

- La position de la pointe sur l'objet. En couplant l'imagerie et les expériences de nano-indentation, il est possible de choisir où appuyer sur la surface et de préférence sur l'objet étudié.
- La déflexion maximale d'appui ou consigne d'indentation. A travers ce paramètre, on impose au système de ne pas dépasser une déflexion maximale du levier lors de l'approche de la pointe.

- La distance totale parcourue par la pointe lors d'une expérience de nano-indentation.
- La fréquence de réalisation d'une courbe de force (aller et retour). Avec ces deux derniers paramètres, on contrôle la vitesse de déplacement de la pointe.
- Le nombre de points enregistré par courbe (la photodiode échantillonne le signal).

II. Préparation des échantillons

Avant de pouvoir étudier des objets biologiques comme les particules du VIH-1 ou les vecteurs virales AAV, il est nécessaire d'obtenir des particules purifiées d'une part et d'optimiser les surfaces où seront déposés les virus, d'autre part.

1. Virus : VIH et AAV

L'obtention des particules purifiées, faisant intervenir des protocoles et du matériel expérimental de la recherche en Biologie, a été réalisée par l'équipe d'Anna Salvetti, au Centre de Recherche International en Infectiologie (CIRI) à l'ENS de Lyon, pour les capsides AAV. Deux équipes, celle de Delphine Muriaux au laboratoire Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies de la Santé (CPBS) à Montpellier, et d'Andrea Cimarelli au laboratoire CIRI à l'ENS de Lyon ont produit et purifié les particules VIH-1 nécessaires à cette étude. Les protocoles diffèrent légèrement pour l'obtention des particules AAV et des particules VIH.

La production des deux types de particules virales s'appuie sur la même méthode : la transfection de plasmides codant pour les protéines (de structure et régulatrices) des virus et le génome viral. Dans un but de simplification, ce protocole pourrait se résumer ainsi : on donne à des cellules spécifiques tout le matériel génétique (le « plan de construction » avec les plasmides, les briques avec les acides aminés et l'énergie nécessaire avec les nutriments cellulaires) pour produire les virus. Tout ceci est incorporé dans la cellule où la machinerie cellulaire est accessible et rend possible la production protéines puis de particules virales.

Je décris par la suite, les différentes étapes de ce protocole pour le VIH-1 ((Thomas 2013; Tartour 2014; Faivre-Moskalenko et al. 2014) d'une part et pour l'AAV (Salvetti et al. 1998; Millet 2014).

a. Production des pseudo-particules du VIH-1

Des cellules humaines de la lignée HEK 293T sont transfectées par la méthode Phosphate Calcium (Bacchetti & Graham 1977) avec des plasmides codants pour la production de particules du VIH-1. Les particules issues de ce protocole ne sont pas à proprement parler identiques aux virus VIH-1 car non infectieuses. En effet, les cellules ne sont pas infectées par le génome viral du VIH-1 (on a transfection et non infection), il n'y a pas de production de protéines d'enveloppe virales et de génome viral complet empêchant l'infection. Ces précautions permettent la manipulation de ces objets biologiques en dehors du laboratoire de grande sécurité P3. On parle alors de VLPs, pour *Virus-Like Particles,* et non de virus.

Je présente ici les plasmides utilisés :

- Le plasmide p8.2 exprime, en plus de Gag, GagPol, les protéines régulatrices Tat et Rev et les protéines accessoires Nef, Vif et Vpr. Ce plasmide mène à des particules VLPs matures (c'est-à-dire que le core intérieur est totalement formé, Gag ayant été clivé par la protéase virale) qui ne diffèrent des particules sauvages que par l'absence des protéines virales Env et Vpu et de l'ARN génomique.

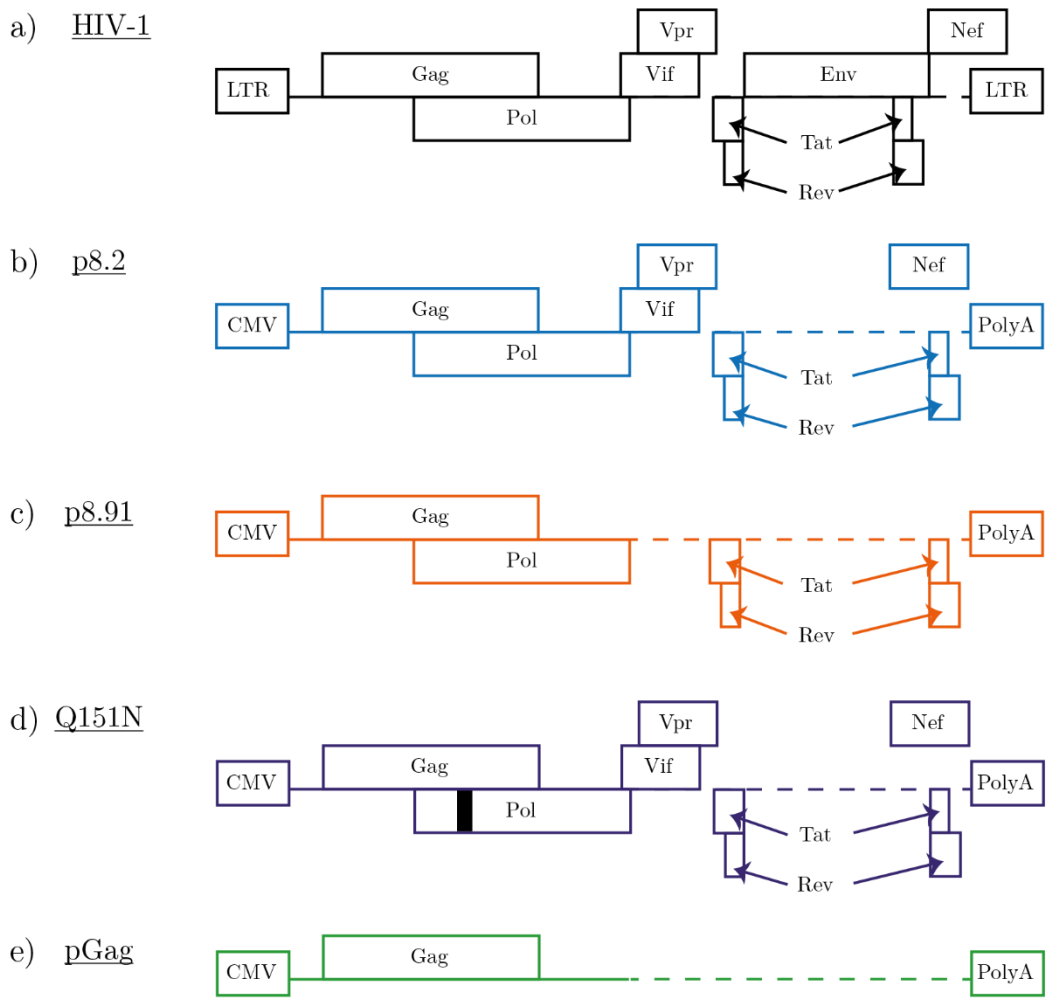


figure 2.8 - Plasmides utilisées pour la production de VLPs du VIH-1
a) Génome simplifié du VIH-1.
b) Plasmide p8.2. Il est utilisé pour la production de VLPs extrêmement proches de la particule sauvage (absence des protéines Env et Vpu) (inspiré de (Skasko & Kim 2008)).
c) Plasmide p8.91. Il diffère du plasmide sauvage par l'absence du code pour la production des protéines Vpr, Vif et Nef (inspiré de (Zufferey et al. 1997))
d) Plasmide Q151N. Il diffère du plasmide sauvage par la modification de la partie codant pour la rétrotranscriptase la rendant cinétiquement peu efficace (inspiré de (Skasko & Kim 2008))
e) Plasmide pGag. Il diffère du plasmide p8.91 par l'absence du code Pol, permettant la production de certaines protéines recombinantes, en particulier la protéase assurant la maturation de la particule. Les particules produites sont donc immatures.

- Le plasmide p8.91 exprime les gènes Gag et GagPol, produisant les protéines de structure et les enzymes virales comme la protéase, l'intégrase et la rétrotranscriptase, ainsi que Tat et Rev. Ce plasmide mène à des particules VLPs matures.
- Le plasmide pGag, quant à lui n'exprime que Gag. Ce plasmide mène alors à des particules VLPs immatures (le core n'est pas formée, la protéine Gag n'a pas été clivée par la protéase). Ce plasmide a été fourni par l'équipe d'Andréa Cimarelli.

- Le plasmide p8.2 Q151N exprime les mêmes gènes que p8.2 mise à part que la rétrotranscriptase a été mutée pour diminuer fortement l'efficacité enzymatique de cette protéine. La rétrotranscription est pour ce mutant ralentie fortement (Weiss et al. 2002) (fourni par l'équipe d'Andréa Cimarelli).
- Le plasmide Venus n'exprime aucune protéine virale, seulement la protéine fluorescente GFP. Ce plasmide sert de contrôle négatif.

Par la suite, on nommera de manière abusive le type de particule produite par le plasmide utilisé (ainsi la VLP p8.2 est issue de la transfection du plasmide p8.2).

On a également pu rajouter le plasmide pRNAψ qui code pour un ARN pseudo-viral encapsidable par Gag dans la particule virale, qui exprime une proteine GFP (et rend les cellules vertes). Il code également pour le génome viral, non infectieux dans notre étude. La présence d'une chaine d'acides ribonucléiques particulière appelée ψ, dans le génome viral, amène les protéines Gag à s'assembler préférentiellement sur cet ARN. En son absence, les protéines Gag peuvent s'assembler autour d'ARNs cellulaires. Il est à noter que le génome produit est plus court que le génome sauvage. Par la suite, lorsque la question de l'effet de ce signal sur les virus produits se posera, les VLPs contenant cet ARN ψ auront leur nom suivi d'un « +ψ ».

Les cellules d'une même lignée, mais stable, exprime constitutivement ce pseudo ARN viral contenant le signal d'encapsidation ψ. Il est donc inutile de rajouter le plasmide pRNAψ pour produire des VLPs +ψ puisque la cellule exprime déjà le génome pseudo-viral. Cette lignée stable simplifie le processus de production des VLPs +ψ. Elle nous a été fournie au cours de la thèse par A. Cimarelli.

Les cellules sont transfectées avec les plasmides choisis, puis cultivées pendant 24h. Le surnageant, où se trouvent les VLP produites, est ensuite recueilli puis filtré. Les VLPs sont alors purifiées par centrifugation ultrarapide sur un double coussin de sucrose de 20% et 30% dans du TNE. Elles sont ainsi isolées au fond du tube. Elles sont ensuite resuspendues dans une solution de TNE (Tris, NaCl, EDTA - voir Chap. 2.II.2) à 4°C pendant 2h minimum ou une nuit. Ces étapes de la purification sont résumées sur la figure 9.a.

b. Production des cores du VIH-1

Le protocole de production des cores du VIH-1 suit exactement les mêmes étapes que celui des VLPs du VIH-1 à l'exception de l'étape de purification par centrifugation. Un détergent, le Triton X-100, est ajouté au coussin de 20% de sucrose (concentration finale 0,05%) dans le but d'enlever la bicouche lipidique des VLPs. Les cores ainsi obtenus sont ensuite resuspendues dans une solution de TNE, comme pour les VLPs. Cette étape de la purification est résumée sur la figure 9.b.

Pour vérifier la présence de VLPs matures et de cores dans les échantillons, une expérience d'électrophorèse sur protéines, appelé *Western Blot*, est réalisée figure 9.c.

Les objets purifiés sont placés dans un gel contenant un puissant surfactant (SDS). Les VLPs et les cores sont alors dénaturés. Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines migrent à une vitesse dépendant de leurs tailles : une ségrégation des protéines est donc faite. Au bout d'un temps, un transfert sur membrane permet de récupérer les protéines sans modifier leurs positions relatives. Des sondes anticorps se fixent spécifiquement sur les protéines. Un anticorps secondaire reconnait alors les sondes et fluoresce (figure 9.c). Un film photosensible imprime la position des protéines. La présence d'un signal signifie que la protéine se trouvait dans l'échantillon d'origine. Le signal pr55 Gag signifie que la protéine Gag est présente pour les VLPs mais

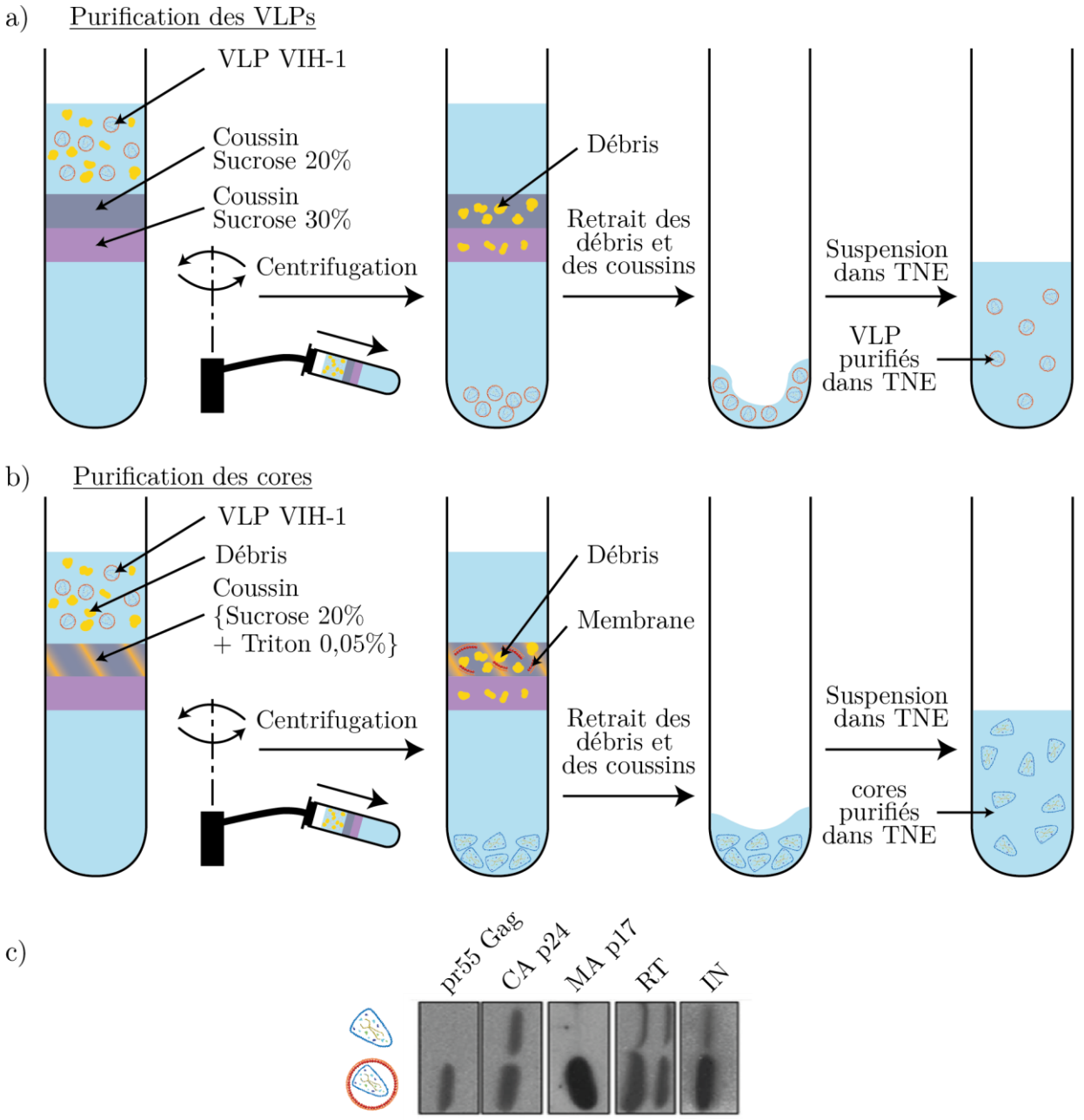


figure 9 – Protocole de purification des VLPs et des cores du VIH-1 et validité des résultats de purification.
a) Après avoir récupéré le surnageant de la production des virus par les cellules, la solution est déposée sur deux coussins de sucrose, l'un à 20% l'autre à 30%. Une centrifugation à 36000 tours par minutes force les VLPs et les débris à descendre en bas du tube. Ces derniers sont bloqués au niveau des coussins. Les VLPs se retrouvent dans le culot du tube. Un retrait des coussins par renversement du tube et une resuspension des VLPs pendant 2 heures dans une solution tampon TNE clôt le protocole.
b) Pour les cores, le protocole est sensiblement le même que pour les VLPs à la différence que du triton, un surfactant, est mélangé au coussin de sucrose à 20%. Lors du passage dans le coussin à 20%, la membrane des VLPs est détruite par le triton. On récupère finalement des cores sans la bicouche lipidique.
c) *Western Blot* sur les cores et les VLPs purifiés. Il s'agit d'un test de reconnaissances, par électrophorèse puis liaison à un anticorps, des protéines présentes au sein des VLPs et des cores, ici p8.91.

pas pour les cores. Il y a donc des particules encore immatures dans l'échantillon VLP. Cependant, la présence d'un signal pour les protéines CA et MA (obtenues par clivage de Gag lors de la maturation) signifie qu'il y a des particules matures.

c. Production des capsides AAV

Trois types de plasmides sont incorporés à l'intérieur de cellules humaine de la lignée HEK 293 grâce à un choc ionique assuré par la méthode de transfection au Phosphate Calcium :

- Le plasmide portant le génome AAV-GFP codant le transgène, contient la séquence qui sera incorporée dans la capside comme génome viral. Le plasmide utilisé va dépendre de la nature et de la longueur de l'ADN viral considéré.
- Le plasmide Rep-Cap codant pour les protéines de structure (Rep) et les protéines régulatrices (Cap). La partie Cap dépendra du sérotype voulu : AAV2, AAV8 et AAV9 (voir Chap. 1.IV.2 et .3).
- Le plasmide auxiliaire contenant des gênes de l'adénovirus codant pour des protéines régulatrices nécessaire à la production des capsides par la cellule transfectée.

Après trois jours d'incubation, les cellules sont suspendues dans un tampon puis détruites par des cycles de congélation-décongélation. Le lysat obtenu est ensuite purifié par deux gradients de densité successifs de chlorure de césium (CsCl). La densité des particules d'AAV correctement assemblées est bien caractérisée, ainsi le gradient de CsCl permet de récupérer les capsides fonctionnelles et d'éliminer les contaminants

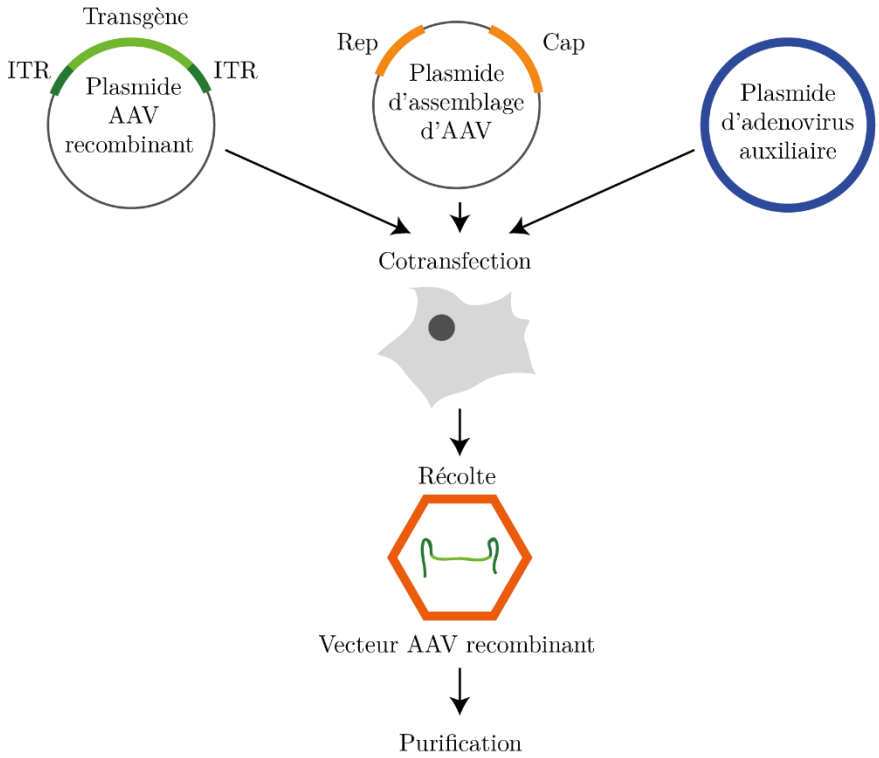


figure 2.10 - Protocole de production des vecteurs AAV.
Les plasmides permettant la production de l'ADN du vecteur (en vert), des protéines Rep et Cap (en orange) et des protéines du virus *helper* (ici un adénovirus) sont cotransfectés dans les cellules de la lignée HEK293.
Après trois jours d'incubation, les cellules sont détruites pour pouvoir récolter et purifier les vecteurs AAV produits.

cellulaires ainsi que les capsides mal formées ou vides. Une dialyse est réalisée pour enlever toute trace de CsCl. A la fin de ces étapes de purification, les particules d'AAV sont suspendues dans une solution tampon PBS^+ (solution phosphate saline avec des ions divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} - voir Chap. 2.II.2). Leurs concentrations[1], mesurées par qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction)* peuvent aller de 10^{10} vg/mL à 10^{13} vg/mL selon l'efficacité de production des cellules et la qualité, plus ou moins sélective, du filtrage de purification.

2. Choix du tampon

Nous avons mené des expériences pour étudier les propriétés morphologiques et mécaniques des virus VIH-1 et AAV sous différentes conditions environnementales, modifiant la nature des ions, le pH ou encore la température. La solution, appelée solution tampon, dans laquelle sont suspendues les particules VIH ou AAV va ainsi définir le microenvironnement directement en contact avec eux.

Pour étudier l'effet du microenvironnement sur la morphologie, les propriétés mécaniques et la stabilité d'une particule virale, une partie de la purification est d'abord diluée dans une solution tampon. En modulant différents paramètres chimiques ou physiques des solutions tampons, nous essayons de nous rapprocher d'un environnement physiologique et de mimer certaines conditions biologiques *in situ*. Nous avons ainsi été amenés à diluer une partie de la purification pour voir l'effet du pH ou de certains ions ou protéines par exemple. Cette étape a également été réalisée pour diminuer la concentration des particules, dans le but d'obtenir une meilleure imagerie et des conditions optimales pour les expériences d'AFM en général.

J'établis ci-dessous la liste des différents tampons utilisés au cours de ce travail de recherche :

- Le tampon TE pour Tris (10 mM) - EDTA (1 mM) à pH = 7,4 : Cette solution tampon permet d'avoir un milieu proche physiologiquement des objets biologiques, avec un pH stable autour de 7,4. Ce tampon est souvent utilisé pour l'étude d'ADN par AFM (polymère chargé négativement), et l'EDTA présentant un grand pouvoir de chélation avec les ions divalents comme Mg^{2+}, évite la formation de pont inter- et intra- ADN pouvant gêner son étude comme une molécule isolée.
- Le tampon TNE pour Tris - Na^++Cl^- (100 mM) - EDTA : La présence d'ions monovalent permet de jouer sur l'écrantage des charges de surface des espèces présentent dans le milieu, limitant l'agrégation de particules.
- Le tampon PBS pour Phosphate Buffer Saline à pH = 7,4 : Ce tampon est utilisé dans la purification de nombreux virus, comme AAV. On rajoute parfois des ions divalents Mg^{2+} ou Ca^{2+} (pour stabiliser les virus) à une concentration de 1,5 mM chacun. En l'absence d'ions divalents, la solution tampon sera indiquée PBS^-, PBS^+ dans le cas contraire.
- Le tampon TM pour Tris-Mg^{2+} à pH = 7,4 : Le pouvoir tampon du Tris permet une grande stabilité du pH quasi neutre de la solution. Faire varier la concentration en ions divalents Mg^{2+} nous donne accès à un moyen pour moduler de nombreux paramètres (stabilité des édifices protéiques comme les capsides virales, étendue des brins d'ADN, …) que nous verrons par la suite. La concentration

[1] La concentration en particules virales est très difficile à obtenir biologiquement. Il s'agit en réalité de la concentration en génome viral par mL (vg/mL) obtenue par la technique de la qPCR. La concentration en capside peut alors être légèrement plus importante puisque certaines peuvent être vides.

en Mg^{2+} peut varier en fonction de la solution utilisée. En l'absence d'indication particulière, elle est de 5 mM.

- Le tampon Acide Citrique / Na_2HPO_4 que j'appellerai par la suite Tampon* : selon la concentration en Acide Citrique et Na_2HP_4, il est possible de parcourir un large éventail de pH, allant de 2,6 à 7,6 tout en préservant une certaine stabilité de l'acidité (dans notre cas) devant de légères dilutions (les concentrations en acide citrique et en Na2HPO4 sont autour de quelques mM).
- D'autres solutions tampons de dilution ont pu être utilisées lors de différentes expériences mais n'ont pas été utilisées pour les expériences d'AFM. Leurs natures seront explicitées lorsque nécessaire.

3. Dépôt sur surface

Pour pouvoir observer par AFM les virus et le résultat de leurs déstabilisations, ils doivent ensuite être déposés en assez grand nombre, sur une surface propre où la rugosité est nettement inférieure à la taille des objets nous voulons observer. Les particules virales ont des hauteurs de plusieurs dizaines de nanomètres, cependant, l'ADN dont la hauteur n'excède pas 2 nm (1 nm pour le simple brin) nous oblige à avoir une rugosité de quelques centaines de picomètres maximums.

Plusieurs surfaces sont utilisées dans les différentes études d'objets biologiques exploitant l'imagerie AFM. On peut citer le verre (Kellmann et al. 2001), le graphène de type HOPG (*Highly Ordered Pyrolitic Graphite*) (Liashkovich et al. 2008) ou encore l'or (Knez et al. 2004). Nous avons préféré utiliser le mica pour son faible coût, sa facilité d'utilisation et sa très faible rugosité. Cependant, il nous a été amené de traiter, fonctionnaliser ou ioniser le mica pour optimiser l'adsorption des particules et/ou de l'ADN sur la surface.

Je présente dans cette partie les différentes surfaces utilisées à commencer par le mica.

a. La surface de mica

Le mica utilisé est un mica blanc dit muscovite de la marque (SPI - Grade V - 1). Ce cristal, de formule $K^+Al_2^{6+}[(OH)_2|\ AlSi_3O_{10}]^{7-}$, se présente en une superposition de feuillets hexagonaux (figure 2.11.a).

Ces couches interagissent très faiblement entre-elles et peuvent facilement être clivées. La surface supérieure est alors quasiment plane à l'échelle de l'atome.

Pour obtenir une surface de mica présentant une rugosité proche de l'atome, la manipulation reste simple (figure 2.11.b) : Après avoir collé un disque de scotch noir double face sur une rondelle métallique, une lamelle de mica est collée. La surface libre et sale est alors recouverte de ruban adhésif transparent. Les poussières se trouvent emprisonnées entre le mica et le scotch. En maintenant le disque de métal et en tirant sur le ruban adhésif blanc, on enlève les premiers plans supérieurs du mica au niveau d'un plan fragile. La surface sur le disque métallique est alors parfaitement propre (figures 2.11.c et 2.11.d) et de rugosité atomique puisque clivée selon un plan du cristal.

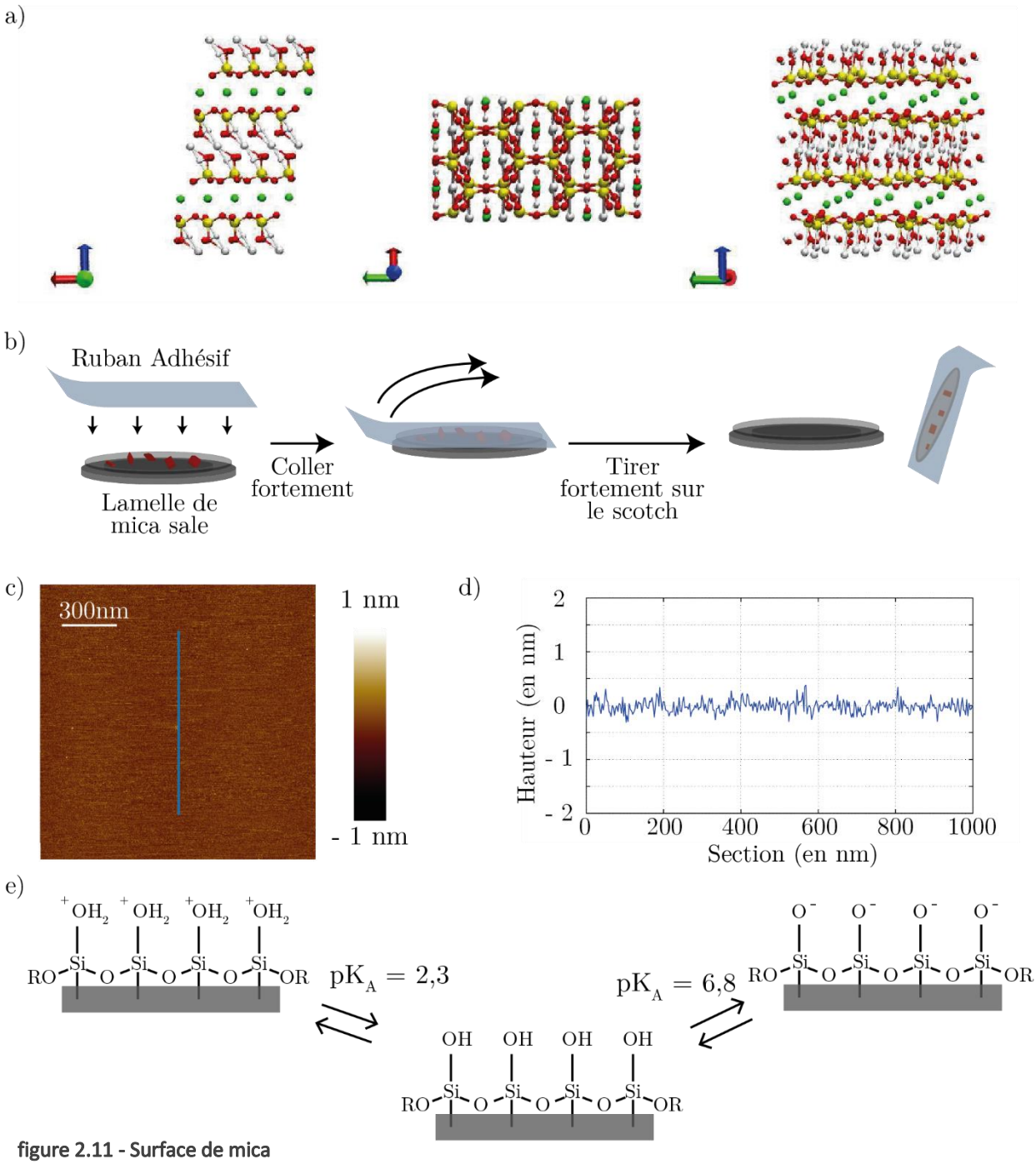


figure 2.11 - Surface de mica

a) Structure du cristal Mica. En vert, les atomes de potassium, en rouge, les atomes d'oxygène et en jaune les atomes de silicium. Les structures silanolates tétraédriques s'organisent en feuillets hexagonaux séparés par des ions potassiums qui constituent les plans fragiles du mica.

b) Protocole de clivage du mica. Une lamelle de mica est collée sur une rondelle de métal par du scotch double face. La surface supérieure est sale : une opération de clivage est donc nécessaire pour obtenir une surface dont la rugosité est très faible. Pour cela, une bande de scotch est appliquée sur la face supérieure du mica. On l'arrache en tirant fortement sur le ruban adhésif, clivant ainsi le mica. La nouvelle face supérieure est ainsi propre et présente une rugosité atomique.

c) Image obtenue par AFM en *mode tapping* dans l'air d'une surface de mica.

d) La section obtenue sur l'image précédente donne l'ordre de grandeur de la rugosité de la surface (dans les limites de résolution du microscope à force atomique de l'ordre de l'ångström).

e) Evolution de la charge en surface du mica en fonction du pH du milieu se trouvant au-dessus. Dans l'air, une fine couche d'eau se crée sur le mica, donnant une charge négative à la surface.

Des travaux sur du gel de silice (Scott & Traiman 1980) puis sur des lames de silices (Bouhacina et al. 2000; Nony et al. 2002) ont montré que du fait de la présence d'humidité dans l'air et du caractère fortement hydrophile du mica, une couche d'eau se crée naturellement, donnant une charge négative à la surface. Mais selon le milieu se trouvant au-dessus du mica, cette charge peut être amenée à changer. En effet, à la surface se trouvent des groupes siloxy ayant deux pKa distincts (figure 2.11.e). A pH > 6,8, la surface est globalement négative, à pH compris entre 2,3 et 6,8, la surface est neutre tandis qu'à pH < 2,3, la surface est globalement positive.

b. Le mica fonctionnalisé

Fonctionnalisation avec Poly-L-lysine

La Polylysine, ou plus précisément la Poly-L-lysine, est un polymère formé d'une succession de Lysines de formule $C_6H_{14}N_2O_2$ et dont la charge homogène positive assure une meilleure accroche des particules grâce à de fortes interactions électrostatiques (figure 2.12.a).

La fonctionnalisation du mica par la Poly-L-lysine se fait selon un protocole simple (Faivre-Moskalenko et al. 2014) (figure 2.12.b) : Après avoir nettoyé le mica, on dépose une goutte de 10µL de Poly-L-lysine. L'affinité du mica, cristal très hydrophile, avec le polymère dilué dans l'eau, facilite l'étalement de la goutte. Après 30 secondes de dépôt, le polymère forme une couche fine et homogène. L'excédent est enlevé

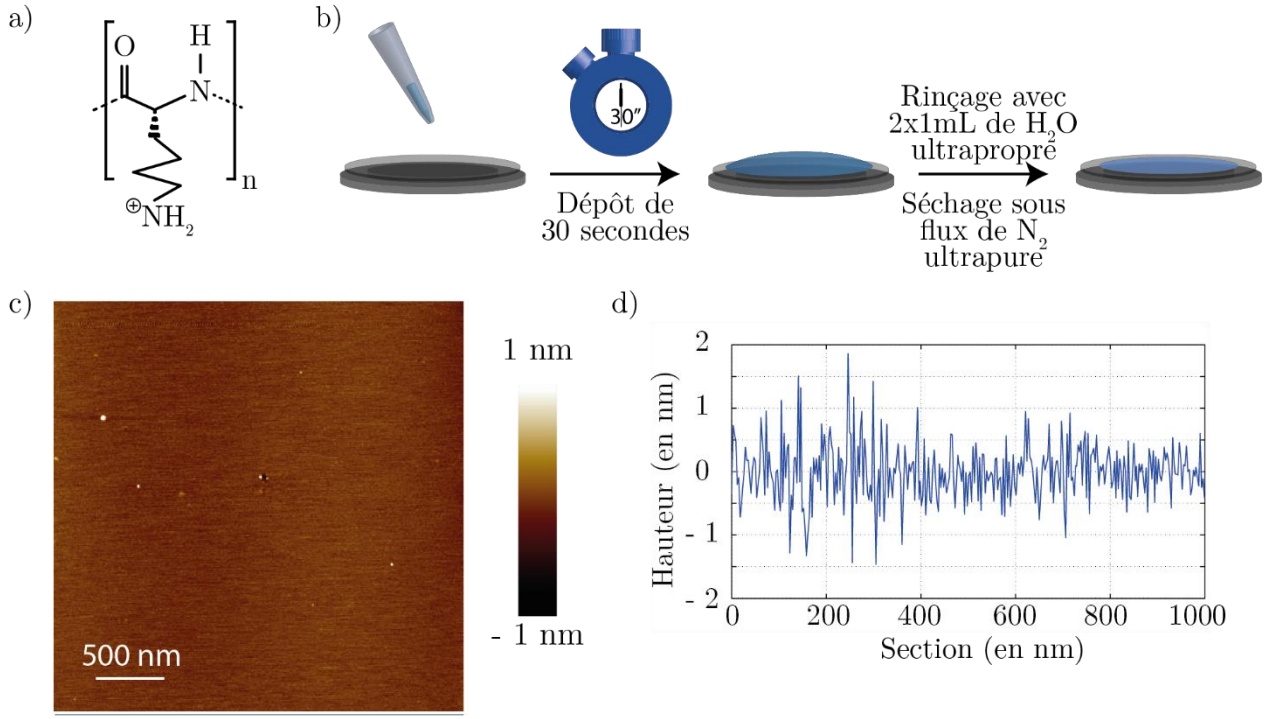


figure 2.12 - Surface de Mica fonctionnalisée avec la Poly-L-Lysine
a) Représentation chimique de Cram du polymère Poly-L-lysine.
b) Protocole de fonctionnalisation du mica par la Poly-L-lysine. Une goutte de 10µL de Poly-L-lysine est déposée sur le mica fraichement clivé selon le protocole précédent (figure 2.11). Après 30 secondes à température ambiante, deux rinçages avec 1mL d'eau ultrapure enlèvent l'excédent. On sèche sous flux de diazote pour obtenir une lamelle de mica fonctionnalisée avec la Poly-L-lysine.
c) Image obtenue par AFM (*Tapping Mode*) dans l'air d'une surface de mica fonctionnalisée par la Poly-L-lysine.
d) Section obtenue sur une lamelle de mica. La rugosité du mica (figure 2.11.d) a augmenté à cause de la présence du polymère.

par deux lavages à l'eau ultrapure (eau filtrée - système milliQ®) (2 x 1mL). La lame de mica fonctionnalisé est ensuite séchée par un flux d'azote ultrapur (Air Liquid, Azote U).

La poly-L-lysine permet d'inverser la charge de la surface au dépend cependant de la faible rugosité du mica puisque la rugosité atteint dans ce cas le nanomètre (figure 2.12.c).

Fonctionnalisation avec des fonctions silanes

Une autre fonctionnalisation de la lamelle de mica a été réalisée : l'ajout d'une couche de silanes sur la surface supérieure du mica. Le protocole, conduit en phase gazeuse, permet l'obtention d'une monocouche de silane hydrophobe et chargée positivement permettant une adsorption électrostatique des particules et des brins d'ADN. Cette fonctionnalisation est souvent utilisée en microscopie à force atomique pour l'étude de l'ADN car la projection sur la surface laisse, malgré son efficacité, le polymère dans une configuration peu éloignée de son état en 3D.

Le dérivé silane utilisé dans l'étude est l'APTES (pour le 3-Aminopropyltriethoxysilane). Le protocole de dépôt reste complexe et ne conduit malheureusement pas systématiquement à une monocouche de mica silanisé mais à la formation d'agrégats par polymérisation des silanes entre eux. De plus, ce dépôt est peu stable à l'humidité, complexifiant le travail lors des expériences en liquide et demandant des conditions de stockage particulier (enceinte anhydre, peu de lumière…).

Nous avons donc au final peu utilisé cette méthode de fonctionnalisation pour la visualisation par AFM des virus.

c. Protocoles de dépôt

Chaque virus, chaque brin d'ADN, selon leurs natures, présentent une affinité propre avec le mica, qu'il soit fonctionnalisé ou non. Nous avons dû adapter chacun des protocoles de dépôt en fonction de la rugosité maximale de la surface que nous souhaitions obtenir mais aussi de la concentration en objets adsorbés sur la surface, ni trop basse pour observer assez d'objets ni trop élevée pour les isoler et les étudier un à un. Nous avons ainsi joué sur la charge du mica mais aussi sur la composition du tampon et en particulier la présence ou non d'ions divalent en solution.

Dépôt des VLP et des cores du VIH-1

Nous utilisons une surface de mica fonctionnalisé avec de la L-Poly-L-lysine selon le protocole présenté précédemment (Chap. 2.II.3.b).

Le protocole de dépôt ne dépend que de la nature (capside ou VLP) et non du mutant considéré ni de l'environnement de l'échantillon précédent le dépôt (figure 2.13.a) : 5µL de l'échantillon sont déposés sur le mica fonctionnalisé. Deux mécanismes physiques interviennent lors de l'adhésion : tout d'abord la diffusion des particules en direction du mica (plus ou moins rapide selon leurs charges en surface, leurs formes et surtout leurs dimensions) et l'adsorption des particules sur le mica. Le temps de dépôt est adapté à la concentration surfacique obtenue : il est de 2 minutes pour les VLP et de 15 minutes pour les cores viraux. L'excédent est enlevé grâce à un lavage à l'eau ultrapure (1 mL). L'échantillon est ensuite séché par un flux de N_2 ultrapur. Les échantillons ainsi préparés sont ensuite placés dans un dessiccateur à humidité contrôlée (20%) jusqu'à

utilisation (figure 2.13.b) et peuvent être conservé sans une évolution importante de la surface pendant une semaine maximum avant d'être observés par AFM dans l'air.

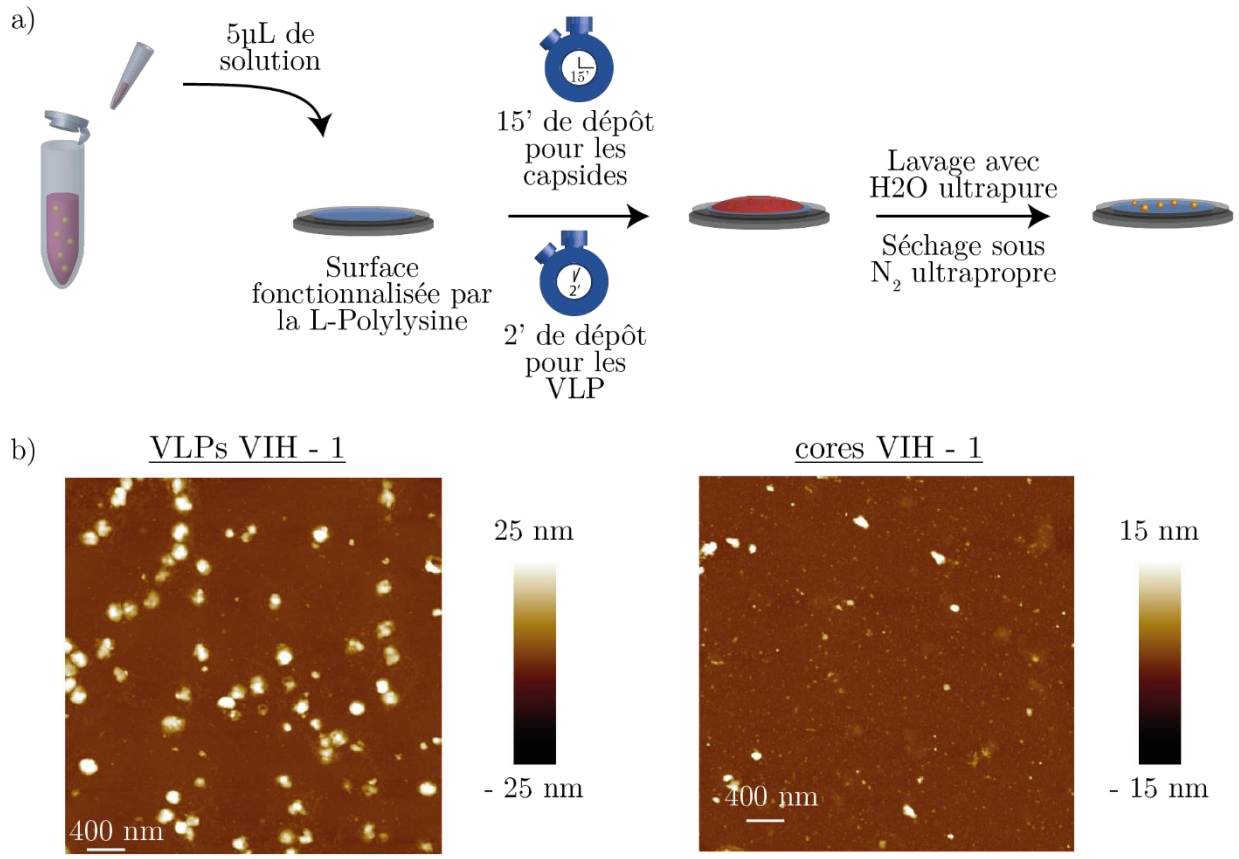


figure 2.13 - Protocole de dépôt VIH-1
a) Protocole de dépôt des VLP et des cores du VIH-1. Après avoir préparé une surface de mica fonctionnalisé par la L-Poly-L-lysine, une goutte de 5µL de la purification y est déposée. Après une durée de 15 minutes pour les cores et de 2 minutes pour les VLP, un lavage à l'eau (1 mL d'eau ultrapure) permet d'enlever l'excédent n'ayant pas été adsorbé. Un séchage au diazote ultrapur est alors réalisé.
b) A gauche, image AFM d'un dépôt de VLP p8.2 sur mica fonctionnalisé. A droite, image AFM d'un dépôt de cores p8.2 (imagerie réalisée avec le *Peak Force Mode*).

Dépôt des capsides AAV

Nous utilisons une surface de mica fraichement clivé, ceci pour permettre une parfaite visualisation des brins d'ADN s'il y a déstabilisation par exemple.

Lorsque l'on souhaite observer différents sérotypes à l'équilibre (température ambiante ou à 4°C), 5µL de l'échantillon sont déposés sur le mica clivé. Les particules sont adsorbées sur la surface pendant 5 minutes. Un lavage avec 1 mL d'eau ultrapure est effectué puis un séchage au N_2 ultrapur. L'échantillon est ensuite placé dans une boite à faible humidité jusqu'à utilisation (une semaine maximum) (figure 2.14.a).

Le protocole ne dépend pas du sérotype considéré mais peut varier selon le type d'expériences envisagées. Nous observons ainsi sur l'image la présence des capsides AAV en fonction de leurs sérotypes. (figure 2.14.b)

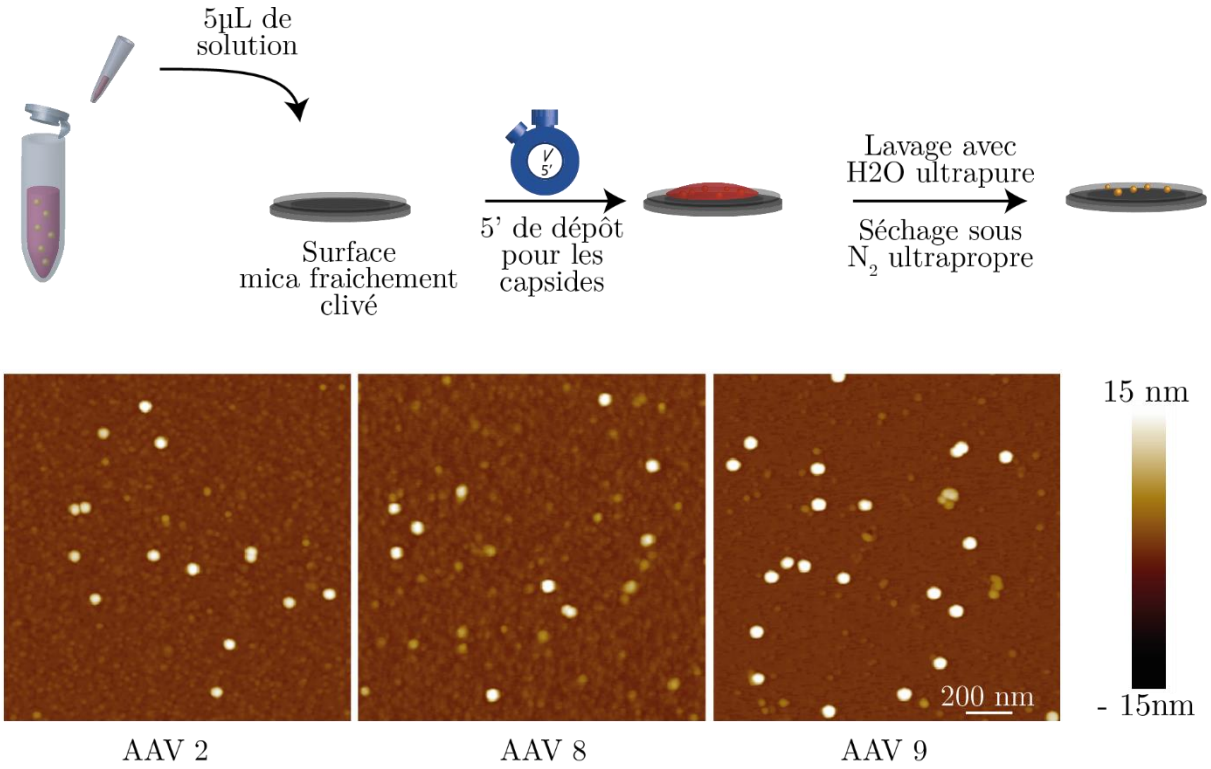


figure 2.14 – Dépôt et images AFM d'AAV sur mica clivé.
a) Protocole de dépôt de AAV. On prélève de l'échantillon 5 µL de solution que l'on dépose sur une surface mica fraichement clivée. Après 5 minutes, la surface est lavée avec 1 mL d'eau ultrapure pour enlever l'excédent. Un séchage sous un flux de diazote permet ensuite d'imager la surface où se trouvent les virus.
b) Images de différents sérotypes de capsides AAV sur une surface de mica fraichement clivé (Tapping Mode dans l'air) : AAV2 (à gauche), AAV8 (au milieu), AAV9 (à droite) contenant chacun un génome ADN simple brin.

4. Déstabilisation

L'une des approches de la thèse pour étudier d'un point de vue physique certains virus est l'étude de leur stabilité dans différents microenvironnements.

Mais la notion de stabilité reste difficile à appréhender : plusieurs paramètres physiques peuvent influencer la stabilité de la structure protéique. On peut ainsi citer comme exemple la température ou encore l'utilisation de certaines protéases (protéines brisant les liaisons peptidiques d'autres protéines) (Bauer et al. 2013).

Nous avons dans notre cas privilégié l'effet de la température pour mesurer la stabilité, c'est-à-dire un virus est stable dans un milieu à une certaine température T équivaudra à ce que sa forme (ensemble {particule intacte + génome à l'intérieur de la particule}) se conserve à cette température T. Cette approche mettant en jeu un paramètre plus physique que biologique a été utilisée dans certains travaux de virologie sur AAV pour observer la libération de l'ADN viral (Horowitz et al. 2013).

Nous avons ainsi comparé :

- La stabilité de différents mutants du VIH.
- La stabilité des cores du VIH en présence/absence de drogues bloquant l'activité de la rétrotranscriptase.

- La stabilité de différents sérotypes d'AAV (AAV2, AAV8 et AAV9).
- La stabilité de capsides AAV ayant des génomes de longueur et de natures différentes (ADN simple brin plus ou moins long, ADN double brin…).
- La stabilité d'AAV dans des milieux à différents pH.

Les virus AAV et VIH, comme nous avons pu le voir dans la première partie, possèdent des cycles et des structures complètement différentes. Nous avons donc mis en place des protocoles qui, bien que suivant le même scénario général, s'adapte au type du virus et aux questions posées.

a. Stabilité du core du rétrovirus VIH-1

Lors de cette expérience, nous avons voulu voir si l'étape de décapsidation pouvait être reliée physiquement à l'étape de retrotranscription, traduisant l'ADN viral à partir de l'ARN viral.

Notre idée a été de mimer *in vitro* cette étape en initiant la retrotranscription par chauffage. En comparant le comportement des cores p8.2, Q151N (donc l'activité de la rétrotranscriptase est fortement diminuée) et Q151N en présence de Névirapine et d'AZT (drogues inhibant la rétrotranscription), dans un milieu à 37°C, nous avons essayé d'établir un lien entre la stabilité de la particule et l'étape de rétrotranscription. Cette dernière ayant montré une non-instantanéité, nous avons préféré faire varier le paramètre temps plutôt que la température. Qui plus est, une température trop élevée pourrait rendre inefficace l'activité enzymatique de la rétrotranscriptase.

Le protocole est le suivant (figure 2.15.a) : après avoir prélevé 10 µL de cores en solution dans du TNE et les avoir déposés dans un eppendorf adapté, l'échantillon est chauffé dans un chauffe-eppendorf à 37°C pendant une durée t (allant de 15 minutes à 2 heures). Pour couper la cinétique, une trempe thermique est réalisée dans un bain de glace pilée passant la température de 37°C à environ 2°C (figure 2.15.a). Les échantillons chauffés sont ensuite déposés sur une surface de mica fonctionnalisé avec de la Poly-L-lysine pendant 15 minutes. La réalisation d'images AFM de la surface nous permet alors de séparer les particules intactes des particules déstabilisées (figures 2.15.b et 2.15.c).

Ce protocole a été légèrement modifié dans certaines expériences pour étudier l'effet de certains ions (Mg^{2+}) par exemple sur la rétrotranscription. Nous rajoutons un volume de solution d'ions Mg^{2+} pour atteindre la concentration finale de 5mM en Mg^{2+}.

L'étape de rétrotranscription nécessite la présence de dNTPs, les quatre desoxyribonucléotides (dCTP, dATP, dGTP et dTTP), pour former l'ADN viral. Initialement présents dans le résultat des purifications en faible concentration, nous avons également voulu tester l'effet de la concentration en dNTPs en l'amenant à 25µM.

b. Stabilité de la capside AAV

L'étape de libération du génome viral et donc la déstabilisation de la capside semble importante dans l'infectiosité du virus. En utilisant, à nouveau, le paramètre température nous avons voulu quantifier cette stabilité et ainsi comparer physiquement la stabilité de plusieurs sérotypes, ou des capsides ayant des types de génomes différents (en nature – ssADN et scADN – et/ou en longueur).

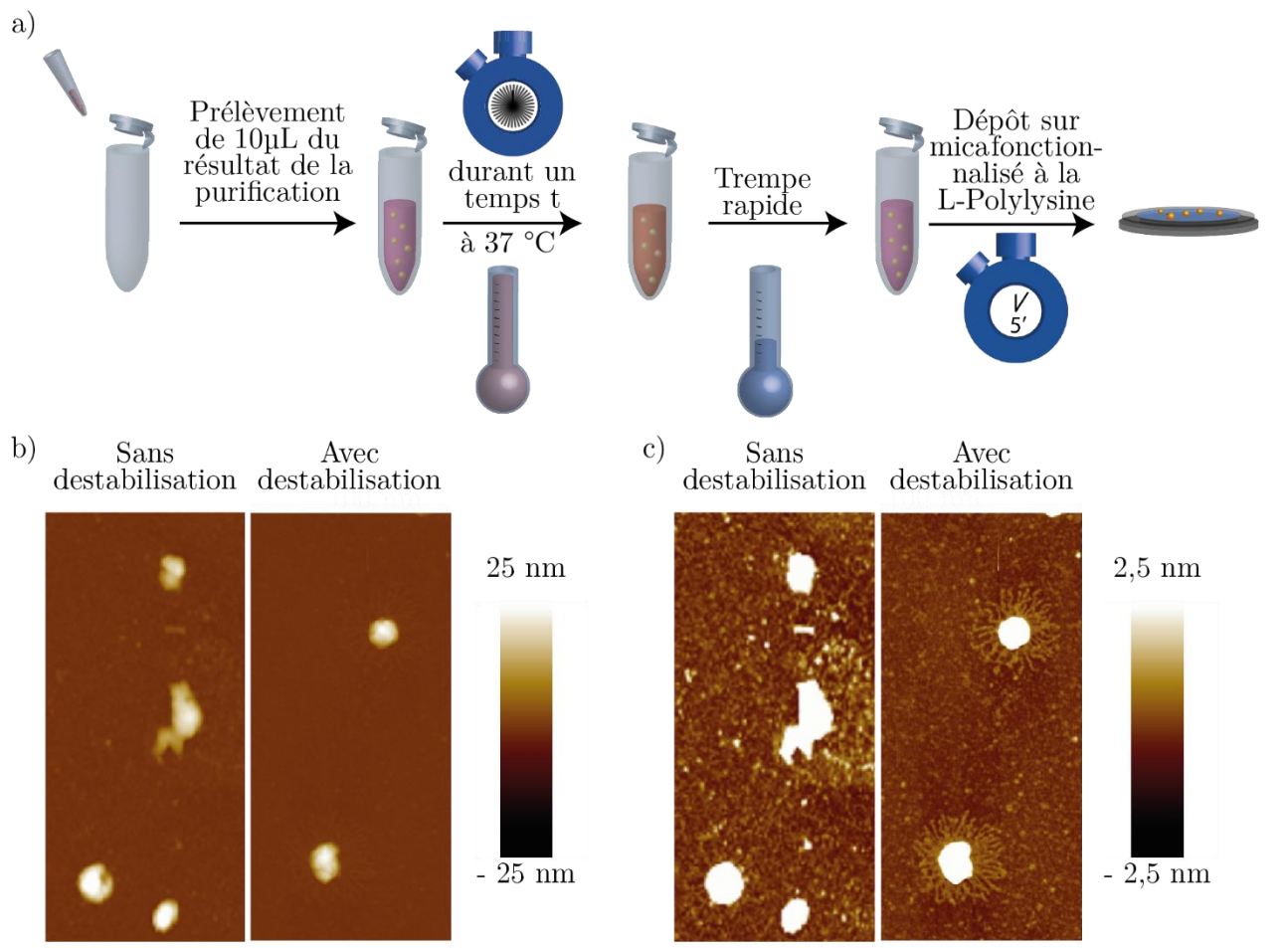


figure 2.15 - Déstabilisation des cores du VIH-1
a) Protocole de déstabilisation des cores du VIH-1. Pour initier la retrotranscription de l'ARN du VIH-1, on prélève 10 µL de la purification et on chauffe durant un temps t (15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 heure ou 2 heures) à 37°C suivi d'une trempe thermique à 4°C pour stopper la cinétique.
b) Cores déstabilisés dans un tampon TNE à 37°C pendant 2 heures. Imagerie dans l'air par AFM (mode *PeakForce HR*). Echelle haute (entre 25 nm et -25 nm pour voir les particules entières).
c) Même image que 2.b) sauf l'échelle. Echelle basse (entre -2,5 nm et 2,5 nm pour voir les filaments sortis du core et collés sur la surface).

Le protocole est le suivant (figure 2.16.a) : La solution de capsides AAV (défini par son sérotype et le vecteur à l'intérieur) est dilué 5 à 10 fois dans une solution tampon (nous avons principalement utilisé le PBS^+ mais le TE et le TM ont également été utilisés. Dans ce cas, le tampon utilisé sera précisé). L'échantillon est ensuite mis à chauffer pendant un temps t (allant de 5 minutes à 2 heures) à une température T (allant de la température ambiante (TA) autour de 23°C à 80°C). Une trempe en concentration en diluant par 2 fois la solution avec de l'eau pure puis en température en plongeant l'eppendorf dans la glace est ensuite effectuée. Par ajout d'une solution de dichlorure de magnésium, la concentration de la solution en Mg^{2+} est amené à 5 mM pour faciliter l'adsorption de l'ADN éjecté sur le mica nu. Finalement, on dépose directement sur une lame de mica fraichement clivé le résultat de la déstabilisation.

Nous aurions pu ajouter Mg^{2+} dès la première étape du protocole. Cependant, il est apparu qu'une forte concentration en ions divalents augmentait la formation d'agrégats de particules ce qui limite

l'observation de particules isolées. Comme nous le verrons par la suite, les capsides AAV en présence de Mg^{2+} sont également plus stables, ce qui perturbe l'étude de la déstabilisation dans ce cas.

En visualisant la surface de mica où a été déposé le résultat de l'expérience de chauffage, nous avons été capable de discerner les particules ayant libérés leur génome (figures 2.16.b et 2.16.c) et de déterminer la température de déstabilisation des capsides AAV.

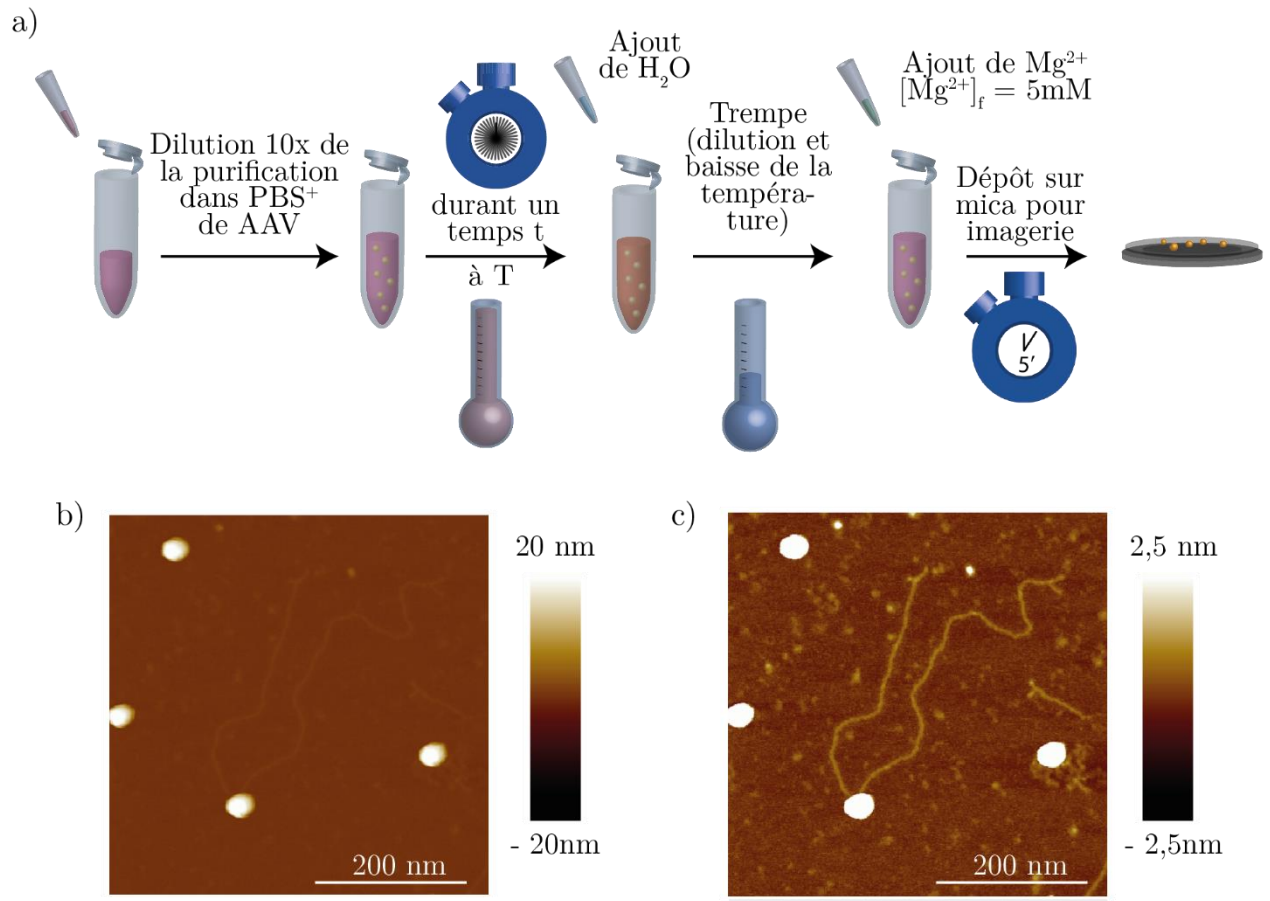


figure 2.16 - Déstabilisation d'AAV
a) Protocole de déstabilisation des capsides AAV. Pour étudier la stabilité thermique des capsides AAV, on dilue 10 fois la purification dans une solution tampon PBS^+. On chauffe à une température T (de TA=23°C à 80°C) pendant une durée t (de 5 minutes à 2 heures). La cinétique est ensuite stoppée avec une trempe en concentration à l'eau puis par trempe thermique dans la glace. Avant de déposer le résultat, on ajoute des ions magnésium jusqu'à une concentration de 5mM.
b) Vecteur AAV8 déstabilisé après avoir été chauffé dans un tampon TE à 70°C pendant 15 minutes. Imagerie dans l'air par l'AFM (mode *PeakForce HR*). Echelle haute (entre 20 nm et -20 nm pour voir la particule en entier).
c) Même image que 2.b). Echelle basse (entre -2,5 nm et 2,5 nm pour voir l'ADN sorti de la capside et collé sur la surface).

c. Stabilité de la capside du vecteur AAV en fonction du pH de la solution tampon

Comme nous l'avons vu (Chap. 1.IV.3), au cours de son cycle viral, la particule AAV subit une variation du pH dans son microenvironnement. Nous avons voulu savoir si sa stabilité en température était

modifiée par ce changement du microenvironnement. Nous avons alors réalisé un protocole quasiment similaire au précédent en utilisant d'autres tampons. Cependant, les difficultés d'imagerie nous ont amené à changer quelques étapes (figure 2.17.b et 2.17.c). Cette étude repose uniquement sur le vecteur AAV8 contenant un génome ssADN (noté ssAAV8). 1µL de la purification de ssAAV8 est dilué dans 10µL de solution Tampon* (à pH = 5 ou pH = 7) et on laisse l'échantillon incuber pendant 15 minutes. L'échantillon est ensuite chauffé pendant un temps t à une température T (allant de 23°C à 80°). Nous nous sommes limités dans cette

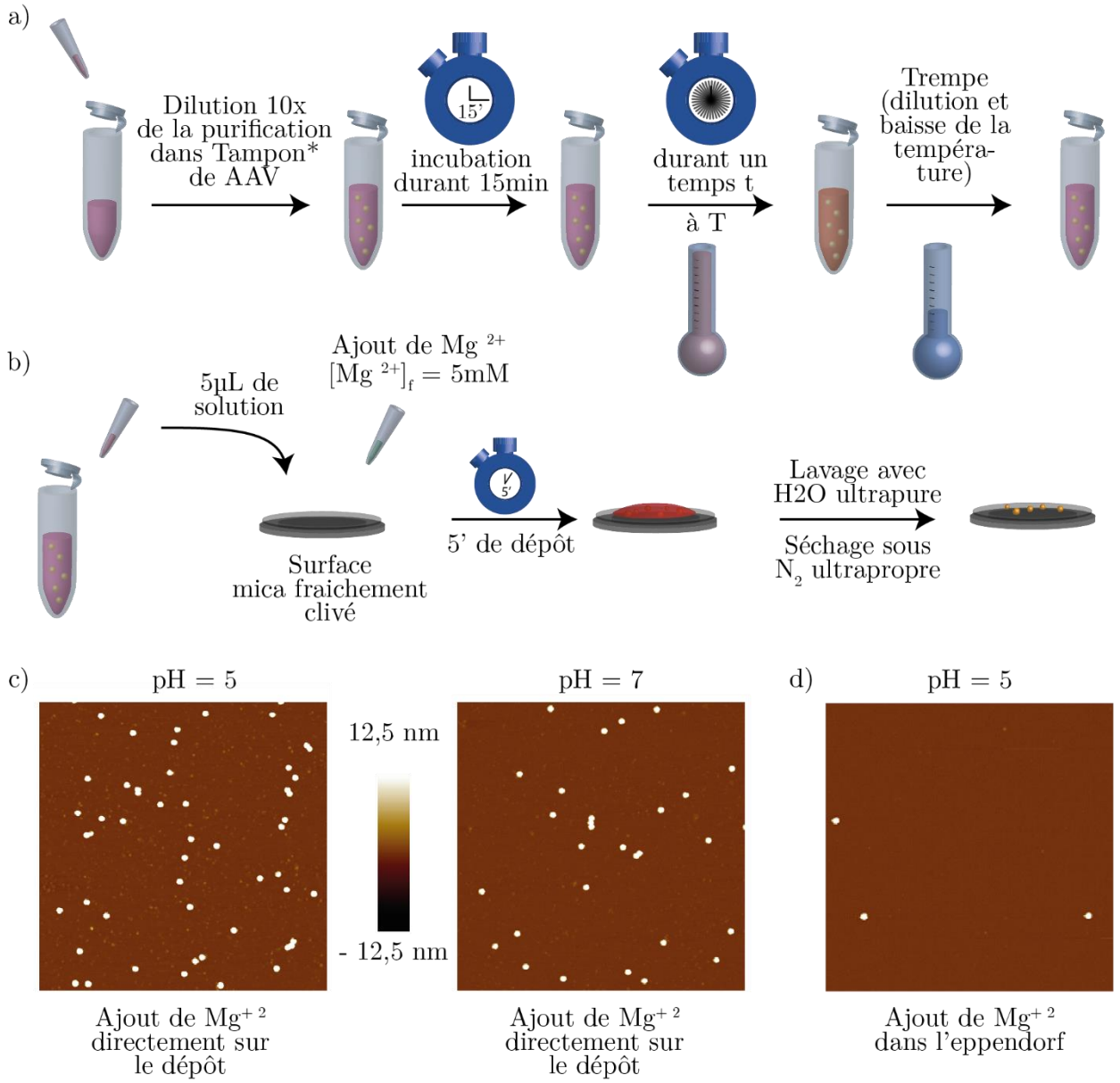


figure 2.17 – Déstabilisation de ssAAV8 dans le Tampon* à pH variable

a) Protocole de déstabilisation de AAV8ss dans le Tampon*. On suit les mêmes étapes du protocole de déstabilisation d'AAV sauf les ions Mg2+ qui ne sont pas ajoutés dans l'eppendorf.

b) Protocole de dépôt sur mica fraichement clivé du résultat de l'expérience, les ions magnésiums sont ajoutés juste après le dépôt sur la lame de mica. Le protocole est ensuite le même que précédemment décrit (figure 2.16).

c) Image AFM des dépôts de ssAAV8 sur mica fraichement clivé après une incubation de 15' dans la solution tampon à pH = 5 (à gauche) et pH = 7 (à droite) mais sans aucun chauffage (t = 0s).

d) Image AFM d'un dépôt de ssAAV8 sur mica fraichement clivé après une incubation de 15' dans la solution à pH = 5 sans chauffage avec ajout de Mg2+ dans l'eppendorf avant de déposer sur le mica la goutte d'échantillon.

étude au paramètre température, donc le temps t a été fixé à 15 minutes. Il subit ensuite une trempe en température dans un bain de glace autour de 2°C.

Pour l'étude de l'effet du pH sur les capsides AAV8, la présence d'ions Mg^{2+} facilite fortement la formation d'agrégats minimisant le nombre de particules isolées sur la surface comme décrite dans le chapitre IV et figure 2.17.d. J'ai donc privilégié un protocole particulier en n'ajoutant les ions Mg^{2+} qu'après avoir déposé la goutte d'échantillons sur la surface de mica. Ainsi, 5µL de la solution sont ensuite déposés sur une lamelle de mica fraichement clivé. La concentration en ions Mg^{2+} est amenée à 5 mM directement sur le dépôt suivi par 5 minutes d'incubation puis de rinçage et de séchage habituel.

III. Imagerie et traitement de l'image

Maintenant que les virus ont été déposés sur une surface suffisamment plane, la réalisation d'images par AFM nécessite la mise en place d'un protocole qui dépend de la nature des objets étudiés et des conditions de l'expérience réalisée.

1. Obtention des images

Les protocoles d'obtention des images vont dépendre de nombreux paramètres comme le choix du levier (raideur, rayon de la pointe, …) et son contrôle ou encore le milieu dans lequel nous étudions les virus (dans l'air ou dans une solution tampon).

Les images obtenues sont des cartes d'iso-interactions. Chaque pixel, défini par sa position en x et en y, est associé à une valeur en z, correspondant à la déflexion de la pointe sous l'effet de l'interaction avec la surface, ce qui revient approximativement à la hauteur. Nous utiliserons par la suite, de manière abusive, le nom de hauteur.

Une image est alors définie par deux dimensions, la largeur et la longueur (en µm), la résolution (nombre de pixels la constituant), la valeur de la hauteur pour chaque pixel (en nm) ce qui correspond à une matrice en z. La représentation de cette matrice est une image associée à une échelle reliant la couleur de chaque pixel à la hauteur mesurée.

Nous avons utilisé deux types d'imagerie : l'imagerie dans l'air et l'imagerie en liquide.

Réaliser une image dans l'air est plus rapide que dans un liquide ce qui permet de limiter l'effet de la dérive sur l'image (déformation des objets observés) et d'obtenir une statistique plus importante. Nous avons donc privilégié l'imagerie dans l'air pour les études morphologiques. De plus, l'observation des brins d'ADN par AFM reste plus facile dans l'air qu'en liquide. Les résultats de la déstabilisation des virus ont donc été visualisés dans l'air.

Si on comprend bien que le liquide environnant va avoir un effet limité sur la morphologie des capsides ou la longueur d'ADN mesurée, on s'attend à ce que le milieu environnant (air ou liquide) ait une forte influence sur la réponse mécanique. C'est pourquoi les mesures mécaniques ont, elles, été réalisées en milieu liquide.

a. Imagerie dans l'air

Les échantillons préparés sont placés sur le disque prévu à cet effet (figure 2.2). Le levier sur son support est placé au-dessus, grâce à la tête de l'AFM, pointe en direction de la surface. Avant de lancer le balayage, le laser doit être réfléchi au bon endroit par le levier (pour pouvoir mesurer sa déflexion) et être dirigé sur la photodiode. Pour cela, on règle la *Sum* au maximum, pour maximiser la sensibilité, et la verticale et l'horizontale à zéro, pour centrer sur la diode à quatre quadrants, le spot du laser. Sous l'action d'un cristal piézoélectrique, le levier va être mis en oscillation que l'on soit en *Peak Force Mode* ou en *Tapping Mode*.

Nous avons, dans la grande majorité des cas, réalisé une image via le mode *Peak Force* plus précisément le *Peak Force High Rate*. Le micro-levier utilisé présente une géométrie particulière permettant de le faire osciller à une grande fréquence (8 kHz) pour augmenter la vitesse d'imagerie : une image de 512x512 points de 3µm de côté nécessite alors environ deux minutes pour être créée. La raideur nominale du levier est de 0,4 N/m pour une fréquence nominale de résonance de 130 kHz. La dimension du rayon de l'extrémité de la pointe va de 2 à 12 nm. (figure 2.18.a)

Lors de la réalisation d'images dans l'air, le levier est maintenu par le support spécialement conçu pour le *Peak Force HR*. Son cristal piézoélectrique oscille à 8 kHz avec une amplitude de 100 nm (le *Peak Force trigger*). La force d'appui n'excède pas les 200pN et le gain oscille entre 20 et 40 selon la dimension de l'image.

Nous avons également été amenés, au début de ma thèse, à utiliser le *mode Tapping* car le *mode Peak Force HR* n'était pas encore disponible. Deux types de leviers ont été utilisés : tout d'abord les leviers MPP11100 (figure 2.18.b). Leur raideur nominale est de 40 N/m pour une fréquence nominale de résonance

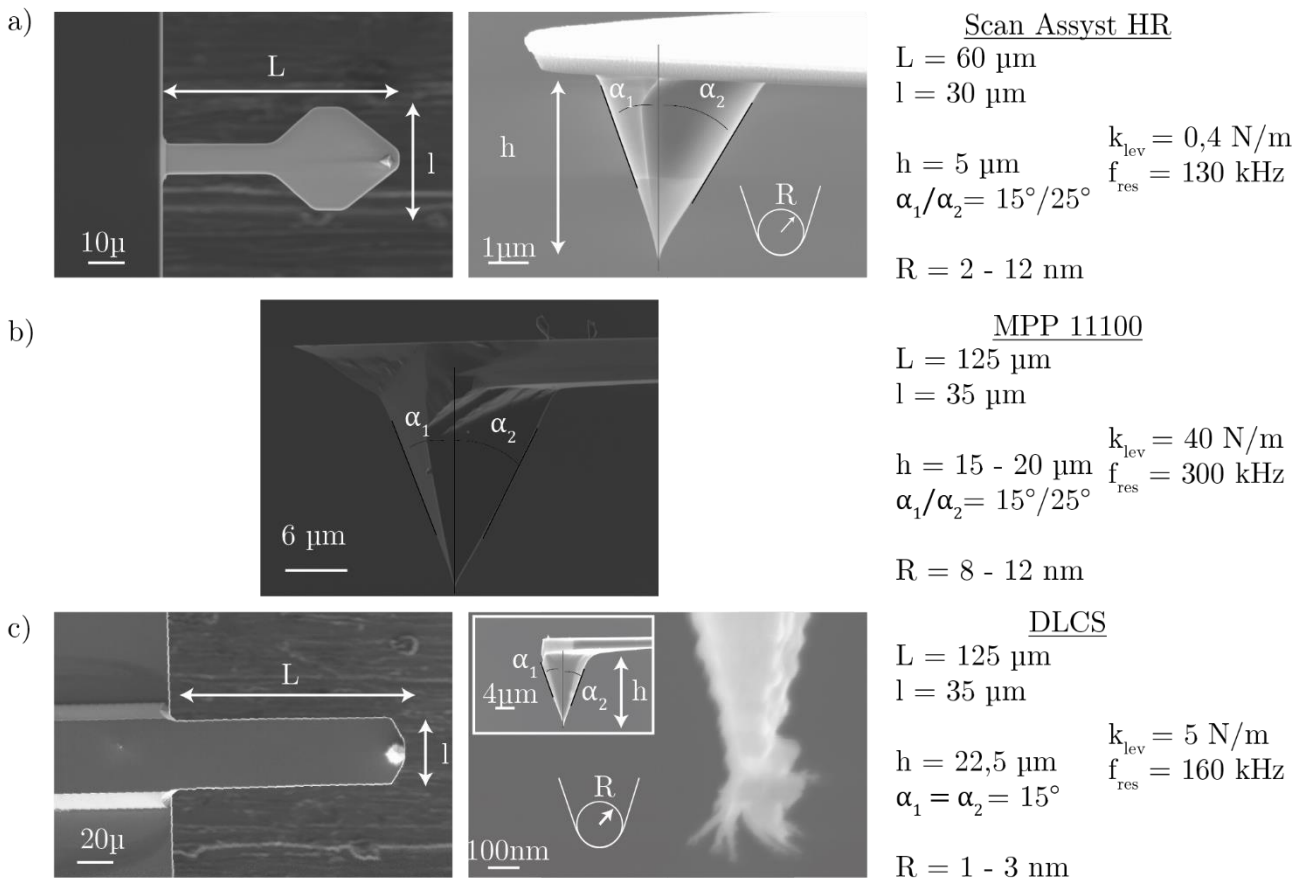


figure 2.18 - Pointes utilisées pour l'imagerie dans l'air

a) Images par microscopie électronique à balayage du levier *Scan Assyst HR*. Les paramètres géométriques sont décrits sur la droite. Ce levier permet de réaliser des images en mode Peak Force à haute résolution (faible convolution) à une très grande vitesse (autour de 2 minutes pour réaliser une image de 3µm de côté).

b) Image par microscopie électronique à balayage du levier MPP11100. Ce levier est utilisé pour de l'imagerie en mode Tapping. Cette pointe s'abime peu au cours de son utilisation.

c) Images par microscopie électronique à balayage du levier DLCS. Grâce aux pics secondaires de très faible rayon, cette pointe améliore fortement la résolution, ce qui entraine en contrepartie la possibilité d'avoir deux ou plusieurs pics touchant la surface : les motifs seront multipliés.

Ces images de microscopie électronique ont été réalisées par Justine Laurent au laboratoire de Physique de l'Eco NS de Lyon.

de 300 kHz. La dimension du rayon de l'extrémité de la pointe se trouve autour de 8 nm Ce large rayon nous a amené à utiliser une pointe spéciale, dite DLCS, qui possède, à son extrémité des dendrites de 2 nm augmentant la précision des images. Les propriétés mécaniques du levier sont proches des MPP. Mais ces pics ont un rayon à leurs extrémités de l'ordre du nanomètre diminuant ainsi fortement la convolution (figure 2.18.c). En mode *Tapping*, il faut environ un peu moins d'une dizaine de minutes pour réaliser une image carrée de 3µm de côté avec une résolution de 512x512 pixels^2.

Les leviers décrits, lorsqu'ils sont utilisés, sont placés sur le support (*Probe holder MFMA*, Bruker). Son cristal piézoélectrique permet de faire osciller la pointe à une fréquence proche de celle de résonance du levier avec une amplitude libre de déflexion de quelques dizaines de nanomètres maximum.

Nous contrôlons également les propriétés de l'image : son ratio (carré ou rectangulaire), ses dimensions (de la dizaine de nanomètres à quelques micromètres de côté), sa résolution (en pixel x pixel).

Lors des différents résultats exposés dans les chapitres III et IV, les modes, les leviers ainsi que les paramètres utilisés seront explicités.

b. Imagerie en liquide

Comme vu dans le chapitre précédent, le microscope à force atomique rend possible une imagerie dans des conditions normales en température et dans un milieu physiologiquement proche des virus (pH et force ionique). Les différents tampons utilisés ont été décrit précédemment dans le Chap. 2.II.2).

Nous avons utilisé pour toutes les expériences réalisées en liquide le *mode Peak Force*.

Pour l'imagerie en environnement liquide, nous laissons une goutte de tampon, d'environ 70 µL, sur la surface, préalablement préparée. Nous attendons que la température se stabilise dans l'enceinte de l'AFM. Nous utilisons une cellule-support du levier particulier, en verre. Le levier est maintenu par une attache munie d'un ressort sur le support. Dans ce cas, ce n'est pas le support qui occasionne l'oscillation de la pointe mais le cristal piézoélectrique qui maintient le support qui met en mouvement à une fréquence de 2 kHz le levier. Une goutte du tampon est déposée sur le levier, pour éviter de piéger des bulles au niveau des leviers. Le support est ensuite placé dans la tête de l'AFM. En rapprochant le support de la surface, les deux gouttes fusionnent.

Plusieurs leviers (et donc plusieurs pointes) ont été utilisés selon leurs raideurs mais aussi selon la dimension de l'extrémité de la pointe :

- dNPS : Sur chacun des porte-leviers possèdent quatre leviers (deux de part et d'autre) de forme triangulaire avec pour raideurs nominales 0,06 N/m, 0,12 N/m, 0,24 N/m et 0,35 N/m. L'extrémité de leurs pointes fait 10 nm (figure 2.19.a).
- SNL : Identiques aux précédentes en ce qui concerne des raideurs, elles se distinguent par contre par une extrémité de 2 nm et la nature de la pointe en silicium (contrairement aux autres pointes en nitrure de silicium).
- *Scan Assyst Liquid* : levier de forme triangulaire, sa raideur est d'environ 1 N/m. L'extrémité de sa pointe est de 20 nm de rayon (figure 2.19.b).

- *Scan Assyst Liquid +* : de même raideur que le précédent, le phénomène de convolution est néanmoins réduit par une pointe plus fine en son extrémité (2 nm). Sur la figure 2.19.a, la pointe imagée est une *Scan Assyst Fluid +*.

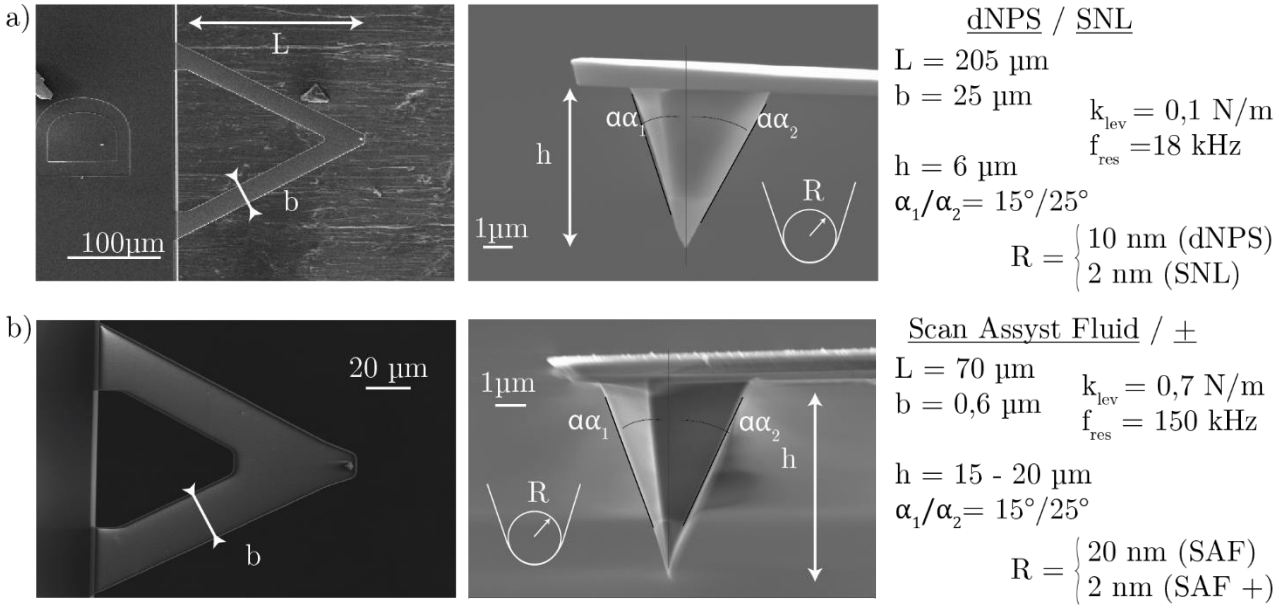


figure 2.19 - Pointes utilisées pour l'imagerie en liquide et pour les expériences de nanoindentation
a) Images par microscopie électronique à balayage du levier SNL. Les paramètres géométriques des leviers dNPS et SNL sont décrits sur la droite. Ces leviers permettent de réaliser des images en mode Peak Force dans un milieu liquide. Ils présentent une raideur faible (0,1 N/m). Les différences entre les dNPS et les SNL sont la nature et la taille de la pointe, la convolution est plus faible pour les SNL.
b) Images par microscopie électronique à balayage du levier *Scan Assyst Fluid +*. Les paramètres géométriques des leviers *Scan Assyst Fluid +* et *Scan Assyst Fluid* sont décrits sur la droite. Ces leviers permettent de réaliser des images en mode Peak Force dans un milieu liquide. Ils présentent une raideur plus forte que les précédents (1 N/m). La différence entre les *Scan Assyst Fluid* et les *Scan Assyst Fluid +* est la taille de la pointe, la convolution est plus faible pour les *Scan Assyst Fluid +* (2 nm).
Ces images de microscopie électronique ont été réalisées par Justine Laurent au laboratoire de Physique de l'ENS de Lyon.

Bien que nous utilisions des leviers différents, les paramètres d'imagerie changent peu, dépendant essentiellement des dimensions de l'image. L'obtention d'une image carrée de 3 µm avec une résolution de 512 pixels par 512 pixels nécessite plus d'une dizaine de minute.

Lors des différents résultats exposés dans les chapitres III et IV, les leviers ainsi que les paramètres utilisés seront explicités.

c. Les problèmes d'imagerie

La réalisation par AFM d'une image de bonne qualité reste difficile car nécessite de privilégier certains paramètres aux dépends d'autres.

Le cristal piézoélectrique sur lequel est placé la surface et qui permet le déplacement horizontal et vertical est contrôlé par des différences de potentiels électriques. La consigne est donc une tension et le résultat

est un déplacement en nanomètre. La connaissance du lien entre la tension soumise et le déplacement obtenu nécessite une calibration. Celle-ci est réalisée grâce à une grille périodique de plots de hauteur, de largeur et de période spatiale connue à l'ångström près. Généralement, ce lien est une simple régression affine entre la tension et le déplacement. Cependant, lorsque les déplacements demandés sont trop grandes, une non-linéarité apparait, s'éloignant de l'intervalle de calibration. Il est donc préférable de se restreindre à des petits déplacements de l'ordre de quelques micromètres pour les cristaux piézoélectriques utilisés au laboratoire.

A cela s'ajoute le fait que le cristal piézoélectrique dérive, c'est-à-dire qu'à température ambiante, le cristal va naturellement se déformer lentement (de quelques nanomètres par minute selon une direction dans le plan horizontal). Si la réalisation d'une image est trop lente, le balayage de la surface par la pointe imposé par l'utilisateur va se coupler avec cette dérive et les objets sur la surface apparaitront déformés selon le déplacement. On pourrait alors penser qu'une augmentation de la résolution est une bonne idée pour permettre de voir des détails des objets biologiques étudiés. Cependant, le temps pour réaliser une image dépend de la résolution : plus la résolution augmente, plus l'effet de la dérive sera visible sur les images, déformant les objets étudiés.

L'une des méthodes pour réduire ces déformations est d'augmenter la vitesse de balayage de la pointe, rendant l'effet de la dérive négligeable. Cependant, si la boucle de rétroaction n'est pas assez rapide pour garder constant le paramètre de contrôle le phénomène de « planage » apparait laissant sur l'image des trainées dans le sens de l'axe rapide au niveau des objets présentant une hauteur importante (figure 2.20.a) : forcer le levier à se rapprocher de la surface minimisera ce défaut mais augmentera le risque d'endommager la pointe et/ou le virus. Lorsque celle-ci s'abime, elle devient plus grosse augmentant la convolution et donc grossissant les objets de la surface. Dans certains cas, la pointe peut devenir multiple. Les objets sur l'image sont donc déformés voir dédoublés (figure 2.20.b). Dans tous les cas, cette modification est le plus souvent irréversible obligeant un changement de levier.

Une autre méthode est de mieux contrôler le gain de la rétroaction. Mais s'il est trop élevé, le cristal va surosciller faisant apparaitre des oscillations sur l'image.

Les paramètres d'imagerie doivent donc être ajustés à chaque fois pour obtenir une image de bonne qualité.

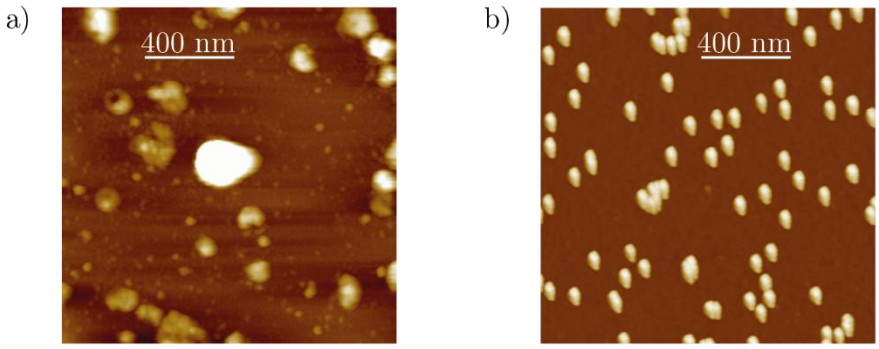


figure 2.20 - Défauts d'imagerie
a) Phénomène de planage. La boucle de rétroaction n'est pas assez rapide par rapport au déplacement de la pointe pour pouvoir retrouver la surface après être passé au-dessus de la particule haute.
b) Pointe déformée asymétrique. Lorsque la pointe est abimée, les objets apparaissent fortement déformés et présentent sur l'image un motif identique du fait de la convolution par la pointe.

2. Analyse des images

Une partie très importante du travail de ma thèse a consisté à développer ou adapter des programmes automatisés permettant l'analyse quantitative des images AFM obtenues.

Maintenant que l'on a les images brutes d'AFM des surfaces étudiées, il est nécessaire d'extraire les données pour réaliser une étude statistique sur les particules déposées sur le mica (celles-ci devant être en grand nombre). Pour cela, nous avons mis en place un protocole automatisé par un script Matlab. Nous obtenons des informations morphologiques de manière la plus objective possible, c'est-à-dire sans intervenir directement sur le choix des particules rentrant dans l'étude statistique.

a. Traitement de l'image.

L'image brute issue du programme de commande de l'AFM est enregistrée sous forme d'un code en binaire. L'utilisation d'un script Matlab[2] permet de transformer l'image en matrice carré ou rectangulaire de dimension [(le nombre de pixel par ligne), (le nombre de ligne)] où chaque coefficient de la matrice correspond à la hauteur mesurée pour le pixel donné.

Lors de la réalisation de l'image, une dérive du cristal piézoélectrique en z existe et déforme l'image selon l'axe lent (figures 2.21.a et 2.21.b). On contourne ce problème en soustrayant à l'image la moyenne des hauteurs de chaque ligne (ou éventuellement une droite ou une parabole selon la planéité du substrat et des éventuelles non linéarité du piézoélectrique). Cette opération s'appelle le *flatten*.

Cette image peut parfois manquer de pixels pour les algorithmes que nous avons mis en place pour obtenir des informations sur la morphologie des particules. Nous avons eu recours alors à une interpolation linéaire entre les coefficients voisins de la matrice image (figure 2.21.c). Cette interpolation n'affecte pas les mesures faites.

b. Sélection des objets sur la surface

Chacune des particules présentes sur l'image doit être isolée de l'image pour pouvoir extraire certaines informations sur leur morphologie. Pour cela, nous avons adapté un script Matlab, initialement développé dans l'équipe pour l'analyse des nucléosomes (Montel 2008).

Ce script s'appuie sur une suite de différents filtres liés à la taille des particules (figure 2.22) :

1. La première étape consiste à rendre binaire l'image initiale en marquant 1 tous les pixels ayant une hauteur au-dessus d'un certain seuil $h_{seuilbruit}$ et 0 les autres pixels. Ce paramètre de filtrage est choisi pour enlever le bruit lié à la rugosité de la surface (fonctionnalisée).
2. Les zones égales à 1 délimitent chacune un objet dont on peut calculer l'aire (c'est-à-dire nombre de pixels). Seules les zones ayant une aire supérieure à A_{min} et inférieure à A_{max} sont conservées. Ces

[2] Script de Claudio Rivetti and Mark Young (de l'Université de l'Orégon, USA) en accès libre sur internet.

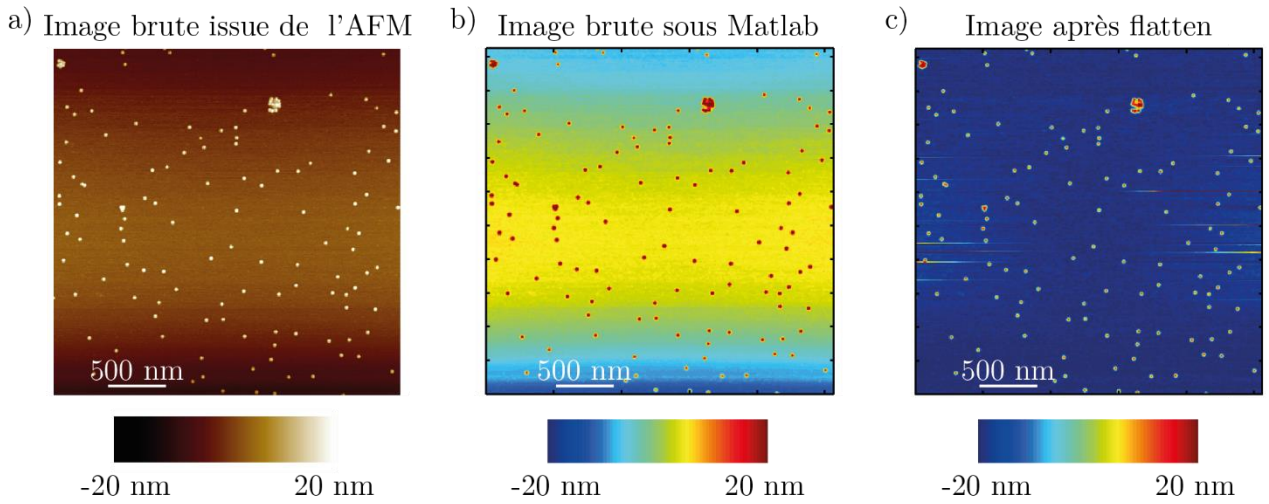


figure 2.21 - Traitement préliminaire des images obtenues par AFM.
a) Image brute obtenue avec le microscope à force atomique. Il s'agit d'une carte d'isointeraction entre la pointe et la surface de mica où ont été déposées des capsides AAV8. L'échelle s'exprime en nm, il s'agit de la distance parcourue par le cristal piézoélectrique. On peut voir la dérive du cristal piézoélectrique : les lignes au centre sont en moyenne plus hautes que les lignes en haut et en bas.
b) Image brute obtenue sous Matlab.
c) Image après traitement *flatten* (soustraction de la moyenne de chaque ligne) diminuant l'effet de la dérive du cristal piézoélectrique lors de la réalisation de l'image.

paramètres de filtrages sont choisis assez larges pour ne pas biaiser la sélection : elle exclut les agrégats ayant une surface trop grande ou les petits objets restant du bruit de la surface.

3. En partant de nouveau de l'image initiale, nous sélectionnons les pixels ayant une hauteur supérieure à $h_{seuilobjet}$. L'image obtenue est donc binaire et ne sélectionne que les particules suffisamment hautes pour être considérées comme des virus.
4. Nous sélectionnons par la suite les zones de l'image issue de l'étape 2 ayant au minimum un pixel égal à 1 dans l'image issue de l'étape 3. Ce système de seuillage par hystérésis évite de sélectionner trop brutalement les particules au risque d'en mettre de côté et de délimiter les contours des zones au plus proche de la surface.
5. Sur les zones conservées, plusieurs filtrages morphologiques sont de nouveau appliqués :

- Le nombre fractal : ce nombre est défini comme le rapport entre le périmètre au carré et 4π.aire et il vaut 1 pour un disque parfait. Il mesure les irrégularités du contour et permet donc de supprimer les particules irrégulières ou multiples. On définit ainsi $\mathcal{F}_{min}$ et $\mathcal{F}_{max}$, les bornes de sélection du nombre fractal.
- L'asymétrie sélectionne les particules plus ou moins sphériques grâce au rapport entre le petit diamètre et le grand diamètre de la zone obtenue par un ajustement elliptique. Ce critère est principalement utilisé pour l'étude des capsides du VIH-1 dont la géométrie est fortement asymétrique. Pour les autres virus, il n'est pas utilisé ($\mathcal{A}_{max}$=1 et $\mathcal{A}_{min}$=0).
- Les particules trop proches du bord de l'image sont exclues de la sélection. On évite ainsi de sélectionner les particules rognées.

6. L'image toujours binaire obtenue lors de l'étape 5 est ensuite multipliée par l'image initiale.

Nous obtenons ainsi une image de topographie où seules les particules qui sont potentiellement des virus, sont conservées.

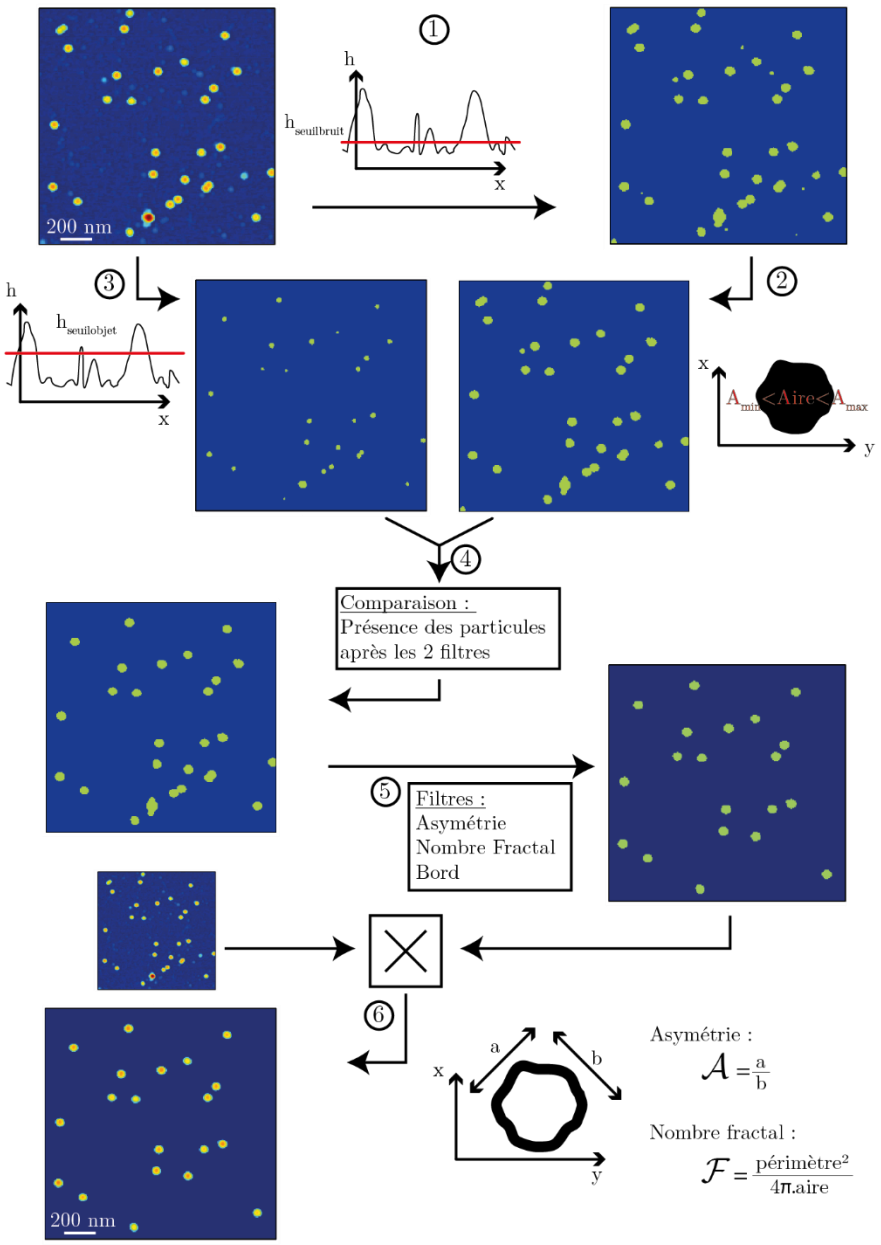


figure 2.22 - Algorithme pour isoler les particules sur une surface à partir d'une image AFM

L'automatisation de la sélection des particules suit l'algorithme suivant :

1. L'image traitée sous Matlab passe un filtre de hauteur excluant le bruit d'imagerie et binarisant l'image : tout pixel ayant une hauteur supérieure au seuil $h_{seuilbruit}$ devient un 1 sur l'image produite.
2. Un filtre sur l'aire, peu restrictif, permet d'exclure les zones trop larges ou trop petites. L'image qui en résulte est binaire elle aussi.
3. A partir de l'image originelle, un nouveau filtre de hauteur permet de sélectionner les pixels supérieurs à une certaine hauteur $h_{seuilobjet}$ obtenant une nouvelle image binaire.
4. L'image obtenue à la fin de cette étape est constituée des zones non nulles issues de l'étape 2 ayant des pixels égaux à 1 dans l'image de l'étape 3 (seuillage par hystérésis).
5. De nouveaux, des filtres sur les particules ayant un nombre fractal ou une asymétrie trop faibles ou trop grandes les excluent. Les particules tronquées par les bords de l'image sont également exclues.
6. L'image binaire obtenue est ensuite multipliée avec l'image de départ. On obtient à la fin une image de topographie où seules les particules susceptibles d'être des virus isolés sont présentes.

L'image utilisée est celle d'une surface où a été déposé le sérotype AAV9. Le mode utilisé est le *Peak Force*.

c. Paramètres morphologiques.

Pour chaque particule isolée, plusieurs paramètres morphologiques sont accessibles plus ou moins directement.

Paramètres directs (figure 2.23.a)

Un paramètre évident est la hauteur maximale de la particule. Il correspond au dernier nanomètre atteint dans la représentation iso-hauteur pour éviter tout problème de singularité. Cette hauteur ne subit théoriquement pas l'effet de la convolution par la pointe. Il faut cependant faire remarquer qu'il ne s'agit pas de la hauteur de la particule et ce pour deux raisons principales. La première est que la mesure réalisée par l'AFM est celle des interactions entre la pointe et la surface et non de la topographie de la surface. De plus, la surface peut plus ou moins attirer la particule vers elle, l'aplatissant sous l'effet du « collage ». On ne peut ainsi

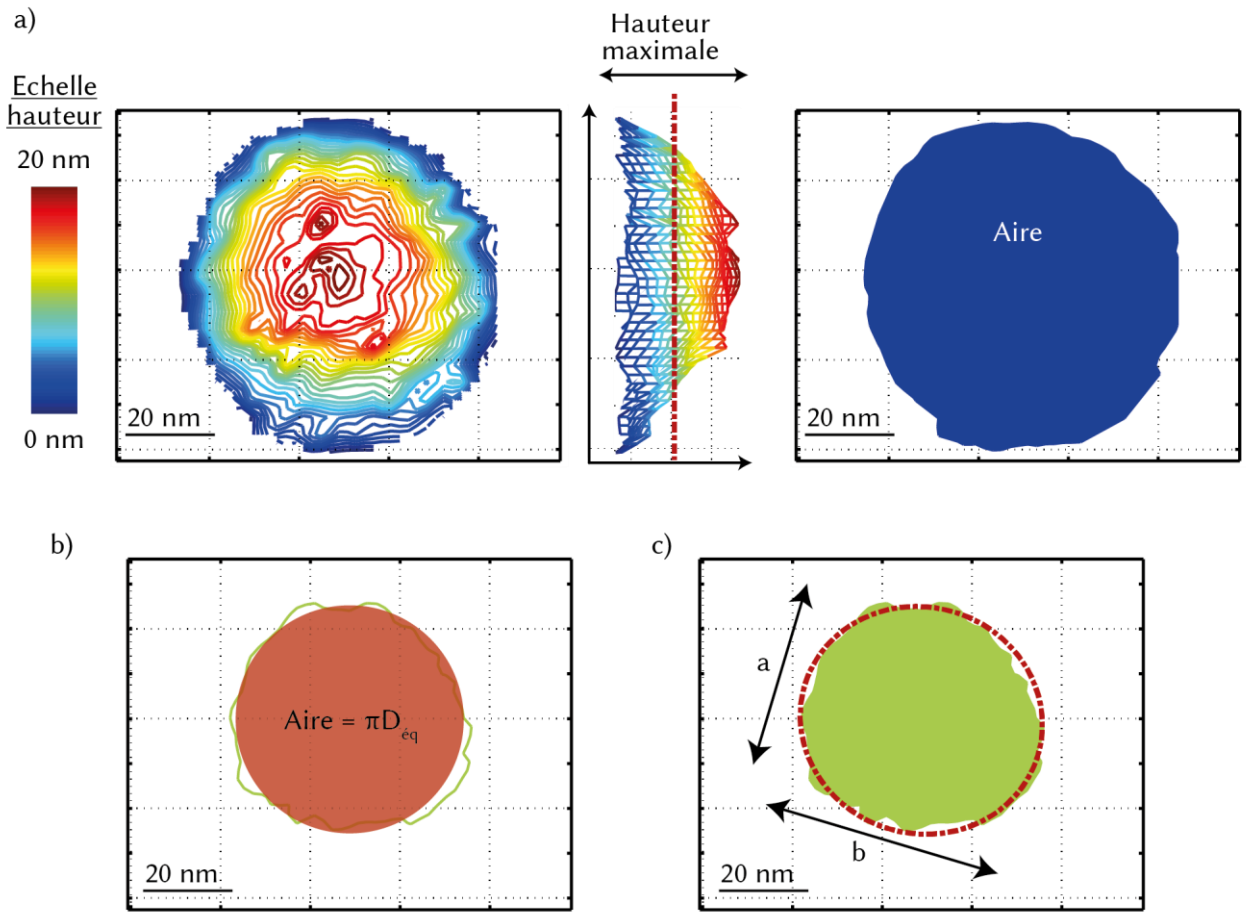


figure 2.23 - Paramètres morphologiques

a) (A gauche) Contour isohauteur d'une particule AAV8 imagée dans le TE. La largeur de la particule très supérieure à celle attendue du fait de la grande convolution par la pointe. (Au centre) Représentation « de côté » des courbes isohauteurs. La ligne en pointillée représente la mi-hauteur de la particule. (à droite) Mesure de l'aire occupée sur la surface. En réalité, il s'agit de l'aire occupée à la hauteur du premier seuil bruit.

b) Le diamètre équivalent à mi-hauteur $D_{éq}$ est définie comme le diamètre du cercle ayant comme aire celle de la coupe à mi-hauteur de la particule.

c) Une détermination des axes propres de la coupe à mi-hauteur permet de déterminer le petit diamètre (a) et le grand diamètre (b). L'asymétrie est alors calculée comme étant le rapport entre a et b. Plus l'asymétrie s'approche de 1, plus la coupe est circulaire.

pas négliger un biais issu de l'adsorption sur une surface : cette information ne peut être utilisée qu'en relatif en comparaison avec d'autres virus.

L'aire occupée par la particule sur la surface est facilement obtenue en comptant le nombre de pixels utilisés par la particule sur l'image et en connaissant la dimension d'un pixel. De même le volume occupé par la particule est facilement mesuré en sommant chaque coefficient de la matrice image en se limitant à la zone occupée puis en multipliant par l'aire d'un pixel. Ces deux grandeurs sont extrêmement sensibles à la convolution de la pointe (figure 2.6) ce qui limitera leurs exploitations.

Diamètre équivalent et diamètre équivalent à mi-hauteur (figure 2.23.b)

Nous définissons le diamètre équivalent comme le diamètre qu'aurait un disque dont l'aire est égale à celle mesurée. A l'instar de l'aire, ce diamètre est sensible à la convolution de la pointe. Pour minimiser cet effet, la stratégie a été de prendre en compte non pas l'aire occupée sur la surface par la particule mais celle de sa coupe à mi-hauteur, parallèlement à sa surface. Le diamètre équivalent à mi-hauteur est donc défini comme le diamètre qu'aurait le disque ayant une aire égale à celle de la coupe de la particule virale à cette hauteur.

Ajustement elliptique (figure 2.23.c)

Le diamètre équivalent à mi-hauteur donne une information moyenne qui ne signalera pas l'existence d'une asymétrie de la particule. Pour résoudre ce problème, nous réalisons de nouveau une coupe de la particule à la moitié de sa hauteur maximale. Cette zone est ensuite ajustée par une ellipse. L'algorithme privilégié pour cela est une détermination des axes propres, donnant ainsi les directions des axes de l'ellipse, et des valeurs propres, le petit diamètre a et le grand diamètre b. A partir de ces dimensions, on peut ainsi caractériser son asymétrie par le rapport a/b, inférieur à 1. Plus ce rapport tend vers 1, plus la coupe à mi-hauteur se rapprochera d'un disque.

Mesure des angles

La capside du virus VIH-1 présente une géométrie pouvant aller du cylindre au cône. La mesure de l'angle du cône représente une information supplémentaire extraite des images AFM.

Deux approches peuvent être faite (figure 2.24.a) :

- La première méthode est de réaliser une section de la hauteur le long du core déposée sur la surface et de mesurer la pente de la partie centrale, ce qui donnerait directement la tangente de l'angle du cône. Cette méthode présente l'avantage de ne pas être sensible à la convolution.
- La deuxième méthode consiste quant à elle à déterminer les contours d'une coupe proche de la surface du core. L'angle obtenu sera cependant plus sensible à la convolution.

La première méthode reste ainsi la mesure la plus sure. Malheureusement, comme nous le verrons dans le chapitre III, nous avons dû privilégier la deuxième méthode.

Voici la démarche suivie (figure 2.24.b) :

1. Après avoir isolé les cores de l'image avec les filtres présentés plus haut, un ajustement elliptique sur une coupe de la particule à une hauteur très basse donne la direction de l'axe principal.

La coupe à très basse hauteur, bien que maximisant la convolution, permet de ne pas prendre en compte le fait que l'axe de révolution du core fait un angle non nul avec la surface (égal à la moitié de l'angle recherché).

2. Le profil du contour est alors obtenu en mesurant la distance bord à bord perpendiculaire à cet axe pour chacun de ses points.

3. La pente de la partie centrale de la courbe ainsi obtenue est la tangente de l'angle du core. On calcule ensuite la dérivée le long de la courbe. Pour cela on récupère le coefficient directeur de l'ajustement linéaire local d'un intervalle d'une dizaine de points de part et d'autre de chaque point.
4. A partir de l'histogramme de la dérivée, la valeur de la dérivée la plus fréquente d_m et l'écart type σ_m permettent de déterminer tous les points se trouvant dans l'intervalle d_m - σ_m et $d_m + \sigma_m$. La valeur retenue d est la moyenne d'un ajustement de type gaussien.
5. L'angle est alors égal à :

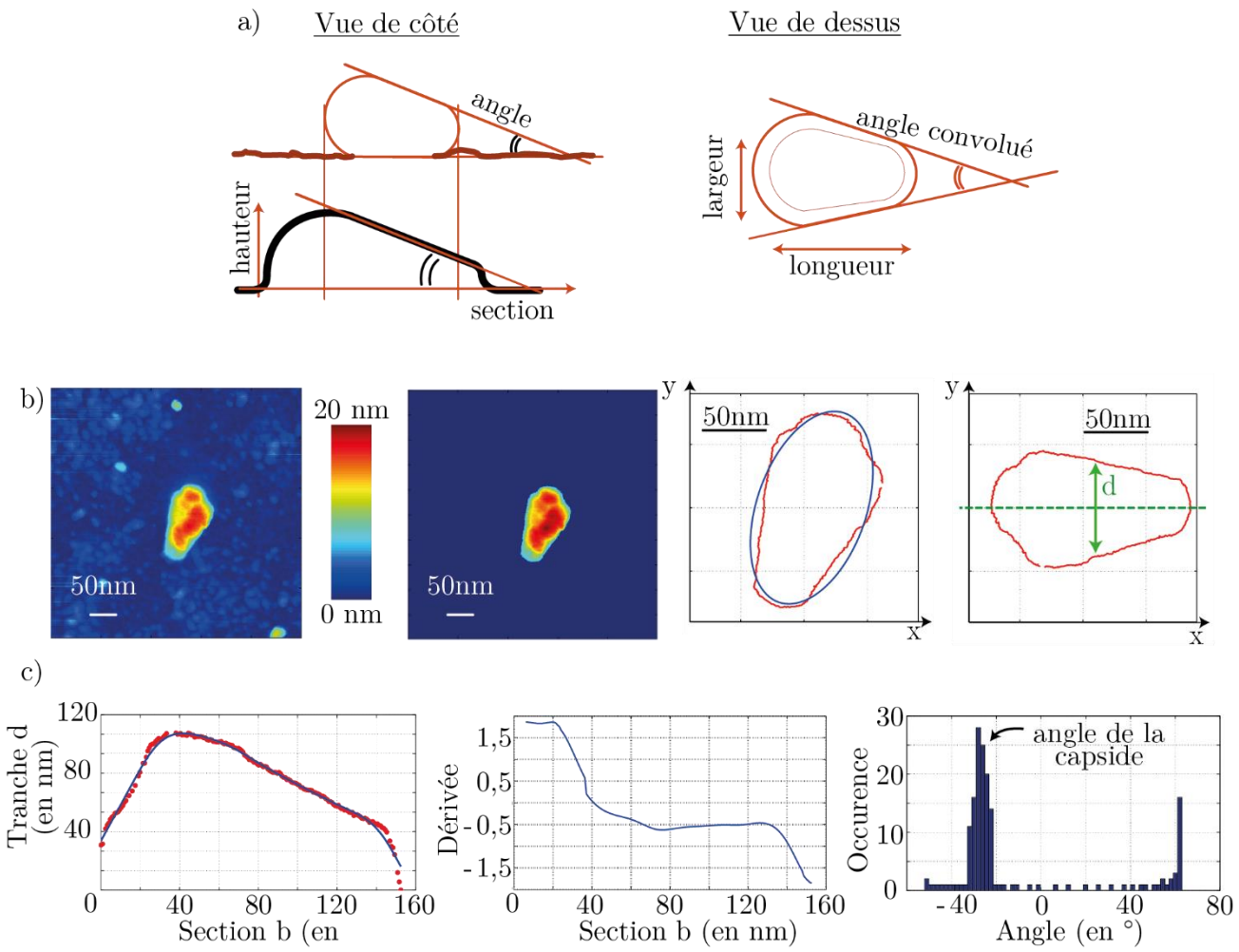


figure 2.24 - Mesure de l'angle du core du VIH-1

a) Représentation des deux méthodes pour extraire sur une image AFM l'angle d'une capside virale du VIH-1. (à gauche) A partir de la section selon l'axe principal du core, on extrait l'angle en calculant la pente de la zone centrale. (à droite) A partir de la vue de dessus, on extrait le contour du core et l'angle. Cet angle est surestimé du fait de la convolution par la pointe (Annexe A) (en trait fin, la « véritable capside »).

b) Algorithme d'extraction de l'angle par la deuxième méthode. (à gauche) Deux images Matlab, la première image brute, la deuxième image où le bruit a été enlevé. (au centre) Ajustement elliptique du core : les axes principaux sont le petit et le grand axes de l'ellipse. (à droite) Contour réorienté selon le grand axe b. On mesure la largeur d du core en chaque point de l'abscisse.

c) Calcul de l'angle du core par la deuxième méthode. (à gauche) Largeur de la tranche du core en fonction de la position sur l'axe principal (en rouge). On réalise un fit en exploitant les propriétés des *splines* - ajustement par des polynômes par morceau (en bleu). (au centre) Dérivée de l'ajustement par *spline*. La valeur du plateau est égale à la tangente de l'angle. (à droite) Histogramme des valeurs de l'inverse de la tangente de la pente. Le maximum représente alors l'angle du core.

$$\alpha = \arctan(d) * \frac{360}{2\pi} \tag{2.4}$$

Une simulation de l'imagerie par AFM d'une capside déposée sur la surface montre une augmentation de l'angle observé (en fonction du diamètre de la pointe) (voir Annexe A).

d. Représentations statistiques.

Nous avons ainsi obtenu, pour chacune des particules imagées, différentes informations morphologiques. Pour mettre en valeur ces résultats, nous avons opté pour les représentations couramment utilisées dans la statistique à savoir les courbes de densité de probabilité et les cartes de corrélations entre les différentes grandeurs.

Courbe de densité de probabilité (figure 2.25)

Soit une grandeur X et une famille de mesure de X, $\{x_i\}_{i\in[\![1,N]\!]}$ où N est le nombre de particules étudiées.

On définit alors la densité de probabilité f à partir de sa loi de probabilité : la probabilité d'avoir X se trouvant entre a et b est égale à :

$$p(X \in [a,b]) = \int_a^b f(x)dx \tag{2.5}$$

La probabilité de trouver $X = x$ à dx près est alors donnée par la formule :

$$p(X = x) = f(x)dx \tag{2.6}$$

On peut voir f comme un histogramme normalisé dont les fréquences sont très proches les unes des autres. D'ailleurs, nous définissons, via un script matlab, cette densité par morceau ainsi :

$$f(n\delta) = \frac{nombre(x_i \in [\![n\delta, (n+1)\delta]\!])}{N} \text{ où } n \in \mathbb{N} \tag{2.7}$$

δ est la taille d'une barre de l'histogramme.

Cependant, cette densité reste très piquée, nous préférons lisser la fonction pour rendre mieux compte des maximums. Pour cela nous utilisons une boite glissante de type gaussienne de largeur ε :

$$f(n\delta) = \frac{1}{\tau} \sum_{X=\{x_i\}_{i\in[\![1,N]\!]}} e^{-\frac{(n\delta - X)^2}{2\varepsilon^2}} \text{ où } n\delta \in [\![m, M]\!] \tag{2.8}$$

τ est le facteur de normalisation donné par :

$$\tau = \sum_{n\delta=m}^{M} \left(\sum_{X=\{x_i\}_{i\in[\![1,N]\!]}} e^{-\frac{(n\delta - X)^2}{2\varepsilon^2}} \right) \tag{2.9}$$

Cette représentation donne accès la valeur de la grandeur X la plus probable, que l'on définira comme grandeur caractéristique, mais aussi la moyenne $\bar{X}$ ou encore la dispersion rendue par la largeur du pic (σ_X écart type de la distribution de la grandeur X : $\sigma_X = \sqrt{\overline{X^2} - \bar{X}^2}$

X peut représenter la hauteur, les différents axes ou encore l'aire ou le volume occupés par la particule.

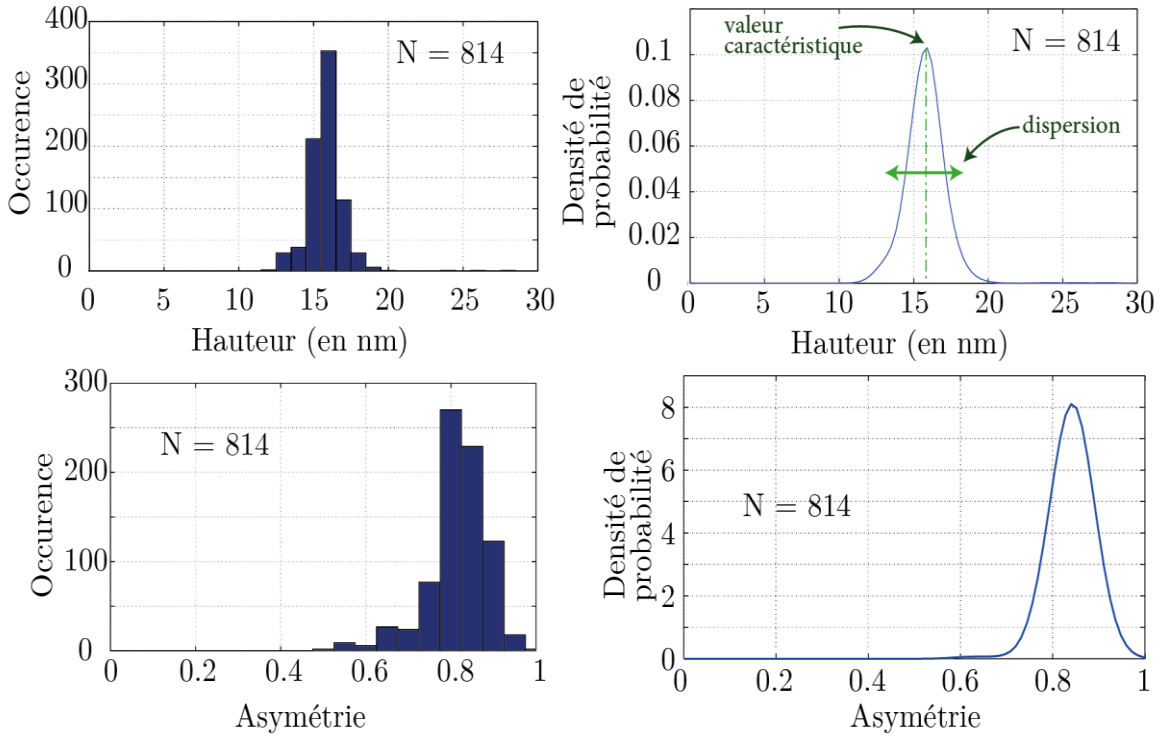


figure 2.25 - Représentation statistique des paramètres morphologiques.
Exemple de distributions de deux paramètres morphologiques des capsides AAV8 déposées sur du mica imagées avec une pointe DLCS : (en haut) la hauteur (en bas) l'asymétrie avec deux types de représentations. (à gauche) Histogramme. (à droite) Courbe de densité de probabilité.
On peut facilement avoir une idée sur la valeur la plus probable (en pointillé vert) et la dispersion du paramètre étudié (double flèche verte).

Boite à moustache (figure 2.26)

Une courbe de densité de probabilité ne donne au lecteur qu'une idée de la polydispersité ou des valeurs statistiques d'une grandeur mesurée (comme sa médiane par exemple) qui nécessite divers calculs. La boite à moustache (ou *box plot*) permet par simple lecture (figure 2.26) d'obtenir la médiane m, définit comme séparant l'ensemble des valeurs mesurées en deux groupes de même cardinal, l'un contenant des valeurs inférieures à m, l'autre des valeurs supérieures. Ceci se traduit mathématiquement ainsi :

$$p(X \leq m) = \frac{1}{2} \text{ et } p(X \geq m) = \frac{1}{2} \tag{2.10}$$

Les quartiles q_1 et q_3, définis statistiquement par les égalités suivantes :

$$p(X \leq q_1) = \frac{1}{4} \text{ et } p(X \geq q_1) = \frac{3}{4} \tag{2.11}$$

$$p(X \leq q_3) = \frac{3}{4} \text{ et } p(X \geq q_3) = \frac{1}{4} \tag{2.12}$$

permettent de quantifier la dispersion en évaluant l'écart $q_1 - q_3$.

Carte de corrélation (figure 2.27)

Représenter la corrélation entre deux grandeurs physiques (X et Y par exemple) revient à calculer la carte à deux dimensions de la densité de probabilité de X et de Y. De la même façon que précédemment, on définit la densité de probabilité de X et Y grâce à la probabilité d'avoir X entre a_X et b_X et Y entre a_Y et b_Y :

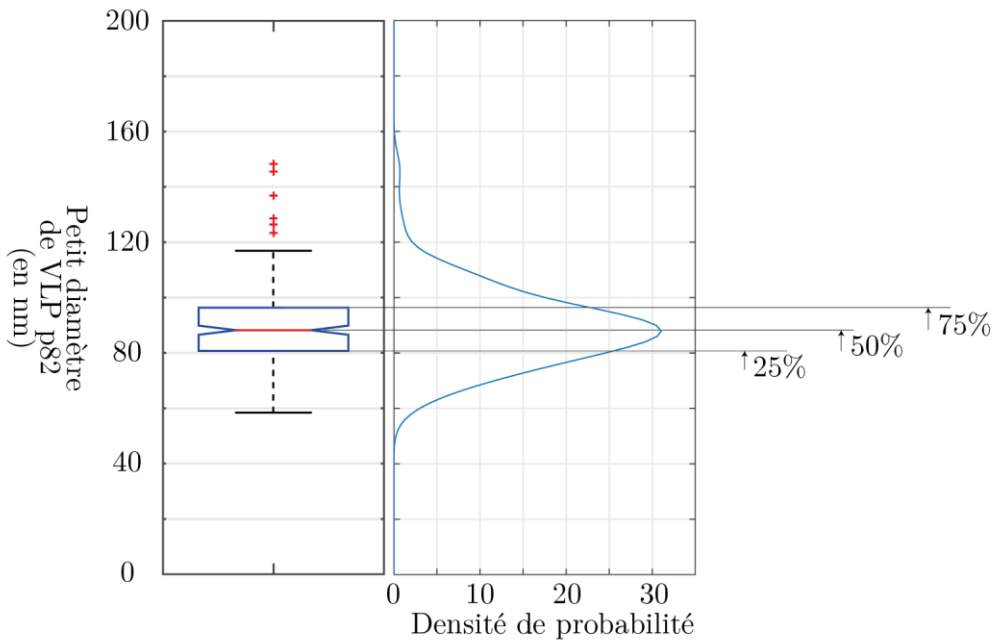


figure 2.26 - Représentation statistique en boite à moustache
(à gauche) Boite à moustache associée au petit diamètre de VLP p8.2 (N = 243). Le trait rouge représente la médiane (50% de la population de part et d'autre de ce trait). Les traits bleus horizontaux représentent les quartiles q_1 et q_3.
(à droite) La densité de probabilité du petit diamètre de VLP p8.2 associée à la boite à moustache. La médiane est, dans ce cas, confondue avec la valeur caractéristique.

$$p(X \in [a_X, b_X], Y \in [a_Y, b_Y]) = \int_{a_Y}^{b_Y} \int_{a_X}^{b_X} f(x, y) dx \tag{2.13}$$

On peut de nouveau voir f comme un histogramme normalisé dont les valeurs des barres δ_X et δ_Y des deux grandeurs sont très proches les unes des autres.

De même, nous utilisons une représentation lissée de cette densité grâce à une boite glissante de type gaussienne à deux dimensions de largeur ε_X selon X et ε_Y selon Y en utilisant les réalisations $\{y_i\}_{i\in[\![1,N]\!]}$ pour Y et $\{x_i\}_{i\in[\![1,N]\!]}$ pour X.

$$f(n_X\delta_X, n_Y\delta_Y) = \frac{1}{\tau} \sum_{X=\{x_i\}_{i\in[1,N]}} e^{-\frac{(n_X\delta_X - X)^2}{2\varepsilon_X{}^2}} \sum_{Y=\{y_i\}_{i\in[1,N]}} e^{-\frac{(n_Y\delta_Y - Y)^2}{2\varepsilon_Y{}^2}} \tag{2.14}$$

où $n_X\delta_X \in [m_X, M_X]$ et $n_Y\delta_Y \in [m_Y, M_Y]$.

τ est de nouveau le facteur de normalisation donné par :

$$\tau = \sum_{n_Y\delta_Y=m_Y}^{M_Y} \left(\sum_{n_X\delta_X=m_X}^{M_X} \left(\sum_{X=\{x_i\}_{i\in[1,N]}} e^{-\frac{(n_X\delta_X - X)^2}{2\varepsilon_X{}^2}} \sum_{Y=\{y_i\}_{i\in[1,N]}} e^{-\frac{(n_Y\delta_Y - Y)^2}{2\varepsilon_Y{}^2}} \right) \right) \tag{2.15}$$

On peut ainsi représenter la corrélation entre différentes grandeurs comme celle de la hauteur avec le diamètre équivalent ou encore le grand diamètre en fonction du petit diamètre (figure 2.27.b). On a accès,

grâce à cette représentation, aux valeurs les plus probables ou encore à la dispersion de ces grandeurs, de manière simultanée.

La projection sur chacun des axes donne les densités de probabilité 1D de la grandeur associée.

La carte de corrélation entre le petit diamètre et le grand diamètre sera souvent exploitée : en plus de nous donner une information sur les dimensions les plus probables, elle permet d'avoir une idée de la dispersion de taille des particules et de leur asymétrie : plus la tâche s'écarte de la première bissectrice, plus les particules sont asymétriques.

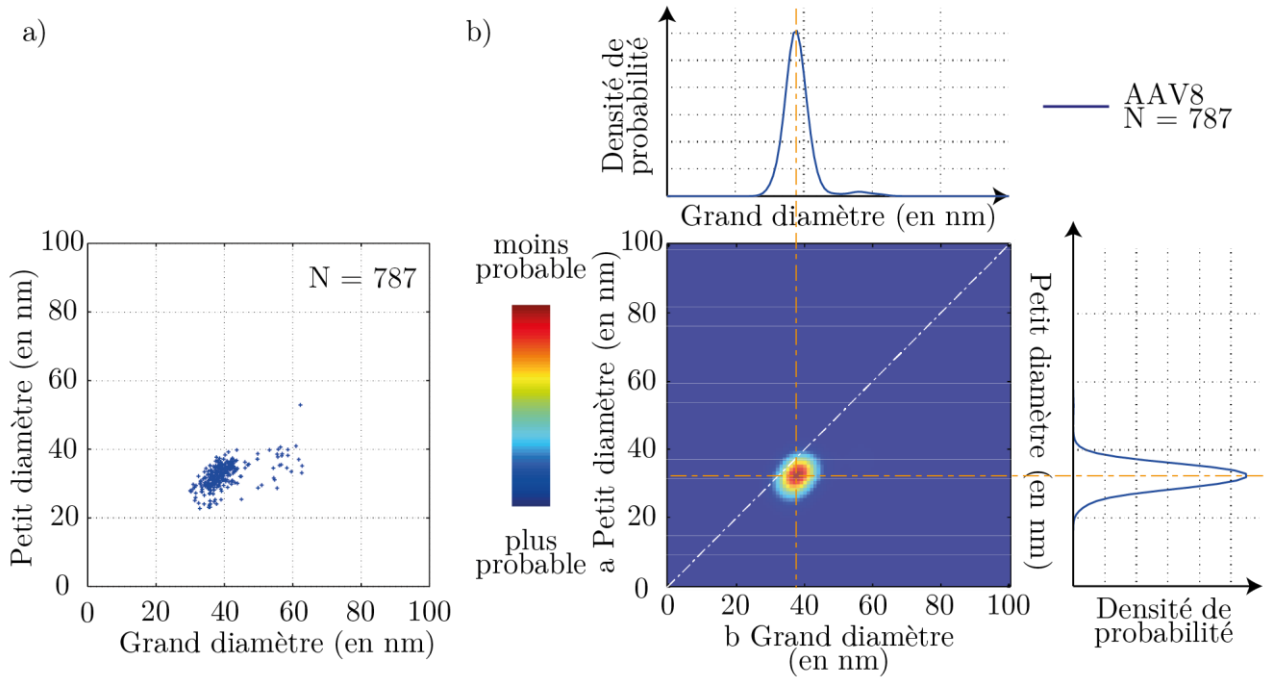


figure 2.27 - Carte de corrélation

a) Nuage de points représentant la répartition du petit diamètre et du grand diamètre de 787 capsides AAV 8, imagées par une pointe DLCS en *mode Tapping*. Le problème de cette représentation est l'absence de renseignements sur la distribution des tailles.

b) La carte centrale représente la corrélation statistique entre le petit diamètre et le grand diamètre des capsides AAV8. Plus la tâche est rouge, plus la probabilité de rencontrer une particule ayant ces dimensions est grande. Plus la tâche s'éloigne de la première bissectrice, plus l'asymétrie de la particule est importante. On remarque que les tâches sont systématiquement en dessous de la première bissectrice : le programme cherche obligatoirement un grand diamètre et un petit diamètre (numériquement les 2 axes ne peuvent pas être égaux). Le débordement au-dessus de l'axe est dû au lissage gaussien. On observe sur les côtés la projection de la carte sur l'axe représentant le petit diamètre a (à droite) et le grand diamètre b (en haut) ce qui revient à observer la densité de probabilité de ces grandeurs respectives.

<u>Incertitudes</u>

Il est important à ce niveau de parler des incertitudes sur les différentes grandeurs mesurées par l'analyse morphologique.

Dans le cas d'une répartition de la grandeur morphologique X sur une population de N particules de type distribution normale, c'est-à-dire que la densité de probabilité de X prend la forme d'une gaussienne, l'incertitude dX sur la moyenne $\bar{X}$, est donnée par l'erreur standard :

$$dX = \frac{\sigma_X}{\sqrt{N}} \tag{2.16}$$

où σ_X est l'écart-type de la distribution de la grandeur X.

Si maintenant on s'intéresse à la grandeur caractéristique, c'est-à-dire le maximum de la densité de probabilité de X, lissée par la boite glissante de largeur ε, son incertitude dX est maximisée par :

$$dX = \frac{\varepsilon}{2} \tag{2.17}$$

Au cours des chapitres suivants, nous serons amenés à croiser des densités de probabilité proches de la répartition gaussienne. Nous utiliserons alors la moyenne pour décrire la grandeur morphologique avec son incertitude associée. Dans le cas contraire, la valeur caractéristique sera utilisée avec son incertitude associée.

Dans les deux situations, la valeur de l'écart-type σ représente la largeur de la distribution.

e. Mesure automatique de la longueur d'ADN éjecté

On souhaite mesurer la longueur de l'ADN viral qui aurait été éjecté lors de la déstabilisation.

Les capsides de vecteur AAV sur la surface présentent une hauteur autour de 20 nm. L'ADN simple brin, par contre, ne dépasse pas le nanomètre. Il est donc nécessaire de traiter les images afin de pouvoir se concentrer uniquement sur les brins d'ADN, de hauteur légèrement supérieure au bruit mais nettement inférieure aux particules sur la surface.

L'utilisation de filtres sur les hauteurs des objets permet d'isoler les filaments d'ADN et d'en tracer le squelette (figure 2.28.a). Il est alors possible de mesurer la longueur de ce dernier. En suivant le squelette, on peut déterminer le nombre de pixels de côté de longueur d traversés, N_4 en connectivité 4 (c'est-à-dire en allant de pixel à pixel sans utiliser les diagonales) et N_8 en connectivité 8 (en autorisant l'utilisation des diagonales). La longueur du squelette est alors donnée par

$$L_{ADN} = N_4 d + (N_8 - N_4)(\sqrt{2} - 1)d \tag{2.18}$$

Avec la distribution de longueur d'ADN ainsi mesurée, il est possible d'exclure les brins d'ADN compactés, ayant passés les filtres de hauteur comme en haut à gauche du zoom de l'image 5 (figure 2.28.a). Dans le cas d'un filament étendu, le rapport de son aire occupée sur la surface par sa longueur doit être une constante, théoriquement proche du diamètre de l'ADN (figure 2.28.b) et que l'on mesure autour de 7 nm dans les expériences. L'exclusion des brins ayant un rapport trop éloignée de ce diamètre permet de tracer la densité de probabilité de la longueur des brins d'ADN étendus sur la surface (figure 2.28.c). On voit que ce critère permet d'exclure essentiellement des brins de petite longueur correspondant aux filaments compactés.

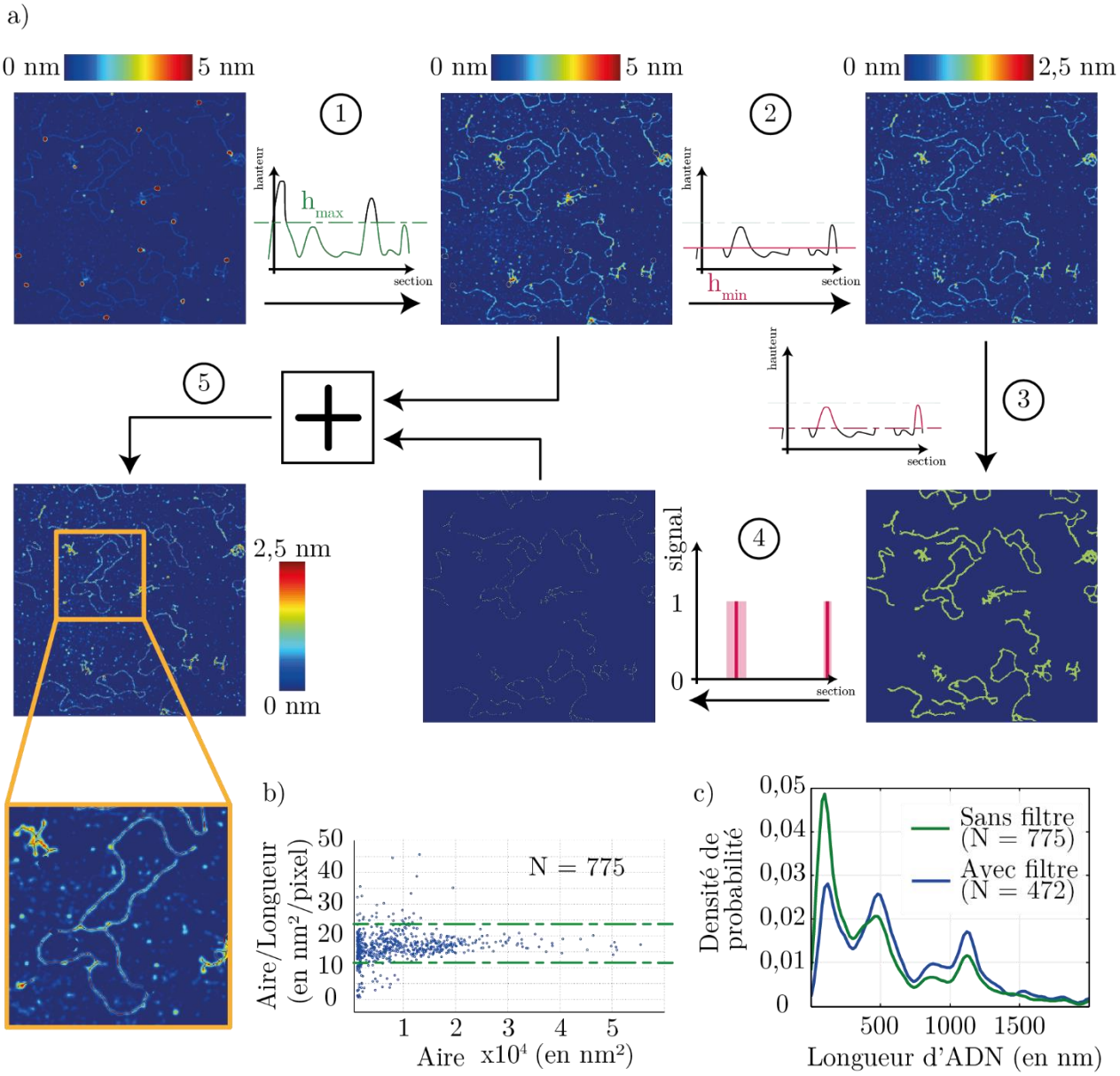


figure 2.28 - Mesure de la longueur de l'ADN éjectée par le vecteur AAV sur une surface de mica

a) Algorithme pour la mesure automatisée de la longueur de l'ADN se trouvant sur la surface de mica. 1) Un seuil sur la hauteur permet de binariser l'image et donner la valeur 1 pour les objets plus bas que h_{max}, comme les capsides. 2) On dilate pixel par pixel ces zones jusqu'à ce que leurs contours atteignent une hauteur minimale h_{min}. On supprime ainsi les capsides jusqu'à une hauteur très basses. 3) Un nouveau filtre de hauteur est appliqué pour ne conserver que les objets supérieurs à h_{min}. Un seuillage sur l'aire (A_{min} et A_{max}) termine la sélection des filaments sur la surface. 4) Grace à un programme de rognage, on détermine le squelette des brins d'ADN sur la surface. 5) Une superposition entre l'image filtrée et l'image des squelettes permet de confirmer l'efficacité de l'algorithme.

A partir du squelette, on peut mesurer la longueur du brin d'ADN, connaissant la dimension d'un pixel.

b) Rapport entre l'aire occupée par le brin d'ADN (issue de la figure résultant de l'étape 3, en nm²) et la longueur de son squelette (en pixels) en fonction de l'aire. Cette représentation nous permet d'exclure tous les objets parasites issus du bruit mais également les simples brins d'ADN s'étant compactés sous l'effet des ions Mg^{2+} ou de l'hybridation naturelle (structure secondaire de l'ADN simple brin).

c) Densité de la probabilité de la longueur d'ADN présent sur la surface de mica sans filtre (en vert) et avec filtre (en bleu). Le filtre permet de diminuer le pic de faible longueur en enlevant de la distribution les ADNs compactés.

IV. Expérience d'indentation

Lors de mon travail sur l'indentation des particules virales, je me suis uniquement intéressé à la courbe d'approche qui est celle qui permet la mesure de la raideur des virus.

1. Réalisation des courbes

a. Préparation des échantillons

Si les images AFM sont obtenues souvent dans l'air et parfois en milieu liquide, les expériences d'indentation ne sont faites que dans un milieu liquide. La réalisation des expériences d'indentation dans l'air amènerait nécessairement la création d'un pont capillaire entre la pointe et la surface qui cache toute information sur la mécanique des objets étudiés. Les leviers utilisés pour ces expériences sont les mêmes que pour l'imagerie en liquide, à savoir les leviers dNPS et *Scan Assyst Fluid* + (voir Chap2. III.1). L'extrémité des pointes sera alors de taille inférieure ou quasi-équivalente à celle du virus AAV et cinq à dix fois plus petite que le virus VIH-1.

La préparation des échantillons suit le même protocole que pour l'imagerie en liquide. La surface est recouverte par la solution tampon dans laquelle le levier est également immergé. Avant chaque calibrage de la sensibilité du détecteur (la diode quatre-quadrants) et expérience d'indentation, une image est réalisée pour sélectionner une particule.

b. Mesure de la raideur du levier

Mesurer la raideur d'un virus, en N/m, nécessite de calibrer le levier. En effet, les données obtenues lors d'une expérience de nano-indentation sont sous la forme d'une courbe reliant la tension appliquée au cristal piézoélectrique à la tension mesurée aux bornes de la diode à quatre quadrants. Passer de la tension appliquée au cristal à la distance z parcourue au-dessus de la surface est obtenue lors d'une opération de calibrage préliminaire avec une grille bien définie (Cette calibration est également réalisée pour l'imagerie), opération réalisée environ une fois par an.

En revanche, passer de la tension mesurée aux bornes de la diode à la déflection du levier (on parle alors de mesure de la sensibilité de la photodiode quatre-quadrants) nécessite une étape de calibration qui se fait avant chaque expérience de nano-indentation. En effet, cette sensibilité S dépend fortement du milieu utilisé, de la géométrie du levier et de la position du laser sur le levier. Pour la déterminer, nous réalisons une approche[3] du levier sur une zone dure, c'est-à-dire le mica (fonctionnalisé ou non) où il n'y a pas de virus. Seul le levier se déforme : au contact de la surface, lorsque le porte-levier descend de 1 nm, le levier se défléchit linéairement de 1 nm. Ce comportement linéaire nous permet de le modéliser par un ressort de raideur k_{lev}

[3] Dans le référentiel du laboratoire, ce n'est pas le levier qui descend vers la surface mais la surface qui monte vers le levier.

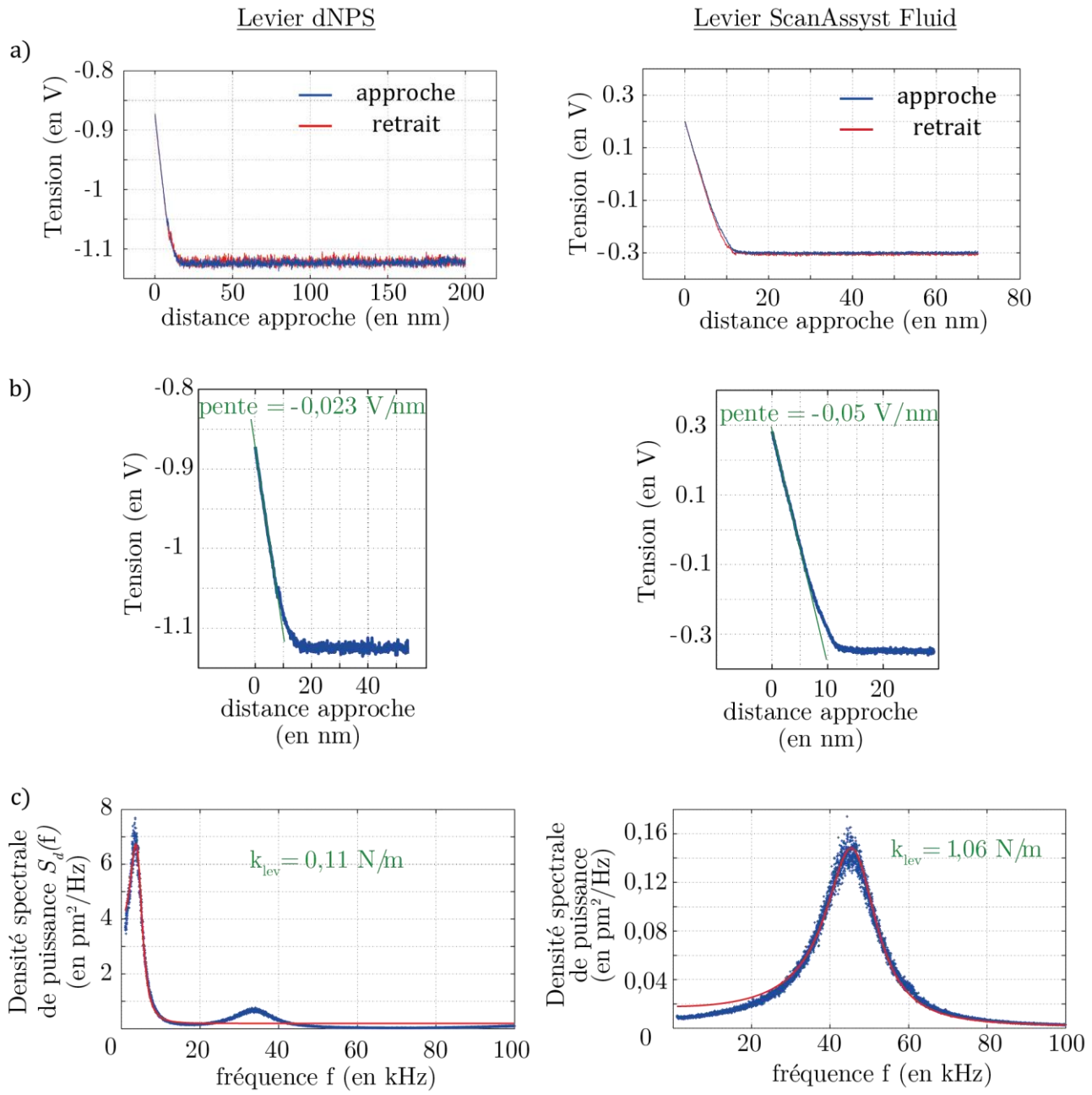


figure 2.29 - Calibration des leviers

Comparaison entre un levier mou (à gauche) et un levier dur (à droite).

a) Courbe d'évolution de la tension aux bornes de la photodiode à quatre quadrants en fonction de l'approche de la surface vers la pointe lors d'une expérience de nano-indentation approche (en bleu) / retrait (en rouge) sur une surface dure (mica). On remarque le comportement linéaire lors de la déformation du levier : il peut donc être modélisé par un ressort de raideur k_{lev}.

b) Zoom des courbes d'approche sur la déformation des leviers. L'inverse de la pente de la partie linéaire permet de mesurer la sensibilité : ainsi la sensibilité est de 43,4 nm/V pour le levier dNPS tandis qu'elle est de 20 nm/V pour le levier *ScanAssyst Fluid*. Ces sensibilités peuvent varier selon l'expérience (position du laser sur le levier, stabilité en température, …).

c) Densité spectrale de puissance des leviers (en bleu) et ajustement selon le modèle de Sader. On voit ainsi la présence d'un pic de résonance et dans le cas du levier de faible raideur un harmonique. Le modèle de Sader ne s'intéresse qu'au pic fondamental. La raideur obtenue pour le levier dNPS est de 0,11 N/m, et de est de 1,06 N/m pour le levier *ScanAssyst Fluid*.

mais également d'avoir accès à la sensibilité (figures 2.29.a et 2.29.b) en calculant la pente de la courbe après contact « tension aux bornes de la diode à quatre quadrants » en fonction de la distance parcourue par la base du levier, ce qui nous donne ainsi une sensibilité en nm/V. Il suffit alors de multiplier par ce coefficient la tension en volts aux bornes de la photodiode pour avoir la déflection du levier en nm quelle que soit ensuite l'expérience réalisée, sur une surface dure ou sur une surface molle, à condition de ne pas changer de levier, ni même de réglage du laser ou encore de nature du liquide dans la cellule.

Si le levier se comporte comme un ressort, connaitre la force F appliquée sur le virus se ramène alors à multiplier la déflection d par la raideur k_{lev} :

$$F = k_{lev}.d \tag{2.19}$$

Plusieurs méthodes existent pour mesurer de manière indépendante cette constante k_{lev} comme la comparaison avec des leviers déjà calibrés par exemple. J'ai utilisé pour ma part la technique du « *Thermal Tune* » (figure 2.29.c). Après avoir mesuré la sensibilité, le levier, toujours immergé dans la solution tampon, est placé à une grande distance de la surface pour éviter toute interaction (environ 20µm). Le système enregistre pendant dix secondes les mouvements du levier soumis à l'agitation thermique (l'acquisition se fait toutes les 12,5µs). Après application du théorème de fluctuation-dissipation (Callen & Greene 1952), on obtient la densité spectrale de puissance de la déflexion du levier S_d. En réalisant un ajustement, en fonction de la pulsation ω, avec la densité spectrale théorique $S_d(\omega)$ obtenue grâce au modèle de Sader (Sader 1998; Bellon 2010), on peut tirer la valeur de la constante de raideur du levier :

$$S_d(\omega) = -\frac{4k_BT}{\omega} Im\left(\frac{1}{G(\omega)}\right) = A_0 + \frac{4k_BT}{\omega_0} \frac{\frac{1}{Q}}{\left(1-\frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)^2 + \frac{\omega^2}{\omega_0^2 Q^2}} \tag{2.20}$$

où $G(\omega)$ fonction réponse (rapport de la déflexion du levier en fonction d'une force extérieure oscillante à la fréquence ω)

où $Im\ (G(\omega))$ est la partie imaginaire de $G(\omega)$.

et où $A_0 = constante$, $\omega_0 = 2\pi f_{res}$, $f_{res} = 2\pi\sqrt{\frac{k_{lev}}{m}}$ $Q = \frac{m\omega_0}{\gamma}$ et $\omega = 2\pi f$

Le paramètre m représente la masse effective, c'est-à-dire la somme de la masse du levier avec celle du fluide déplacé, caractérisé par une viscosité γ.

Bien que la mesure de k_{lev} nécessite la connaissance de la sensibilité S, la raideur intrinsèque du levier n'en dépend pas. Elle ne dépend que des propriétés géométriques du levier.

Les courbes d'approche brutes obtenues représentant l'évolution de la tension aux bornes de la photodiode (en V) peuvent maintenant s'exprimer en termes de force (en N) en multipliant par $S.k_{lev}$.

c. Réalisation des courbes

Avant chaque expérience de nano-indentation, une image est réalisée pour positionner la pointe au-dessus du virus. Je réalise une image de quelques centaines de nanomètres de côté contenant une particule isolée dans les conditions décrites dans la partie Chap. II.3.1.b. J'effectue ensuite différentes expériences d'indentation, c'est-à-dire un aller-retour de la pointe vers la surface en présence ou non d'une particule virale.

Pour chaque courbe d'approche, il est nécessaire d'optimiser plusieurs paramètres expérimentaux que je définis ici (figure 2.30):

- L'échantillonnage : Le nombre de points constituant la courbe ne doit pas être ni trop faible pour avoir assez d'information mais ni trop nombreux ce qui rajouterait du bruit superflu à la mesure. Les courbes d'indentation sont constituées de 1024 points.
- La déflection maximale autorisée (ou *trigger*) : Dès que la déflection du levier atteint cette valeur lors de l'approche de la pointe vers la surface, celui-ci arrête sa course et s'éloigne de nouveau de la surface. Ce paramètre sera indiqué pour chacune des expériences. Il permet de contrôler la déflection maximale (c'est-à-dire la force maximale appliquée).
- La distance verticale totale parcourue par la pointe (ou *RampSize*) : La pointe doit être initialement éloignée de la surface pour qu'il n'y ait aucune interaction parasite. La *RampSize* choisie est de 200 nm.
- Le temps nécessaire pour réaliser une courbe. Exprimé comme une fréquence, ce temps va définir la vitesse d'approche de la pointe vers la surface. La fréquence sera généralement de 1 Hz (une expérience d'indentation, un aller-retour, prend une seconde pour être réalisée), ce qui correspond à une vitesse d'approche de 400 nm/s).

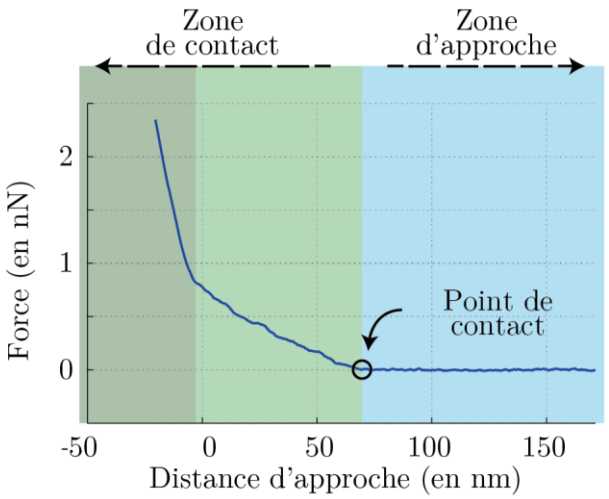


figure 2.30 - Exemple de courbe de force
Courbe de force obtenue après une expérience de nanoindentation sur une VLP du VIH-1 avec un levier dNPS, k_{lev} = 0,6 N/m. Elle est constituée de 1024 points. Le trigger est de 20 nm ce qui correspond à une force maximale de 2,4 nN, dans ce cas. Le paramètre *Ramp Size* est de 200 nm (le traitement expliqué par la suite amène une réduction du nombre de points aux extrémités de la courbe). La durée de réalisation de la courbe est de 0,5s). On peut découper la courbe en trois parties. La zone d'approche et la zone de contact sont séparées par le point de contact correspondant au moment où la pointe touche l'objet.
La zone de contact peut présenter plusieurs régimes comme c'est le cas ici.

Pour étudier la réponse nano-mécanique des virus, une courbe de force doit être réalisée sur la particule, de préférence en son centre. Plusieurs stratégies peuvent être choisies :

La première méthode est de réduire le cadre de l'image autour de la particule jusqu'à n'avoir qu'un carré de 1 nm puis d'indenter. Cette méthode est extrêmement sensible à la dérive thermique, c'est-à-dire

qu'entre le moment où la dernière image est réalisée et le moment où l'approche est faite, l'objet risque fortement de ne pas rester à la même position. Du fait de la grande dérive du système, de la taille du virus et de l'image réalisée, cette méthode n'a pas été utilisée.

La deuxième méthode consiste à réaliser une image d'une particule virale puis à se placer à côté de celle-ci et à réaliser des courbes de force à intervalle de temps régulier. Si le levier est positionné judicieusement, la dérive thermique fera passer la particule sous la pointe (figure 2.31). Cette méthode reste « à l'aveugle » et on ne peut pas savoir si une des expériences a été réalisée au centre de la particule. Cette méthode a été utilisée avant ma thèse en l'absence de la troisième méthode.

La troisième méthode consiste à définir, après avoir imager une particule, un maillage de points où seront réaliser les courbes de force grâce au système de *Point&Shoot* du logiciel de l'AFM (*Bruker*) (figure 2.31). Cette méthode a été privilégiée car elle résout le problème de l'aveugle puisque nous ne cherchons le centre que lors du traitement. Elle permet également d'obtenir des informations sur différents points de la particule ce qui peut être intéressant dans le cas de structures fortement inhomogènes comme les VLPs du

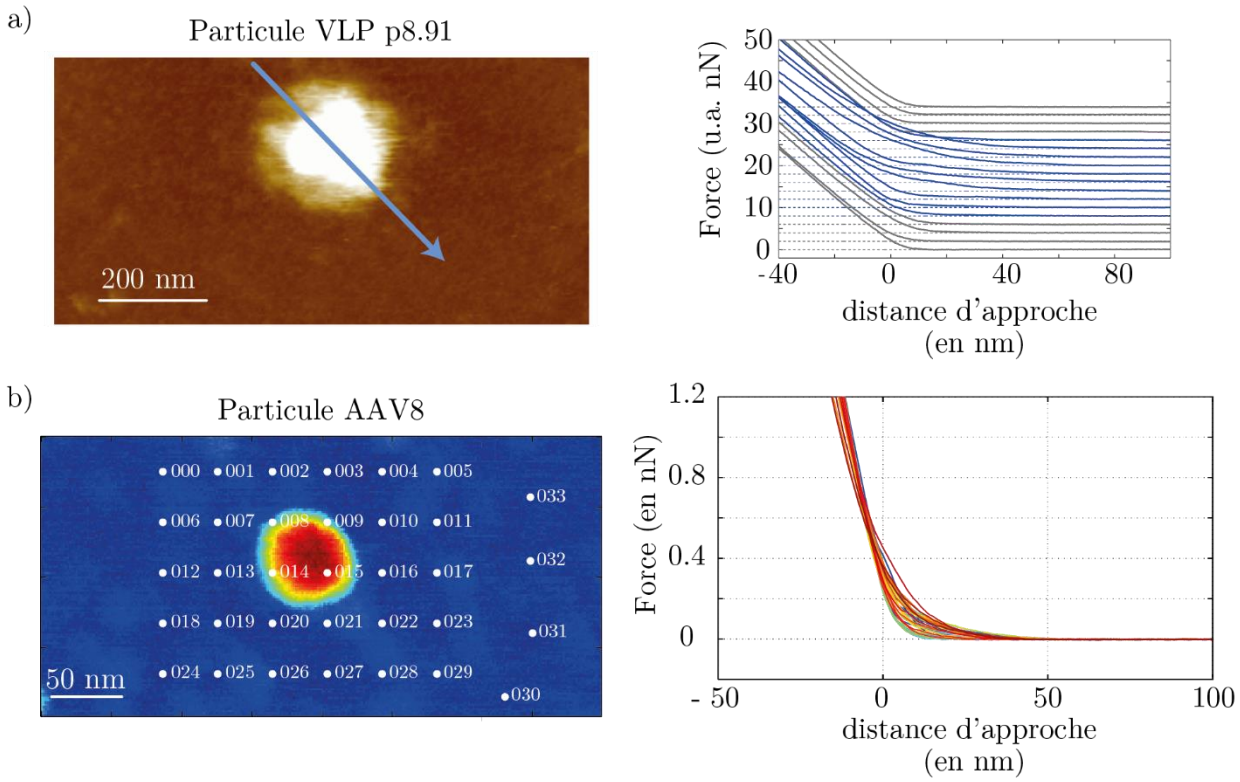


figure 2.31 - Protocole des expériences d'indentation
a) Méthode de la dérive thermique. (à gauche) On image en premier une particule (ici, une VLP de VIH-1 dans TE). On se place sur la surface, dans la direction de la dérive de la surface. (à droite) On réalise des expériences d'indentation de manière régulière. On voit un changement de l'évolution de la courbe pour certaines courbes : indentation sur la particule (en bleu) et indentation sur le mica (en gris). Les courbes ont été décalées en F pour une meilleure visibilité.
b) Méthode du *Point&Shoot*. (à gauche) On image en premier une particule, (ici, une capside de AAV8). (à droite) On réalise une grille de points : en chacun des points, une expérience d'indentation (approche et retrait) est réalisée. On peut voir des différences entre les courbes. Les courbes sont ici alignées sur le point de contact pour une meilleure visibilité.

VIH-1 qui contiennent un core rigide dans une enveloppe molle. Nous obtenons à la fin de chaque expérience *Point&Shoot* une image associée à une quarantaine de courbes brutes (avec leurs positions sur l'image). Ces courbes doivent sont ensuite traitées puis analysées.

2. Traitement des courbes

a. Prétraitement

En réalité, la courbe brute est une fonction de la tension aux bornes de la photodiode en fonction de l'approche verticale vers la surface. Elle se présente en deux parties : la zone d'approche et la zone de contact dans la figure 2.30.

En multipliant les valeurs de tension de la diode par la sensibilité S et la raideur k_{lev}, on représente les courbes de force (en N) en fonction de l'approche du porte-levier vers la surface (en nm) (figures 2.32.a et 2.32.b).

Les courbes restent extrêmement bruitées. Une opération de lissage de type boite glissante moyenne est donc réalisée sur chacune des courbes (figure 2.32.c). La largeur de la boite glissante w_c permet de plus ou moins lisser la courbe. Un lissage trop important risque de flouter les informations physiques pertinentes tandis qu'un lissage trop faible risque de laisser trop de bruits cachant les informations.

On peut remarquer que la force de la zone d'approche n'est pas nulle alors qu'aucune interaction ne doit exister entre la surface et le levier. Cela est dû à une détermination arbitraire du zéro en force. Pour pallier à ce problème, la valeur moyenne d'une partie de la zone d'approche (environ entre le 1er point et le 500e point – à droite donc) est soustraite à toute la courbe (figure 2.32.d) forçant ainsi la zone d'approche à avoir une valeur de moyenne nulle (figure 2.32.e).

Pour pouvoir comparer les courbes les unes aux autres, nous avons recherché une même origine du repère orthonormée (figure 2.32.e). A chacune d'elles, nous réalisons deux ajustements linéaires, le premier autour des 10 à 20 derniers points de la courbe, le second entre le premier et le 500e point. Nous définissons ainsi deux droites qui se coupent en un point O. Un changement des coordonnées de la courbe permet de définir ce point O comme nouvelle origine du repère (figure 2.32.f). Cette définition du point est surtout utile dans le cas où l'indentation est importante. En effet, dans cette situation, les 20 derniers points d'une courbe correspondent, grossièrement, à la déformation unique du levier et donc ne dépend pas de ce qui se trouve en dessous de la pointe (ni de la particule, ni de l'endroit) mais seulement du levier (la sensibilité et sa raideur). En faisant défiler les différentes courbes réalisées avec la même indentation, il est donc facile de voir l'évolution la zone correspondant à la déformation du virus en fonction des positions ou des virus étudiés (figure 2.32.f).

b. « Zoologie » des courbes d'approche

Les courbes d'approche présentent une forme caractéristique que l'on peut séparer en deux zones (figure 2.30) : la zone d'approche, où il n'y a pas d'interaction entre la pointe et la surface étudiée, et la zone d'appui, où la pointe rentre en contact avec la surface. Au niveau de la transition se trouve le point de contact.

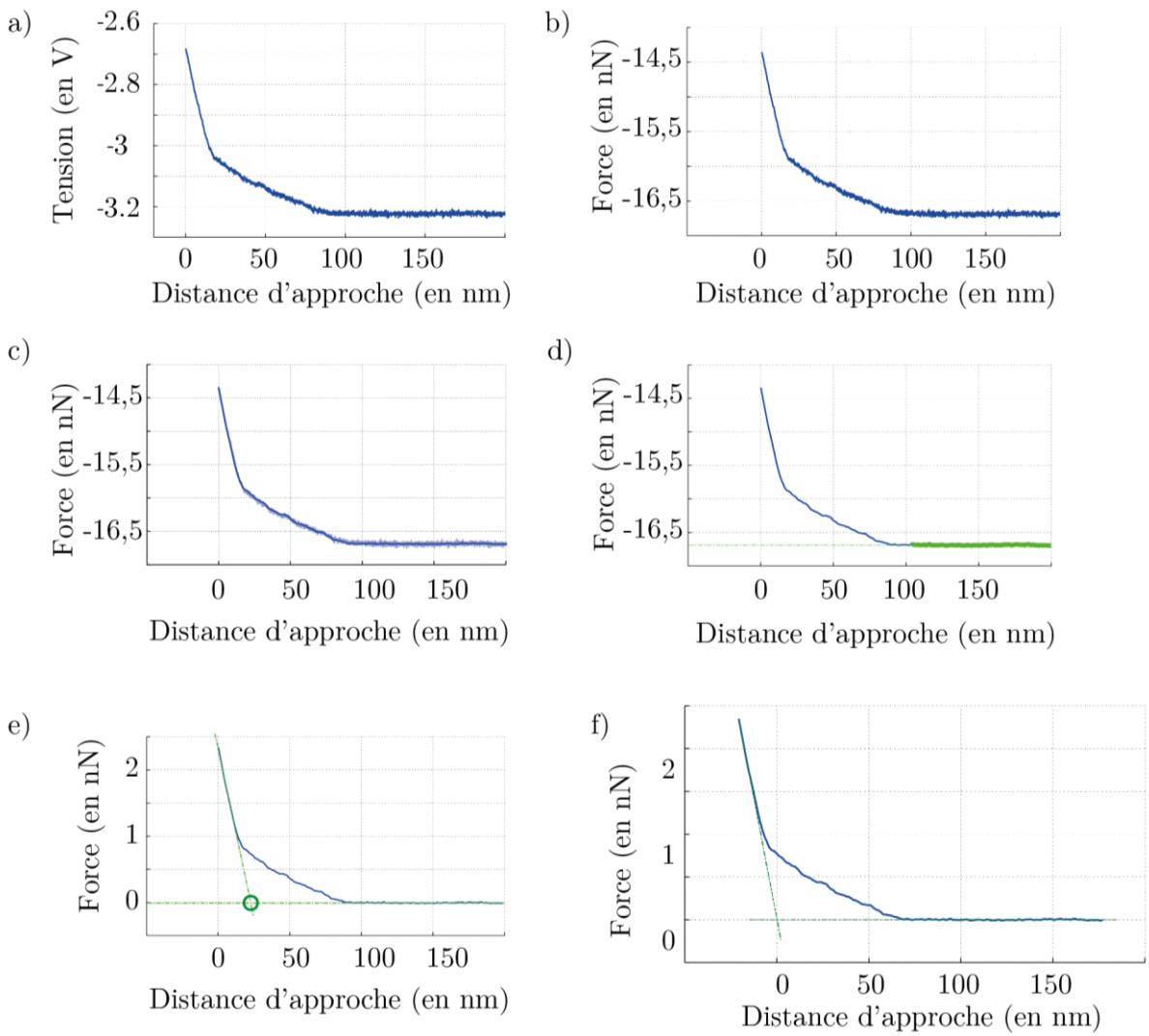


figure 2.32 - Traitement des courbes de force

a) Courbe de force brute obtenue après une expérience de nano-indentation. Seule la courbe d'approche est représentée. L'ordonnée représente la tension aux bornes de la photodiode quatre quadrants (en volts).

b) Connaissant la raideur du levier et la sensibilité, on obtient la courbe de force exprimée en newtons après multiplication de la tension par k_{lev} et S.

c) La courbe de force étant très bruitée, un lissage gaussien est réalisé.

d) Pour imposer une force égale à zéro pour la zone d'approche (le levier n'étant pas défléchi), on soustrait à la courbe la moyenne de la force de la zone verte.

e) On réalise un ajustement linéaire sur les derniers points de la courbe (à gauche sur la courbe). On définit la nouvelle origine du repère comme le croisement entre cette droite et l'axe des abscisses.

f) Courbe représentant la force (en nN) en fonction de la distance d'approche (en nm).

La lecture se fait de la droite vers la gauche : l'abscisse correspond à z la distance d'approche entre le porte levier et la surface (figure 2.30). Plus le levier se rapproche de la surface plus z diminue. L'ordonnée représente la force exercée par le levier sur l'objet en dessous de la pointe.

Au niveau de la zone d'appui plusieurs régimes peuvent être présents dépendant de la nature de l'objet étudié (capside AAV, VLP VIH-1, surface dure…), du levier utilisé mais aussi les différents paramètres de contrôle présentés précédemment.

Dans cette partie, je présente très sommairement l'allure des courbes d'indentation dans différentes conditions expérimentales.

Surfaces dures vs surface molle

Lorsque la pointe appuie sur une surface dure, le levier va se déformer de façon linéaire. La pente sera alors égale à l'opposé de la raideur (figures 2.33.b et 2.33.c).

Par contre, comme nous pouvons le voir dans la figure 2.30 lorsque la pointe appuie sur une surface molle (comme un virus par exemple), on remarque deux régimes : le premier, pour lequel le levier va d'abord se déformer en suivant également les déformations de l'objet, le second régime présente quant à lui une pente de $-k_{lev}$, tout se passe comme si le levier appuyait sur une surface dure : le virus est trop aplati pour se déformer. La raideur du virus augmente donc fortement, on quitte le modèle du 1er ordre.

Dérivée de la courbe de force

Il est facile de calculer l'évolution de la dérivée en fonction de l'approche. Pour cela, en chaque point de la courbe, on calcule la valeur de la dérivée par la méthode de l'ajustement linéaire (figure 2.33.c) sur une dizaine de points de part et d'autre (déjà présentée pour la mesure de l'angle des cores du VIH-1, voir Chap. 2.III.2.c).

On reconnait alors les différents régimes décrits plus haut. La dérivée dans la zone d'approche est nulle puisque la force reste constante nulle. Juste après le point de contact, la dérivée traverse différents régimes jusqu'à arriver à une valeur caractéristique $-k_{lev}$.

La dérivée d'un signal bruité est par nature encore plus bruitée : c'est le cas de la dérivée d'une courbe de force. Un lissage est donc également réalisé, en suivant le même protocole que pour la courbe de force. Pour ne pas perdre l'information et la présence de paliers, la courbe de force est moins lissée que la dérivée.

Déflexion maximale

Comme présenté dans la partie précédente (Chap. 2.II), le paramètre de déflexion maximale contrôle la force appliquée sur la surface. Différents régimes peuvent apparaitre selon la valeur imposée : on peut remarquer que plus on appuie plus on parcourt différentes pentes, ce qui se traduit par un balayage des dérivées entre 0 jusqu'à la valeur minimale $-k_{lev}$ si on appuie assez fort (figures 2.33.B et 2.33.c).

Les courbes suivent la même évolution à condition qu'il n'y ait pas de cassure de la structure du virus. Dans le cas d'une cassure, on observe une rupture de la courbe franche avec un changement rapide du sens de la pente (et donc du signe de la dérivée) (figure 2.33.c).

c. Raideur et modèle du 1er ordre

Nous recherchons au premier ordre la présence d'un régime linéaire lorsque le levier commence à appuyer sur la particule.

Dans ce cas, on modélise le système mécanique {*Virus* + *Levier*} par un ressort de raideur k_{mes} la pente de la courbe (figure 2.34). On définit alors l'indentation totale comme la distance de déformation du système

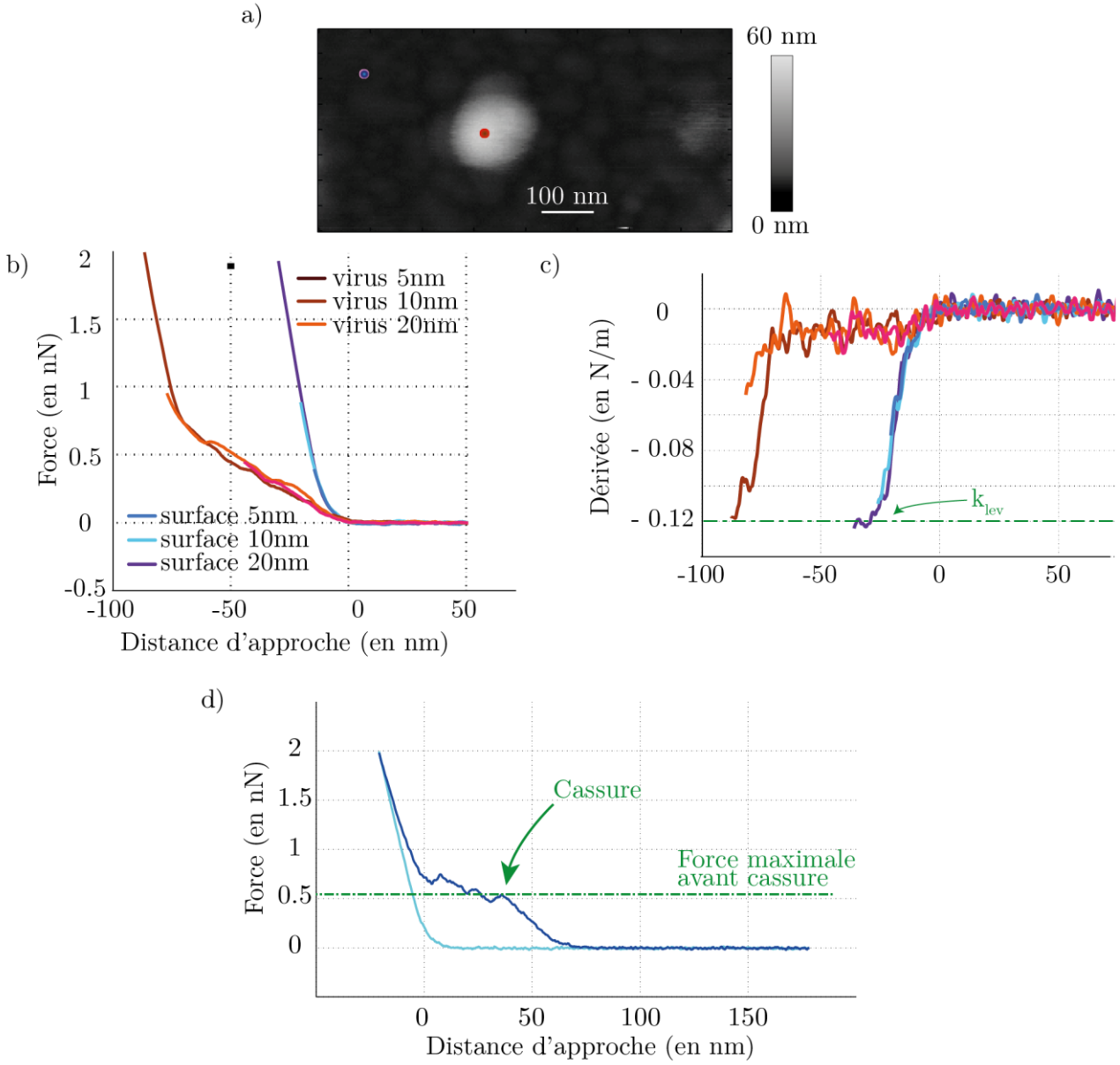


figure 2.33 – « Zoologie » des courbes de force

a) Avant chaque expérience, une image est réalisée pour permettre de visualiser la particule, ici une VLP VIH-1. Six expériences d'indentation ont été réalisées avec un levier dNPS de raideur 0,12 N/m, trois sur la surface, trois autres sur la particule, chacune d'elle ayant une déflexion maximum différente.

b) Courbes de force (en nN) en fonction de l'approche du levier vers la surface (en nm) pour différentes déflexions maximales (5, 10 et 20 nm). L'origine de l'approche est définie par le point de contact. Lorsque l'indentation est réalisée sur la surface (couleurs froides), le régime du levier arrive rapidement. Lorsque l'indentation est réalisée sur le virus (couleurs chaudes), on passe par un régime intermédiaire. La déflexion maximale doit être assez importante pour atteindre le régime du levier (supérieure à 10 nm).

c) Dérivée (en N/m) des courbes de force d'approche définies en b). On observe que, pour les courbes réalisées sur la surface (couleurs froides), le palier à -0,12 N/m est atteint. Pour les courbes réalisées sur le virus, on passe par deux comportements intermédiaires, ici un palier autour de -0,02 N/m et un autre -0,1 N/m. Lors d'une expérience d'indentation, on balaie la plage des raideurs entre 0 N/m et la raideur du levier k_{lev}.

d) Exemple d'une courbe d'approche où le virus s'est cassé sous l'effet de la force. La force maximale atteinte avant la cassure est de 0,55 N.

δ_{tot}. Il est important de remarquer que dans toute cette zone linéaire, δ_{tot} et la distance entre le *chip* et la surface sont égales à une constante près (la dérivée de la courbe de force donne bien k_{mes}).

En étudiant la force exercée par le *chip* sur la surface :

$$\vec{F}_{surface\rightarrow chip} = k_{mes}\delta_{tot}\overrightarrow{u_z} \tag{2.21}$$

$$\vec{F}_{pointe\rightarrow chip} = k_{lev}\delta_{lev}\overrightarrow{u_z} \tag{2.22}$$

Or de proche en proche et par application des principes de la mécanique classique[4], on obtient les égalités :

$$\begin{cases} \vec{F}_{surface\rightarrow chip} = \vec{F}_{surface\rightarrow pointe} = \vec{F}_{pointe\rightarrow chip} \\ \delta_{tot} = \delta_{lev} + \delta_{vir} \end{cases} \tag{2.23}$$

Donc :

$$\delta_{vir} = \frac{\vec{F}_{surface\rightarrow chip}.\overrightarrow{u_z}}{k_{mes}} - \frac{\vec{F}_{pointe\rightarrow chip}.\overrightarrow{u_z}}{k_{lev}} = \left(\frac{1}{k_{mes}} - \frac{1}{k_{lev}}\right)\vec{F}_{surface\rightarrow pointe}.\overrightarrow{u_z} \tag{2.24}$$

On obtient donc une relation linéaire entre la déformation du virus et la force $\vec{F}_{surface\rightarrow pointe}$, ce qui sous-entend que le virus peut être modélisé par un ressort de constante k_{vir}.

Dans ce cas, la valeur de la pente de la zone de contact donne directement la constante de raideur de la particule à l'opération mathématique près :

$$k_{vir} = \frac{k_m * k_{lev}}{|k_{lev} - k_{mes}|} \tag{2.25}$$

Plusieurs méthodes ont été proposées pour déterminer k_{mes} soit à partir de la courbe de force en fonction de z soit à partir de la dérivée de courbe de force.

Pour plus de renseignements sur le modèle du 1er ordre et de l'indentation sur des virus, on peut se référer à ces travaux (Buenemann & Lenz 2007; Buenemann 2008) s'appuyant sur les recherches de (Helfrich 1973) à propos des bicouches lipidiques.

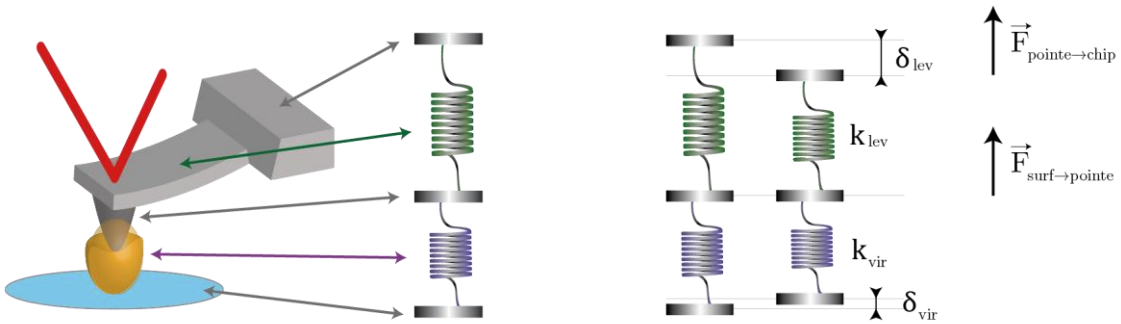


figure 2.34 - Modèle du premier ordre
Analogie entre le système mécanique {Virus + Levier} et deux ressorts en série (à gauche). Schémas de compression des ressorts lorsque la pointe est en contact avec le virus (à droite). La déformation du système mécanique est égale à la somme $\delta_{lev} + \delta_{vir}$.

[4] La pointe se déplace à vitesse constante lors de l'approche.

L'ajustement linéaire de la courbe de force (figure 2.35.a)

En considérant la zone où la particule commence à être déformée, on réalise un ajustement linéaire sur une vingtaine de points. Cette méthode nous permet d'obtenir rapidement une idée de la valeur de la raideur mais ne permet d'évaluer facilement et rapidement l'écart existant avec un modèle non linéaire.

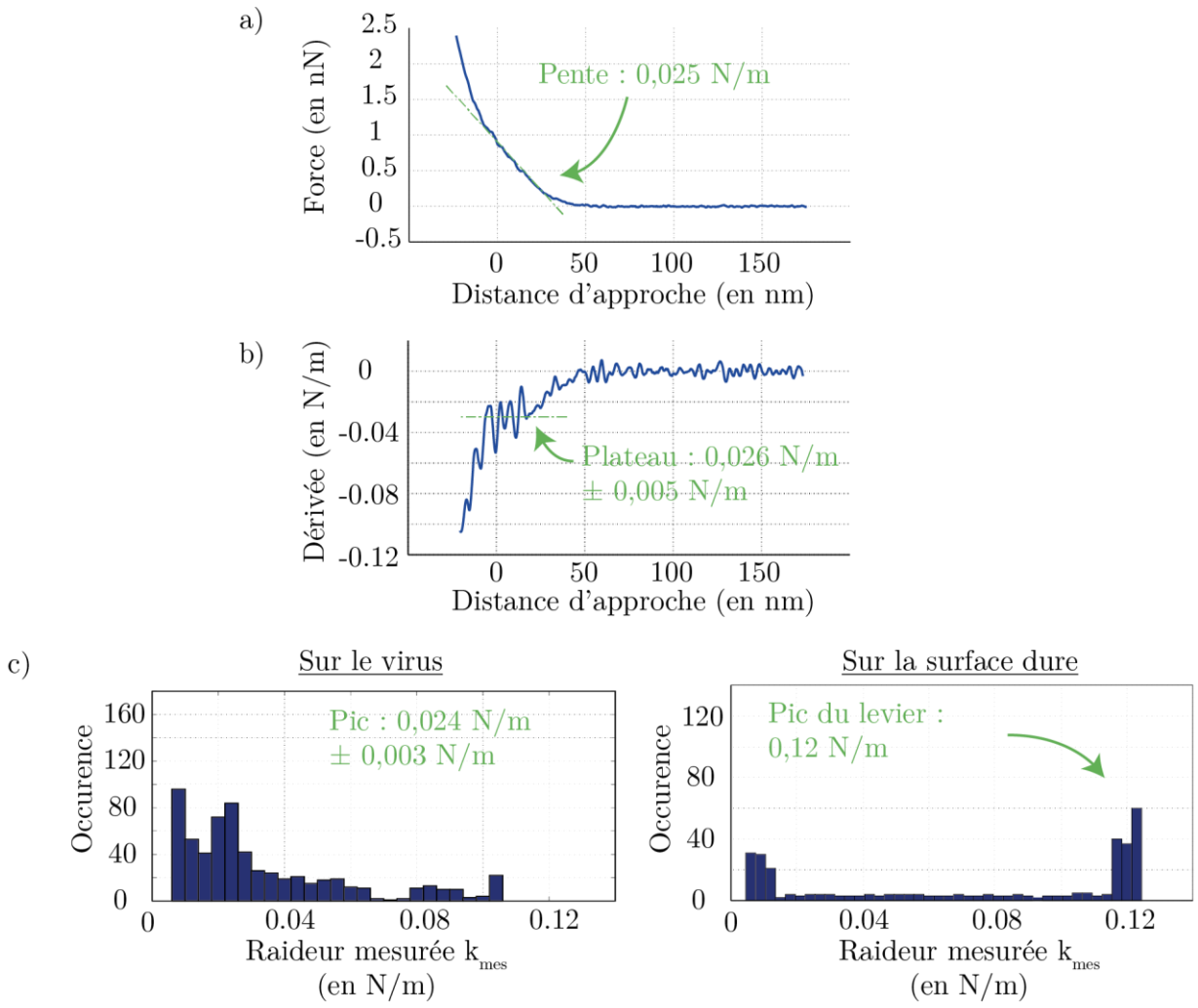


figure 2.35 - Détermination de la constante de raideur k_{mes}

a) Courbe d'approche réalisée au centre d'une particule VLP du VIH-1 avec un levier de raideur k_{lev} = 0,12 N/m. Une méthode pour trouver la valeur de k_{mes} est de faire un ajustement linéaire sur la zone où le virus est déformé progressivement par la pointe (ligne verte). Le coefficient directeur, si l'ajustement est justifié, est l'opposé de la constante de raideur k_{mes}.

b) Dérivée de la courbe d'approche réalisée en a). On remarque que la dérivée d'une courbe de mesure reste extrêmement bruitée, un lissage est réalisé pour permettre une meilleure lecture de la courbe.

Une deuxième méthode pour trouver k_{mes} est de repérer un palier sur la dérivée de la courbe de force ce qui, malgré le lissage, reste difficile.

c) Histogramme des valeurs de la dérivée de la courbe d'approche sur le virus (à gauche), sur une surface dure (à droite). Une dernière méthode consiste à réaliser l'histogramme des valeurs de la dérivée. Sachant que s'il existe un palier sur cette dernière, un pic apparaitra pour la valeur k_{mes}, correspondant au comportement linéaire de la courbe de force. Sur le virus, on remarque un pic à 0,024 N/m (avec une largeur de 0,003 N/m). Sur la surface, on peut voir un pic à la valeur de la constante de raideur du levier (k_{lev} = 0,12 N/m).

Mesure des paliers sur la courbe de dérivée (figure 2.35.b et 2.35.c)

L'existence d'un régime linéaire se traduira par la présence d'un plateau sur la dérivée de la courbe de force.

Cependant, le passage à la dérivée amène une augmentation du bruit du signal. Une étape de lissage est donc réalisée. Le lissage va dépendre de la largeur de la boite w_d dans lequel se trouvent les points utilisés pour l'ajustement linéaire de part et d'autre du point de calcul. Plus w_d sera grand, plus la dérivée sera lissée. De nouveau, un lissage trop important risque de provoquer une perte d'informations.

Un histogramme des valeurs de la dérivée est ensuite calculé.

Sur cet histogramme, il apparaitra un pic important autour de $k \simeq 0$ N/m relatif à la première zone, lorsque la pointe n'est pas en interaction avec la surface. Un deuxième pic caractéristique peut apparaitre dans le cas où l'appui est très important et on atteint le régime où seul le levier se déforme autour de k_{lev}. La présence d'autres pics signifie alors l'existence d'un régime linéaire et d'une raideur égale à la valeur du pic.[5]

Cette méthode permet de réaliser une moyenne de k_{mes} sur plusieurs courbes de force.

d. Autres informations.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent (Chapitre 2.IV.5), plus l'appui est important, plus on parcourt la plage des dérivées. En contrepartie, l'objet est de plus en plus déformé. Une mesure de l'indentation δ_{vir} à partir des courbes de force donne une idée de la déformation subie par la capside virale. De plus, de nombreux modèles relient la force à l'indentation, comme le modèle d'Hertz.

Détermination de l'indentation

L'indentation, pour une force F donnée, est la distance parcourue par la pointe pour que la force d'appui atteigne F à partir du moment où le contact pointe/objet a commencé (figure 2.36.a). Elle ne s'obtient pas de manière analytique à partir d'une courbe de force et oblige de comparer la courbe étudiée (cas où le levier et l'objet peuvent être déformés) avec une courbe réalisée sur une surface dure (cas où seul le levier se déforme). En plaçant le point de contact des deux courbes au même endroit, l'indentation pour une force F donnée peut être lue comme la différence d'approche nécessaire pour atteindre cette force F (figure 2.36).

Le paramètre important est donc la détermination du point de décollement de ces courbes, c'est-à-dire le point de contact entre la pointe et la surface. Cette opération est délicate, le bruit étant une source d'erreur importante. Pour cela, plusieurs étapes préliminaires ont été mises en place :

1. On se place dans la zone d'approche relativement proche du point de contact.
2. En se déplaçant vers le point de contact, on détermine l'évolution de l'intégrale entre le point initial et le point étudié (c'est-à-dire l'aire algébrique sous la courbe entre ces deux points).
3. Dès que l'aire dépasse une certaine valeur seuil imposée égale à deux fois la variance du bruit de la zone d'approche, cela nous donne un point de contact préliminaire.

---

[5] Nous utilisons cette technique pour vérifier la valeur de la sensibilité déterminée initialement, nous réalisons l'histogramme total de plusieurs courbes réalisées sur une surface dure. Si le deuxième pic sortant ne correspond pas à k_{lev}, la sensibilité doit être corrigée jusqu'à l'obtention d'un pic au bon endroit.

4. A partir de cette position, on raffine le résultat en calculant la dérivée de la courbe toujours en se déplaçant vers la zone d'appui : dès que sa valeur dépasse en valeur absolue les fluctuations du bruit de la zone d'approche, ce point est considéré comme le point de contact.

Modèle d'Hertz (figure 2.36.b).

Il existe théoriquement une loi de puissance entre la force d'appui et l'indentation dans le cas du contact de deux sphères :

$$F = \lambda\, \delta_{vir}{}^{\nu} \tag{2.26}$$

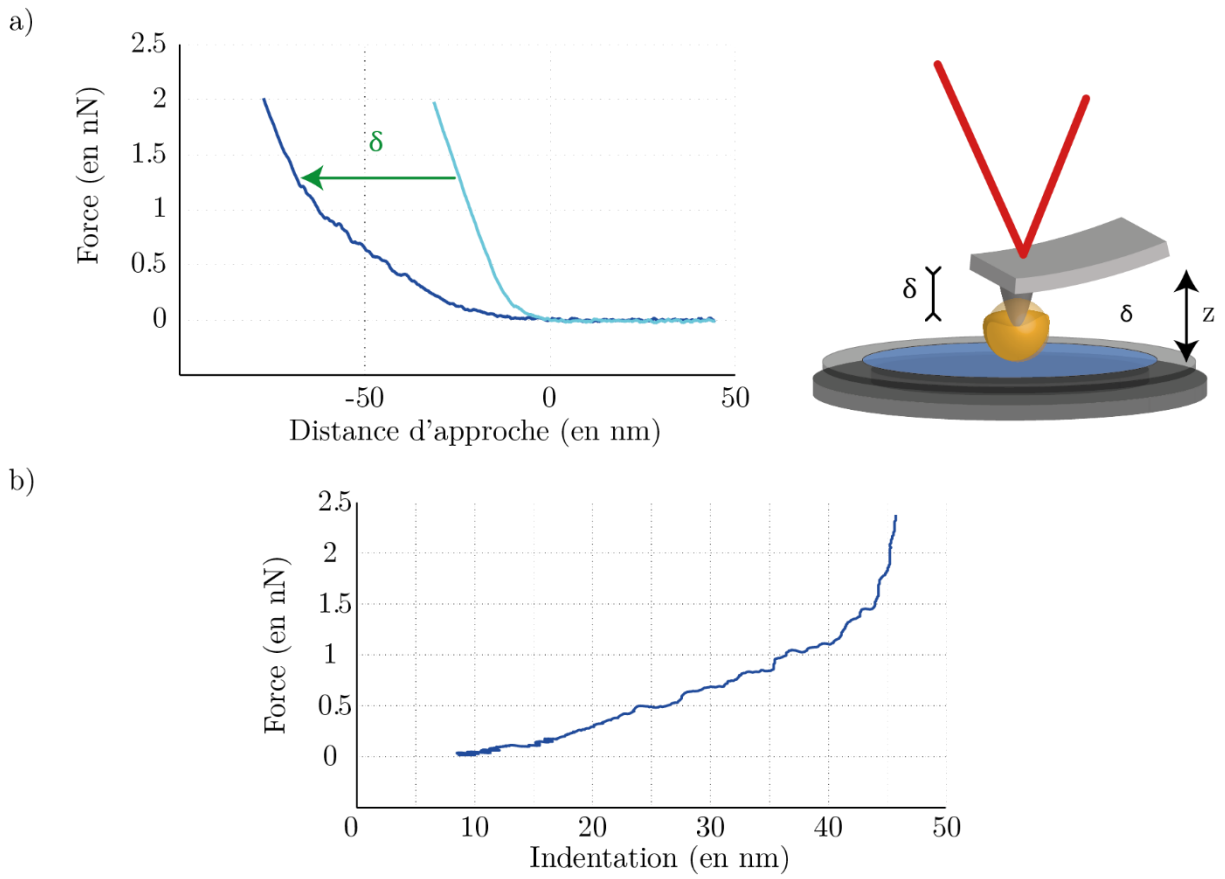


figure 2.36 - Définition de l'indentation

a) Définition de l'indentation. Courbe d'approche avec un levier dNPS sur une VLP p8.2 (en bleu foncé) et sur une surface de mica fonctionnalisée (en bleu clair). L'indentation est définie pour une force F : il s'agit de la différence de distance d'approche entre le cas d'une indentation sur l'objet mou et sur la surface dure.

b) Force en fonction de l'indentation. La force diverge pour une valeur maximale de l'indentation autour de 45 nm, la pointe appuie tellement sur l'objet que seul le levier se déforme.

Dans le cas d'un régime linéaire de la force F en z, on a également un régime linéaire entre F et δ_{vir} : l'exposant ν est égal à 1. L'ajustement des courbes par ce modèle via un programme d'analyse automatisé n'a malheureusement rien donné. Il ne sera donc pas présenté ici.

e. Cartographies

Pour chaque *Point & Shoot* réalisé, on obtient une image de la particule et un ensemble de points où ont été réalisées des expériences de nano-indentation, approche et retrait. Pour chacune des courbes de force, on peut extraire différentes informations, comme l'indentation maximale, la pente de la courbe juste après le point de contact ou encore l'aire sous la courbe (figure 2.37).

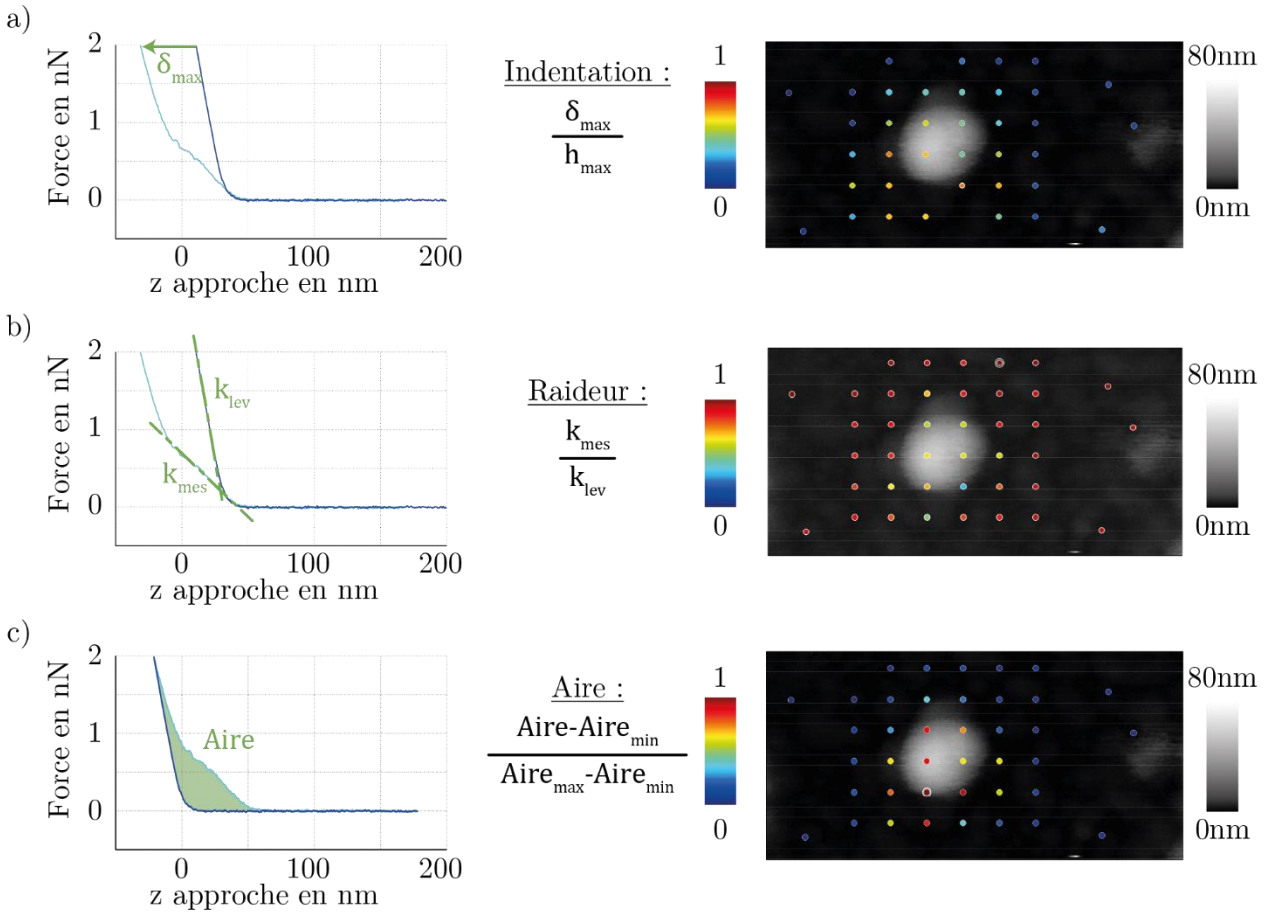


figure 2.37 – Cartographie de courbes de force et analyses
On sélectionne une courbe de *Point&Shoot* représentative du comportement sur la surface dure.
a) Carte d'indentation. (à gauche) On détermine l'indentation maximale pour chacune des courbes réalisées lors d'un *Point&Shoot* (en bleu foncé) grâce à une courbe obtenue lors d'une expérience sur la surface dure (en bleu clair). (à droite) A chacune des positions où a été réalisée l'expérience de nano-indentation, on évalue le rapport indentation maximale δ_{max} sur la hauteur maximale de l'objet h_{max}.
b) Carte des raideurs. (à gauche) On détermine la pente de la zone de déformation de la particule k_{mes} pour chacune des courbes réalisées lors d'un *Point&Shoot*. (à droite) A chacune des positions où a été réalisée l'expérience de nano-indentation, on évalue le rapport k_{mes} sur k_{lev}, où k_{lev} est la pente de la courbe obtenue sur une surface dure. Plus le point est rouge, plus la pente k_{mes} est proche de k_{lev}.
c) Carte des aires. (à gauche) Pour chacune des courbes réalisées lors d'un *Point&Shoot*, on détermine l'aire entre la courbe et celle obtenu lors d'une indentation sur la surface (à droite) A chacune des positions où a été réalisée l'expérience de nanoindentation, on évalue ainsi l'écart adimensionné entre l'aire calculée et l'aire minimale obtenue lors de cette expérience. Plus le point est rouge, plus la courbe s'écarte du cas de la surface dure.

Cette méthode permet de compenser le problème de dérive thermique du cristal piézoélectrique sur lequel se trouve la surface. En effet, entre le moment où est réalisée l'image de la particule et le moment où est réalisée l'indentation, le cristal se déforme naturellement déplaçant la particule en dessous de la pointe. La position de cette dernière n'est donc plus celle indiquée par l'image mais peut être retrouvée par cette méthode de cartographie d'indentation.

On détermine alors plus aisément, lorsque la sensibilité du système est assez bonne, le centre de la particule pour ne conserver que les courbes concernées. De plus le comportement de la courbe est différent, que l'on se place au centre, sur les bords de la particule ou sur la surface autour, ce qui permet de pouvoir les comparer en sachant où l'on se trouve.

Ainsi, sur la figure 2.37.a, le critère est l'indentation maximale (c'est-à-dire de combien de nanomètres la particule est déformée). On peut voir que la position où la déformation est la plus importante ne correspond pas à ce qu'indique l'image de la particule.

La figure 2.37.b représente la carte du rapport entre la raideur mesurée k_{mes} et la raideur du levier k_{lev}. La mesure de la pente k_{mes} se fait grâce à un ajustement linéaire. On peut également voir un décalage entre la carte produite et l'image. Cette méthode ne nécessite pas une grande déformation du levier et est majoritairement utilisée dans le cas d'une faible indentation.

Le critère pour la carte de la figure 2.37.c utilise l'aire A se trouvant entre la courbe de force étudiée et la courbe de force obtenue sur la surface dure. De nouveau, le décalage est observé. Cette méthode est utilisée préférentiellement dans le cas d'une forte indentation qui permet de différencier facilement l'aire mesurée entre deux points.

Ces trois méthodes indiquent la même position du centre de la particule.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, les différentes démarches expérimentales ont été présentées, qu'elles appartiennent au domaine de la virologie avec la production et la purification des différentes particules virales, de l'instrumentation physique avec la manipulation du microscope à force atomique ou encore de l'analyse d'image et de signaux pour le traitement des différentes données récupérées.

En utilisant différents plasmides et protocoles expérimentaux, l'équipe de Delphine Muriaux pour le virus VIH-1 et l'équipe d'Anna Salvetti pour le virus AAV nous ont permis d'étudier par AFM un large éventail de particules, pouvant mimer une étape du cycle viral (comme les particules immatures du VIH-1 pGag) ou possédant différentes propriétés biologiques (comme les sérotypes du vecteur AAV).

Il a alors fallu adapter certains programmes d'analyse ou en créer de nouveau pour pouvoir exploiter les différentes données obtenues, qu'elles soient morphologiques ou mécaniques.

Nous allons pouvoir nous intéresser aux différentes problématiques exposées dans le premier chapitre (Chap.1) et tenter d'y répondre avec les expériences menées au sein du laboratoire de physique de l'ENS de Lyon, du laboratoire CIRI de l'ENS de Lyon, du laboratoire CPBS à Montpellier et du laboratoire de Physique de l'université Carnegie Mellon à Pittsburgh aux Etats-Unis :

- Mesurer des caractéristiques physiques de certains virus, des objets biologiques.
- Des objets qui sont biologiquement différents ont-ils des propriétés morphologiques et des propriétés mécaniques différentes ?
- La stabilité thermique d'un virus, définie comme la libération du génome à l'extérieur de la capside, dépend-elle de la nature de l'objet ? de la longueur du génome ?
- L'environnement a une action biologique sur la particule. Peut-il avoir un effet sur les propriétés physiques ?

Les expériences réalisées sur les virus, dans le cadre de ma thèse, peuvent se partager en trois grandes familles s'entremêlant les unes aux autres pour répondre aux problèmes posés :

- L'imagerie AFM pour l'étude statistique de la morphologie des virus et pour la visualisation de leurs stabilités sous différentes conditions.
- La nanoindentation pour les mesures de propriétés mécaniques des virus.
- Les gels d'électrophorèse pour la caractérisation de la stabilité de capsides et la détermination de leurs pressions internes.

J'expose dans les deux chapitres suivants les résultats obtenus sur les deux principales particules virales étudiées dans le cadre de ma thèse, à savoir :

- Les particules VLP de VIH-1 et les cores de VIH-1, avec différents mutants et variants ayant des propriétés biologiques différentes. Ces travaux font l'objet du chapitre 3.

- Les capsides AAV avec différents sérotypes et différentes longueurs et natures de génomes ayant des propriétés biologiques différentes. Ces travaux font l'objet des chapitres 4 et 5.

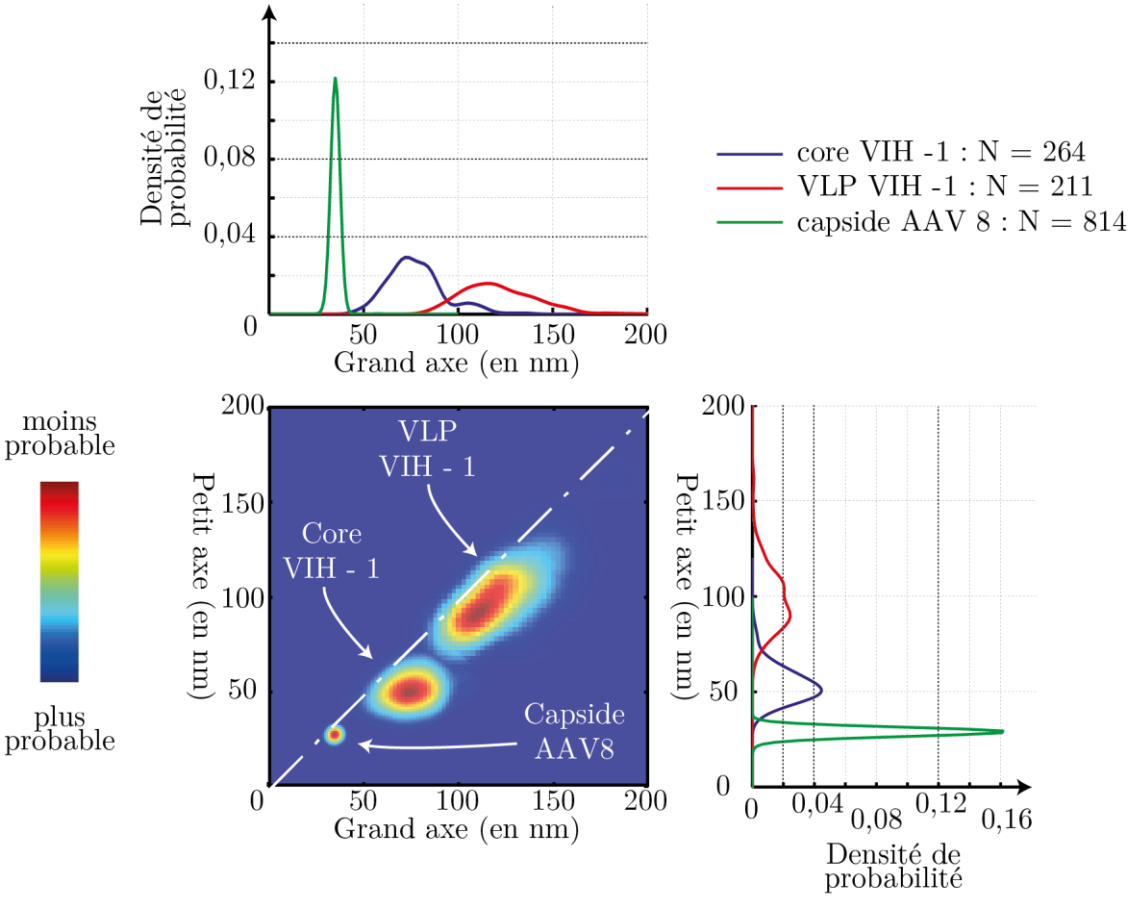


figure 2.38 - Carte de corrélation entre le petit axe et le grand axe des différents virus étudiés (capside AAV de sérotype 8, cores p8.91 du VIH-1 et VLP p8.91 du VIH-1) et des densités de probabilité du petit diamètre et du grand diamètre.

Les densités de probabilité sont les projections de la carte de corrélation sur les axes des abscisses (grand axe) et des ordonnées (petit axe).

Plusieurs résultats peuvent être remarqués :

- Les VLP VIH-1 présentent une grande polydispersité en taille en comparaison avec la capside d'AAV8 (la tâche des VLP du VIH-1 est beaucoup plus étalée que celles des capsides d'AAV8).
- Les capsides d'AAV8 sont très peu polydisperses.
- Les cores présentent une forte asymétrie comparés aux capsides d'AAV8 et des VLP (la tâche s'éloigne de la première bissectrice comparés à celles des VLP du VIH-1 et d'AAV8).

Chapitre 3 Propriétés physiques du virus VIH-1

Ce chapitre s'attache à l'étude des propriétés morphologiques de VLPs, *Virus Like Particles*, et des cores du virus VIH-1 dont la production a été décrite dans le chapitre Chap 2.II.1. Pour mettre en évidence les propriétés morphologiques et mécaniques de VLPs et cores de différents variants du VIH-1, nous avons principalement utilisé l'AFM.

La première partie s'intéresse aux VLPs et aux cores obtenus grâce à l'expression du plasmide p8.2 dans des cellules eucaryotes stables transfectées (voir Chap. 2.II). Ces particules produites ressemblent biologiquement au VIH-1 sauvage puisqu'elles possèdent exactement les mêmes protéines (Gag, GagPol, Tat Rev, Vpr, Nef et Vif du VIH-1) sauf en ce qui concerne les protéines d'enveloppe qui sont absentes, elles sont aussi dépourvues d'ARN génomique remplacé par un ARN pseudo-viral. En utilisant du triton lors de la purification, l'équipe de Delphine Muriaux et celle d'Andrea Cimarelli ont isolé le core de la bicouche lipidique nous permettant ainsi d'imager « ce qui se trouve à l'intérieur » du virus et de voir, après analyse, si certains paramètres morphologiques entre le core et la VLP peuvent être reliés.

La deuxième partie s'attache à voir si des différences de propriétés physiques des variants de VLPs et de cores peuvent être observées par AFM et si une interprétation permettrait de les relier aux différentes propriétés biologiques connues de ces variants.

Seule l'expression de la protéine virale Gag dans une cellule permet la production d'une particule virale enveloppée contenant des protéines Gag assemblées et des ARNs viraux et cellulaires. Lors de la formation de cette particule virale par bourgeonnement de la membrane de la cellule, la présence du signal ψ sur l'ARN viral privilégie l'assemblage de Gag sur ce génome, et en son absence, l'assemblage des protéines virales Gag avec des ARNs cellulaires. La troisième partie de ce chapitre propose l'étude morphologique des VLP p8.91 et des

cores p8.91 ayant été assemblé *in cellulo* en présence ou en l'absence d'un génome pseudo-viral contenant le signal ψ, l'idée étant de regarder l'effet de la présence de l'ARN viral sur la morphogénèse des VLP et des cores.

Lorsque le virus entre dans la cellule, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire et libère le core viral dans le cytosol. L'étape de rétrotranscription produit l'ADN proviral à partir de l'ARN génomique, qui s'intégrera dans la cellule infectée. Au cours de cette étape, il y a ouverture du core viral. La dernière partie présente différents résultats préliminaires sur les expériences de déstabilisation des cores viraux en jouant sur le temps d'incubation des cores à 37°C.

Au cours de ma thèse, de nombreuses purifications ont été réalisées (environ une cinquantaine) mais la production de cores et de VLPs dépend de très nombreux paramètres comme la qualité des cellules productrices, l'alimentation des cellules en éléments nutritifs, l'étape de purification ou encore la température. A cause de toutes ces variabilités expérimentales, les comparaisons des différents objets, (entre VLPs et cores, entre variants…) se feront entre deux types d'objets issus d'une même purification.

I. Etude morphologique et mécaniques des VLPs et cores

La production de VLPs en utilisant le plasmide p8.2 selon le protocole décrit dans le chapitre Chap. 2.II.1 mène à des particules possédant les mêmes protéines structurales (CA, MA et NC) ainsi que les protéines régulatrices (Vif, Nef, Rep, Vpu, …) et les enzymes virales (la rétrotranscriptase RT, l'intégrase IN et la protéase PT) que la particule sauvage du VIH-1. Elles ont été produites à partir de cellules stables, exprimant l'ARN pseudo-viral contenant le signal Psi d'encapsidation (les VLPs p8.2 contiennent l'ARN +ψ). La glycoprotéine Env, la protéine accessoire Vpu et l'ARN génomique viral complet ne sont pas exprimées. Cette précaution nous permet de produire des VLPs et des cores non infectieux et donc analysables par AFM, dans l'air ou en liquide, sans fixateur. La production de cores p8.2 +ψ a également été faite.

L'étape de maturation (voir Chap. 1.III.3) change la structure du core passant de la forme immature, sphérique, à une forme mature conique ou cylindrique. Cette transformation morphologique se fait dans l'enveloppe lipidique du virus, donc dans un milieu fermé. Grâce à l'AFM, nous avons pu imager dans l'air, sans fixation, des cores et des VLP à l'échelle du virus unique et à haute résolution, pour des centaines d'objets ce qui nous a permis d'obtenir des caractéristiques morphologiques, statistiques des VLP et cores, en présence de l'ARN viral.

1. Images AFM obtenues

Les images (figure 3.1) ont été réalisées en *Tapping Mode* avec une pointe MPP11100 (Chap. 2.III) sur un dépôt de VLP et de cores p8.2 sur mica fraichement clivé et fonctionnalisé avec de la poly-L-lysine selon le protocole décrit précédemment (Chap. 2.II.3). Des dépôts issus de la purification Venus, ne produisant que des protéines non virales GFP et donc aucune VLPs, ont été également réalisés pour servir de contrôle au dépôt (figure 3.1.d et e).

Les images réalisées (généralement carrées) font 3µm de côté. Les VLPs ne dépassant pas 200 nm de diamètre, les images représentent plusieurs particules (environ une dizaine). En réalisant plusieurs dizaines d'images nous limitons une sélection arbitraire des objets rendant l'étude statistique plus objective.

On peut remarquer pour les VLPs (figure 3.1.b) la présence de nombreux objets et de hauteurs et de diamètres variés. Le contour caractéristique des particules sur la surface est circulaire (zooms à droite, sur la figure 3.1.a). Cependant, les particules ne sont pas sphériques, du fait de l'attraction par la surface fonctionnalisée. D'ailleurs, en se référant au code couleur de l'échelle des hauteurs, il semble que l'on puisse distinguer la présence du core, de forme souvent considérée comme conique, à l'intérieur de la VLP.

Sur les dépôts de cores p8.2 (figure 3.1.c), on observe des objets aux contours particuliers. Les zooms (à droite de la figure 3.1.c) mettent en évidence deux types de morphologie : une plus conique, faisant apparaitre deux calottes asymétriques aux extrémités reliées par une structure conique avec un angle caractéristique et une autre plus cylindrique, où l'angle est proche de 0. Cependant, les dépôts des cores restent plus pollués que ceux des VLPs faisant apparaitre d'autres objets plus irréguliers.

Sur le dépôt servant de contrôle (voir Chap. 2.II.3), Venus VLP (figure 3.1.d), on observe la présence de petits objets (une quarantaine de nanomètres de rayon). Il s'agirait vraisemblablement d'exosomes, qui sont des vésicules lipidiques, sécrétées par la cellule et ressemblant à des VLPs (Raposo & Stoorvogel 2013). Le dépôt

Venus cores (figure 3.1e) est plus propre que le précédent, ce qui peut s'expliquer par l'activité détergente du triton qui détruit les exosomes.

2. Caractérisation morphologique des VLPs et des cores

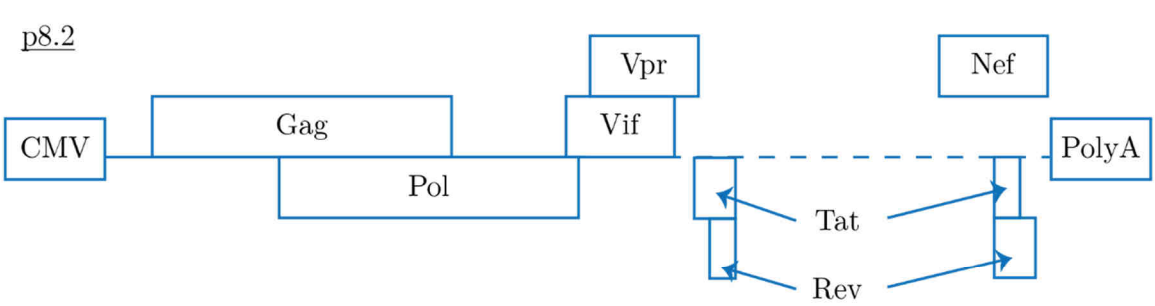
Une étude statistique des particules est donc possible en sélectionnant les particules imagées selon leurs dimensions caractéristiques via l'algorithme décrit dans le chapitre précédent (Chap. 2.III.2) sur plusieurs dizaines d'images. Il faut veiller à sélectionner les bons objets tout en évitant de biaiser le résultat de l'analyse morphologique par des conditions trop restrictives. Il sera ainsi possible de déterminer différentes propriétés statistiques comme la valeur caractéristique (ou valeur la plus probable) et la dispersion d'une grandeur morphologique en utilisant les représentations exposées au Chap. 2.III.2.

a. Critère de sélection

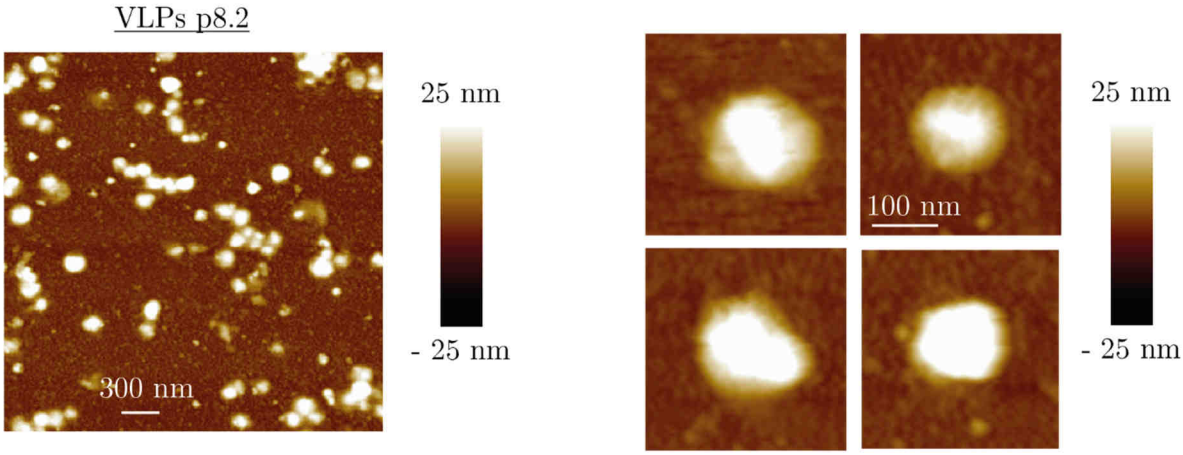
Dans le cas des VLPs, une analyse morphologique des objets présents sur le dépôt Venus VLP permet d'établir des critères de sélection pour exclure les exosomes potentiellement présents sur le dépôt des VLPs p8.2. Sur la figure 3.2, la densité de probabilité des petits et grands diamètres (en rouge) donnent des dimensions caractéristiques des exosomes respectivement de 55 nm et 75 nm avec une déviation standard de 30 nm et 40 nm. On voit que ces tailles caractéristiques sont également présentes comme un pic que l'on peut distinguer dans la densité de probabilité des VLPs non filtrées. Le critère d'aire minimale doit être judicieusement choisi pour permettre de supprimer efficacement ce pic dans les distributions des diamètres des VLPs sans perturber le reste de la distribution qui correspond alors essentiellement à des VLPs VIH-1. Ce critère est alors un peu moins de $A_{min} = 70 \times 95 \simeq 7000$ nm² pour les VLPs. Dans le cas des cores, il a été déterminé autour de $A_{min} = 5000$ nm², permettant de supprimer les débris présents dans le surnageant purifié (figure 3.1.e). Pour exemple, dans le cas des VLPs VIH-1, 24% des objets sélectionnés sans filtrage sont considérés comme étant des exosomes et sont donc exclus de la statistique.

figure 3.1 – Images AFM dans l'air de VLP et de cores du VIH-1.
a) Représentation schématique du plasmide utilisé lors de la transfection pour la production de particules p8.2. Les cellules utilisées appartiennent à la lignée dite stable, elles produisent un pseudo ARN viral avec le signal ψ qui permet l'encapsidation de l'ARN et donc, les particules produites contiennent le génome ARN ψ.
Images par AFM (b) de VLPs p8.2 (c) de cores p8.2 (d) de VLPs Venus et (e) de cores Venus sur une surface de mica fonctionnalisé par la Poly-L-Lysine (*Tapping Mode* avec une pointe MPP11100).
b) (à gauche) Image de 3µm par 3µm. Des chaines ou des amas de particules sont souvent observées mais un certains nombres de particules sont isolées les unes des autres. Ces particules sont sélectionnées, grâce au script Matlab, pour réaliser une étude statistique de leur morphologie. (à droite) Zooms de particules VLPs p8.2 isolées. Pour chacune de ces particules, on peut obtenir des informations morphologiques.
c) (à gauche) Image de 3µm par 3µm. Il y a peu de cores sur la surface comparé aux VLPs de l'image figure 3.1.b). Les particules déposées sur la surface sont celles qui ont pu résister aux différentes étapes de la purification. (à droite) Zooms de particules cores p8.2 isolées. On observe des cylindres et des cônes. Pour chacune de ces particules, on peut obtenir des informations morphologiques comme la hauteur, le diamètre équivalent ou encore l'asymétrie des objets mais également l'angle du core.
d) Ce dépôt correspond au contrôle négatif pour les VLPs. Une étude morphologique des particules présentes sur la surface nous permet de définir le filtre utilisé pour exclure les exosomes des images de VLPs.
e) Ce dépôt correspond au contrôle négatif pour les cores. Les images AFM confirment que le triton permet de supprimer les exosomes.

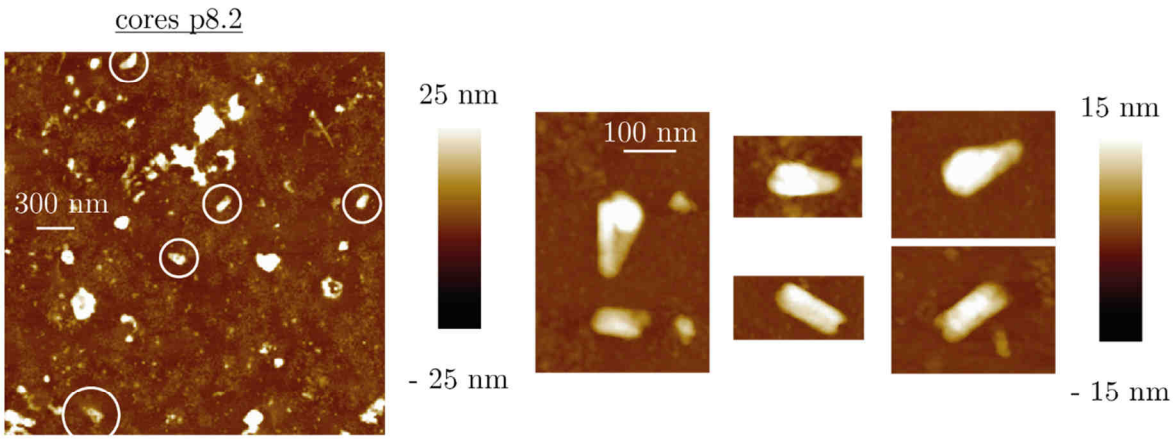
a)


p8.2
CMV
Gag
Pol
Vpr
Vif
Nef
PolyA
Tat
Rev

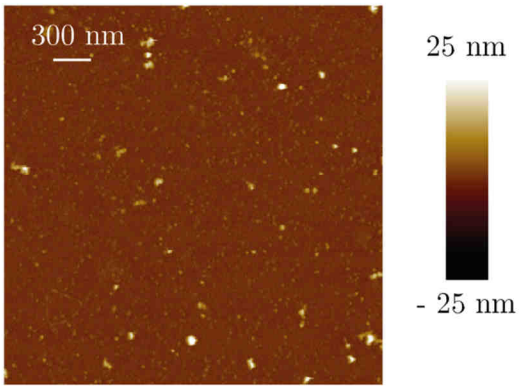
b)


VLPs p8.2
300 nm
25 nm
- 25 nm
100 nm
25 nm
- 25 nm

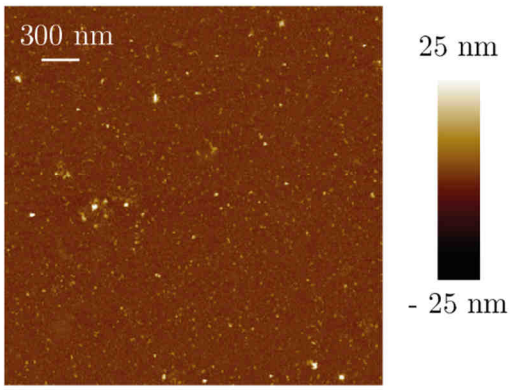
c)


cores p8.2
300 nm
25 nm
- 25 nm
100 nm
15 nm
- 15 nm

d)


VLPs Venus
300 nm
25 nm
- 25 nm

e)


cores Venus
300 nm
25 nm
- 25 nm

Les autres paramètres ont été définis pour permettre une bonne sélection des particules sans être trop restrictifs (Tableau 3.1). Les critères pour les cores diffèrent de ceux pour les VLPs puisque leur forme est fortement asymétrique montrant une direction privilégiée (axe de la partie centrale) : la sélection va donc privilégier les objets ayant une forte asymétrie ($\mathcal{A} < 0{,}75$) et un faible nombre fractal ($\mathcal{F} < 0{,}9$). En ce qui concerne la hauteur minimale, les cores étant contenus dans les VLPs sont plus petits ce qui se reflète dans ces critères de sélection. Le seuil de bruit doit être suffisamment haut pour pouvoir exclure le bruit mais également suffisamment bas pour permettre une bonne mesure de la morphologie des particules, sans perdre d'information.

On observe une diminution de la quantité d'objets sélectionnés avec le filtrage (environ 25 %) mais la proportion de véritables VLPs augmente et reste largement suffisant pour réaliser une étude statistique pertinente.

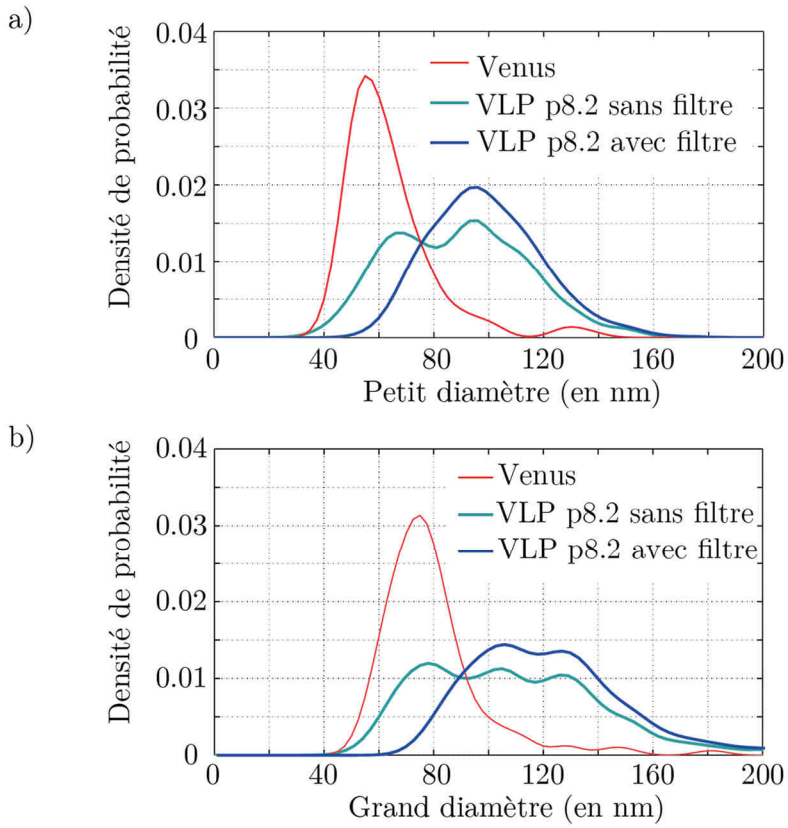


figure 3.2 - Calibration du filtre aire grâce au dépôt VLP Venus.
Densité de probabilité du a) petit diamètre et du b) grand diamètre pour les particules VLPs Venus (en rouge – N = 121) et VLPs p8.2 (en bleu clair – N = 683) sans critère de filtre. Les courbes associées aux particules Venus donnent les tailles caractéristiques (petit diamètre a_{exo} et grand diamètre b_{exo}) des particules issues de cette purification, c'est-à-dire des exosomes sortis des cellule. On détermine ainsi la valeur du filtre d'aire minimale par le produit entre a_{exo} et b_{exo}. L'application du filtre excluant les particules ayant une aire inférieure à 7000 nm² exclut la majorité des exosomes de la population des VLP p8.2 (en bleu – N = 517). Pour les cores, ce seuil a été déterminé autour de 5000 nm².

Le Tableau 3.1 renseigne sur les critères typiques utilisés lors de la sélection des particules. Cependant, devant la qualité de la purification ou de l'imagerie, ces paramètres ont été amenés à évoluer très légèrement.

Lors de la présentation des résultats, ceux-ci sont le fruit de l'analyse sur des images obtenues pour des purifications réalisées au même moment et pour un jeu de critères de filtrages identiques.

Paramètres des filtres	VLPs	Cores
Seuil bruit $h_{seuilbruit}$ (en nm)	8	5
Hauteur min $h_{seuilobjet}$ (en nm)	25	10
Aire min A_{min} (en nm²)	7 000	5 000
Aire max A_{max} (en nm²)	100 000	100 000
Nombre fractal min $\mathcal{F}_{min}$	0,75	0,6
Nombre fractal max $\mathcal{F}_{max}$	1,2	0,9
Circularité min $\mathcal{A}_{min}$	0,1	0,001
Circularité max $\mathcal{A}_{max}$	1	0,75

Tableau 3.1 – Valeurs typique des seuils de filtrage pour l'analyse morphologique des VLPs et des cores du VIH-1.

b. Comparaison de la morphologie entre les VLPs et les cores.

L'utilisation des scripts d'analyse morphologique permet de déterminer la densité de probabilité de différentes grandeurs morphologiques obtenues par la mesure particule par particule. On peut ainsi comparer les dimensions caractéristiques entre les VLPs et les cores.

La figure 3.3 représente la densité de probabilité de grandeurs directement obtenues par lecture de l'image comme la hauteur, l'aire ou encore le diamètre équivalent. Il y a pour chacune de ces grandeurs une hiérarchie du type « VLP au-dessus de core ». Cela peut aisément s'expliquer par le fait que les cores sont contenus, lors de la production des particules par les cellules, dans les VLPs. La hauteur caractéristique est ainsi de 18 ± 2 nm pour les cores et 28 ± 2 nm pour les VLPs. Le diamètre équivalent à mi-hauteur des cores se trouve autour de 80 ± 4 nm tandis que celui des VLP est autour de 99 ± 4 nm. L'aire suit la même répartition (pour les cores 6000 ± 500 nm² avec une dispersion de 200 nm² et pour les VLPs 12000 ± 500 nm² avec une dispersion de 1000 nm²).

Le diamètre équivalent en bas est plus grand que celui à mi-hauteur, que cela soit pour les VLPs ou pour les cores. Cela peut se justifier par une minimisation de la convolution par la pointe lorsque la mesure est faite à mi-hauteur (par la suite, nous nous intéresserons qu'à ce type de diamètre).

Cependant, si on regarde la dispersion des distributions en calculant l'écart type σ, on peut observer la même hiérarchisation. Par exemple, pour les diamètres équivalents à mi-hauteur, on obtient σ = 13 nm pour les cores et σ = 23 nm pour les VLPs. Ce résultat pourrait s'interpréter comme étant dû au scénario de formation des objets : le core se forme lors de la maturation dans un milieu restreint, à l'intérieur de l'enveloppe lipidique, avec une forte interaction avec l'ARN ce qui n'est pas le cas pour les VLPs formées lors du bourgeonnement puis de la maturation, phénomènes que l'on attend moins contraints.

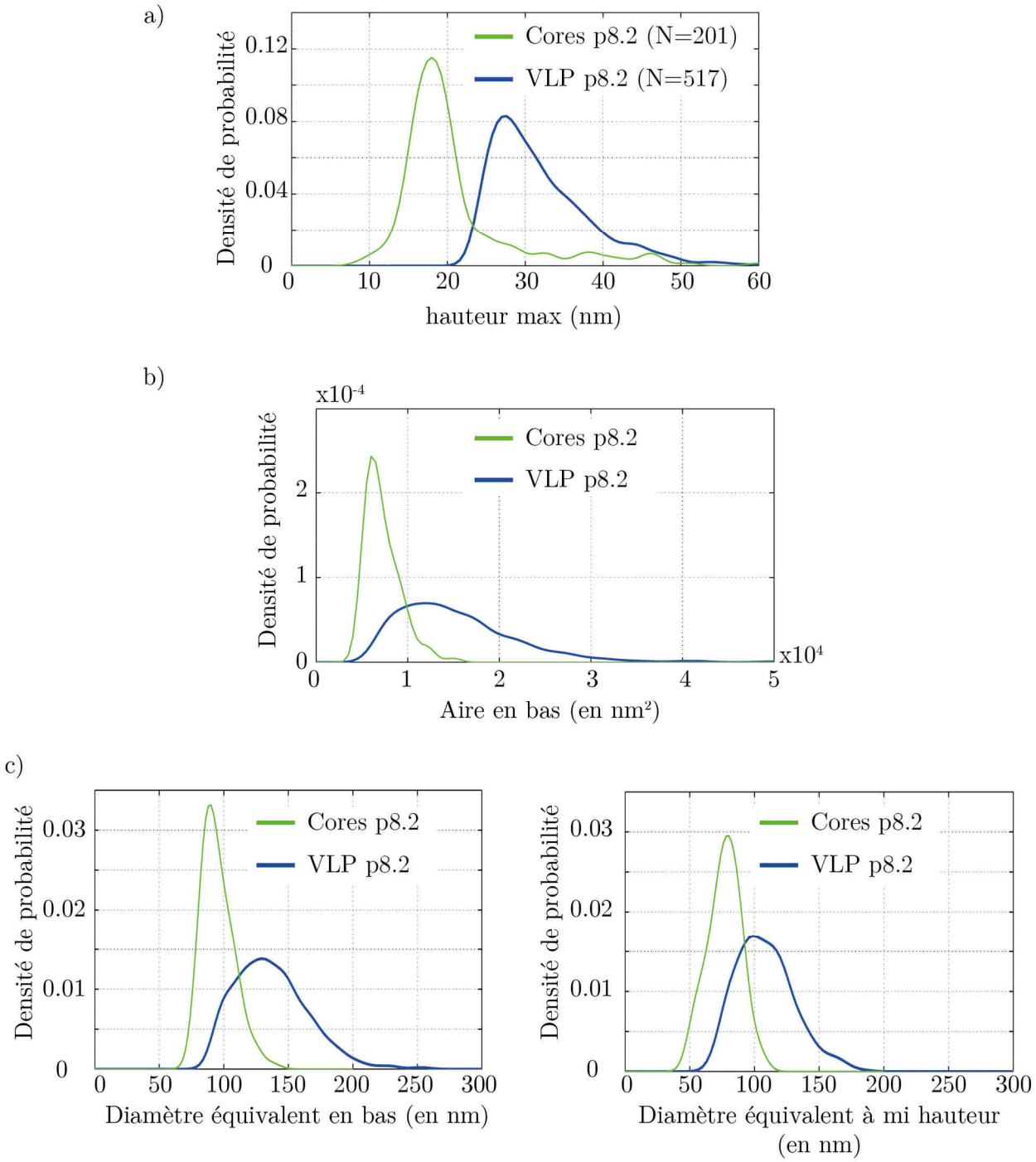


figure 3.3 - Densités de probabilité de certains paramètres morphologiques pour les cores p8.2 (en vert - N = 201) et les VLPs p8.2 (en bleu - N=517) après filtrage.

a) Densité de probabilité de la hauteur maximale des cores p8.2 et des VLPs p8.2. Ce paramètre n'est pas sensible à la convolution. Les collections sélectionnées dépassent les 200 particules, permettant une étude statistique acceptable. La hauteur caractéristique des cores est inférieure à celle des VLPs.

b) Densité de probabilité de l'aire à la base des cores p8.2 et des VLP p8.2. Ce paramètre est sensible à la convolution de la pointe. On voit que les cores présentent une aire caractéristique plus petite que les VLPs et une dispersion d'aire moins importante.

c) Densité de probabilité du diamètre équivalent à la base (à gauche) et à mi-hauteur (à droite) des cores p8.2 et des VLP p8.2. Ces paramètres sont donc aussi sensibles à la convolution mais se placer à mi- hauteur minimise l'effet de la convolution par la pointe. A nouveau, la valeur caractéristique du diamètre des cores est inférieure à celui des VLP ainsi que la dispersion.

La figure 3.4 représente les densités de probabilité du grand diamètre et du petit diamètre des VLPs p8.2 et des cores p8.2 obtenus après l'ajustement elliptique de chacune des particules ainsi que celles de l'asymétrie (rapport entre le petit et grand diamètre). Il apparait que les densités de probabilité du grand diamètre des VLPs et des cores sont très proches (la valeur caractéristique est de 110 ± 5 nm) alors que celles du petit diamètre sont décalées (celle des cores autour de 55 ± 5 nm et celle des VLPs autour de 95 ± 5 nm). Ce décalage se retrouve alors nécessairement dans l'asymétrie.

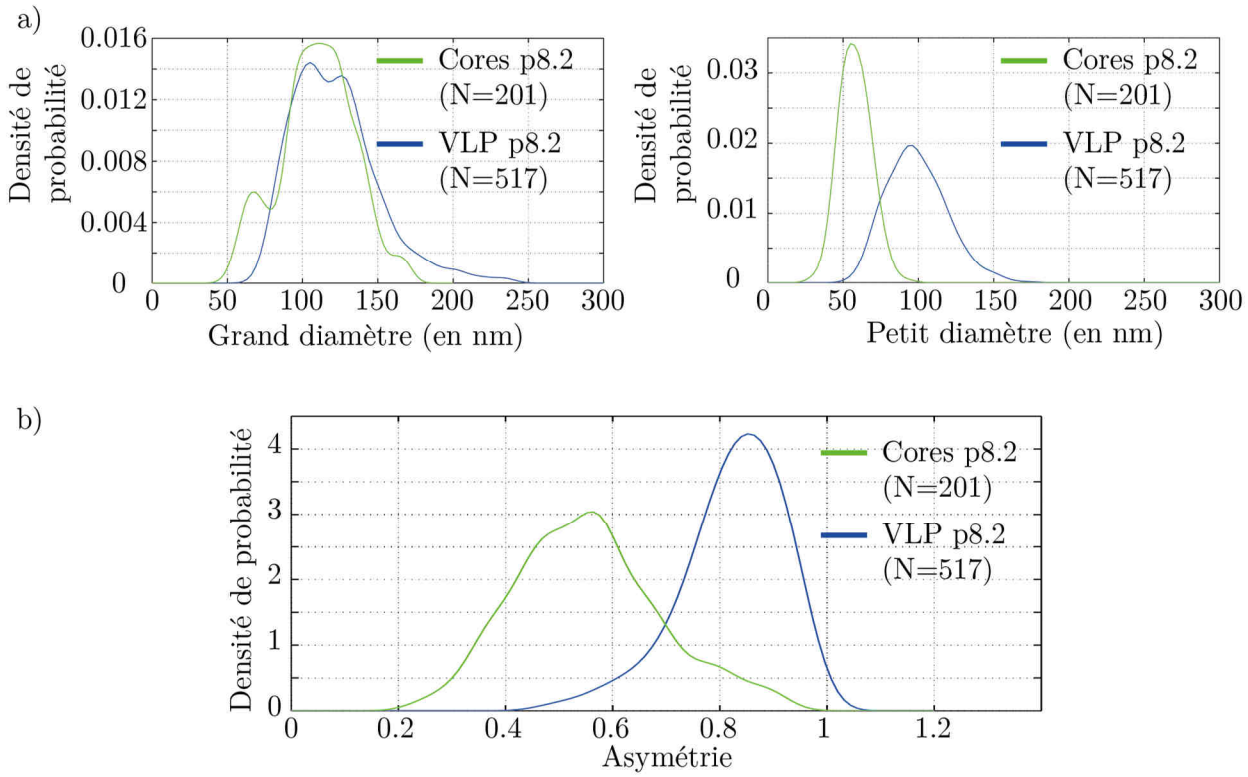


figure 3.4 - Densité de probabilité des paramètres morphologique après détermination des axes propres et les diamètres associés de chaque particule pour les VLP p8.2 (en bleu) et les cores (en vert).
a) Densité de probabilité du grand diamètre (à gauche) et du petit diamètre (à droite) des VLP p8.2 et des cores p8.2. Il y a peu de différence entre les VLP et les cores en ce qui concerne le grand diamètre dont la valeur la plus probable est 110 nm avec une dispersion d'environ 50 nm). Par contre, les cores présentent un petit diamètre caractéristique plus petit que celui des VLPs.
b) Densité de probabilité de l'asymétrie, rapport entre le petit et le grand diamètre, des VLP p8.2 et des cores p8.2. Les cores sont fortement asymétriques (avec une asymétrie la plus probable autour de 0,57) par rapport aux VLPs présentant une asymétrie moyenne autour de 0,85.

Cette dernière différence se justifie directement en observant la forme particulière des cores présentant une direction privilégiée, et donc une asymétrie forte (autour de 0,5) ce qui n'est pas le cas des VLPs qui ont une morphologie sphérique. La similitude du grand diamètre, à la fois en terme de valeur la plus probable et de dispersion, pourrait se justifier par l'assemblage contraint du core : sa croissance serait limitée par les parois lipoprotéiques formées par l'enveloppe et la matrice MA.

La figure 3.5 illustre les corrélations entre le petit et le grand axe. La distribution des points (grand axe ; petit axe) rend compte de la forte asymétrie des cores, le nuage s'éloignant de la première bissectrice, la pente

de l'ajustement linéaire étant proche de 1 pour les VLP et de 0,6 pour les cores. Les cartes de corrélation nous permets de remonter aux dimensions les plus probables qui sont pour les cores de (105 nm ; 60 nm) ce qui correspond à une asymétrie de 0,58 et pour les VLPs (105 nm ; 90 nm) pour une asymétrie de 0,85. On retrouve d'ailleurs les valeurs les plus probables de la densité de probabilité de l'asymétrie. De plus, si on s'intéresse à la dispersion (l'étalement de la tâche), on remarque qu'elle est équivalente, entre les cores et les VLPs, selon la direction des grands diamètres alors qu'elle est plus importante pour les VLPs selon la direction des petits diamètres.

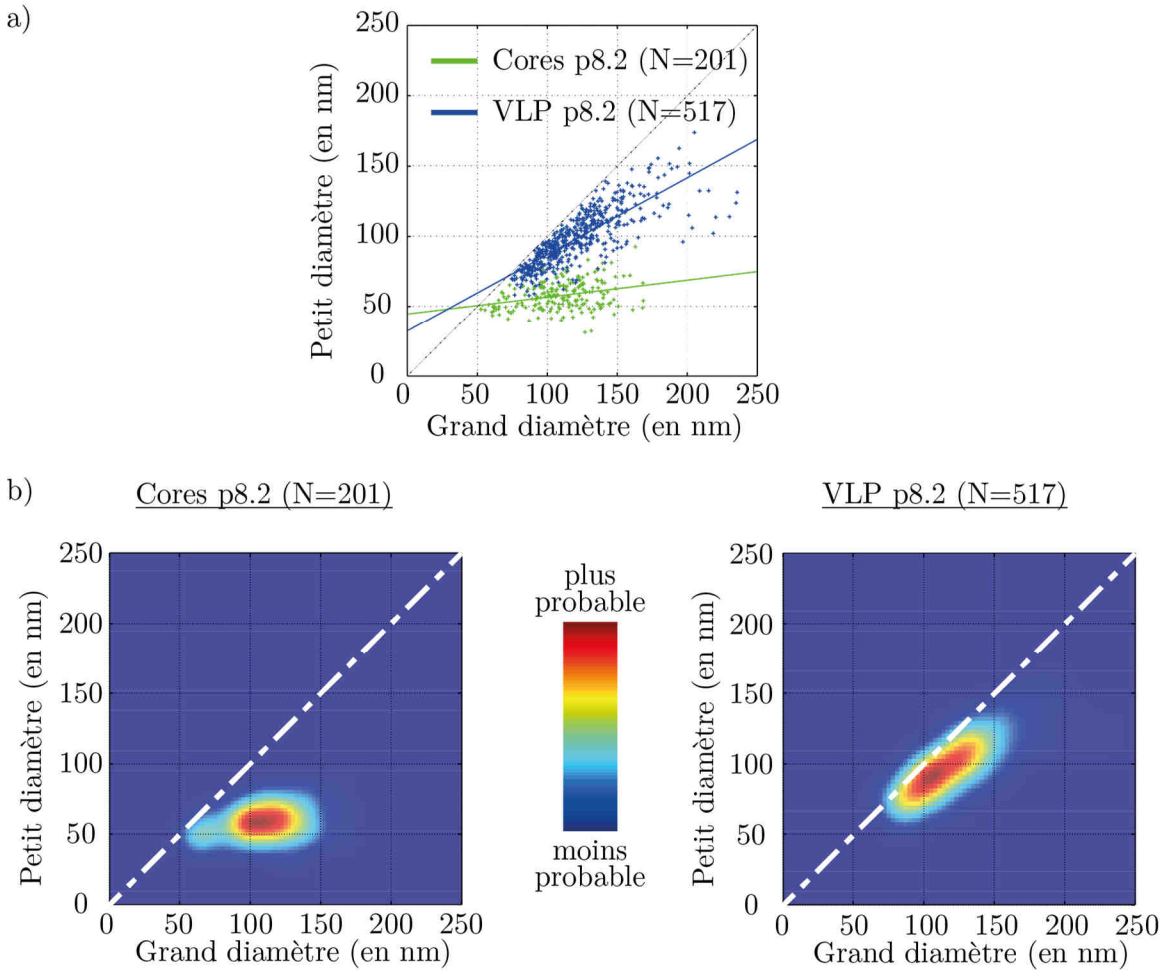


figure 3.5 - Correlation entre petit et grand diamètre pour les cores p8.2 et les VLPs p8.2.
a) Nuage de points reliant le grand diamètre *a* et le petit diamètre *b* pour chaque particules cores (en vert) et VLPs (en bleu). En trait continu, l'ajustement linéaire. Les points se trouvent nécessairement en dessous de la première bissectrice car le programme trouve directement quel est le grand axe et le petit axe. Le nuage de points verts s'éloigne beaucoup plus de la première bissectrice que le nuage bleu.
b) Carte de corrélation entre le petit diamètre et le grand diamètre des cores p8.2 (à gauche) et des VLPs p8.2 (à droite). Pour les cores, le couple (a, b) le plus probable est (105 nm, 60 nm) et la dispersion des résultats a lieu de façon anisotrope selon la direction des abscisses tandis que pour les VLP, le couple (a, b) le plus probable est (105 nm, 90 nm) et la dispersion des résultats a lieu selon la première bissectrice, c'est-à-dire de manière isotrope.

Cette représentation à elle seule donne donc une bonne mesure des propriétés morphologiques des particules en termes de diamètres caractéristiques, d'asymétrie et de dispersion. C'est celle que nous utiliserons majoritairement par la suite.

La première observation faite semble confirmer le fait que la croissance maximale selon la direction privilégiée par les cores suit les dimensions de l'enveloppe. La deuxième remarque pourrait se justifier en évoquant l'existence de contraintes structurelles dépendant des interactions entre les protéines CA ainsi qu'avec l'ARN limitant le core à de petites variations des petits-diamètres.

Les différents résultats déjà obtenus sur la morphologie des cores ne nous permettent pas de différencier les cores coniques des cores cylindriques. Seule la mesure de l'angle formé par la partie centrale est pertinente : s'il est égal à zéro, c'est un cylindre, s'il est clairement supérieur à zéro, c'est un cône.

c. Mesure de l'angle des cores

Dans le chapitre précédent (Chap. 2.III.2.c), je proposais deux méthodes pour mesurer l'angle de la partie centrale d'un core : soit en considérant le profil d'une section le long du core soit en évaluant l'évolution du diamètre transverse.

Les images zoomées sur les particules (figure 3.6) et leurs sections montrent que la hauteur n'est pas homogène le long de la section des cores, probablement suite à l'effondrement partiel de la structure sur elle-même, ce qui rend difficile l'étude d'une section centrale et impossible l'utilisation de la première méthode. Dans les images proposées, on peut penser que l'effondrement est plus important pour les cores cylindriques que pour les coniques, mais cela n'est pas un comportement général.

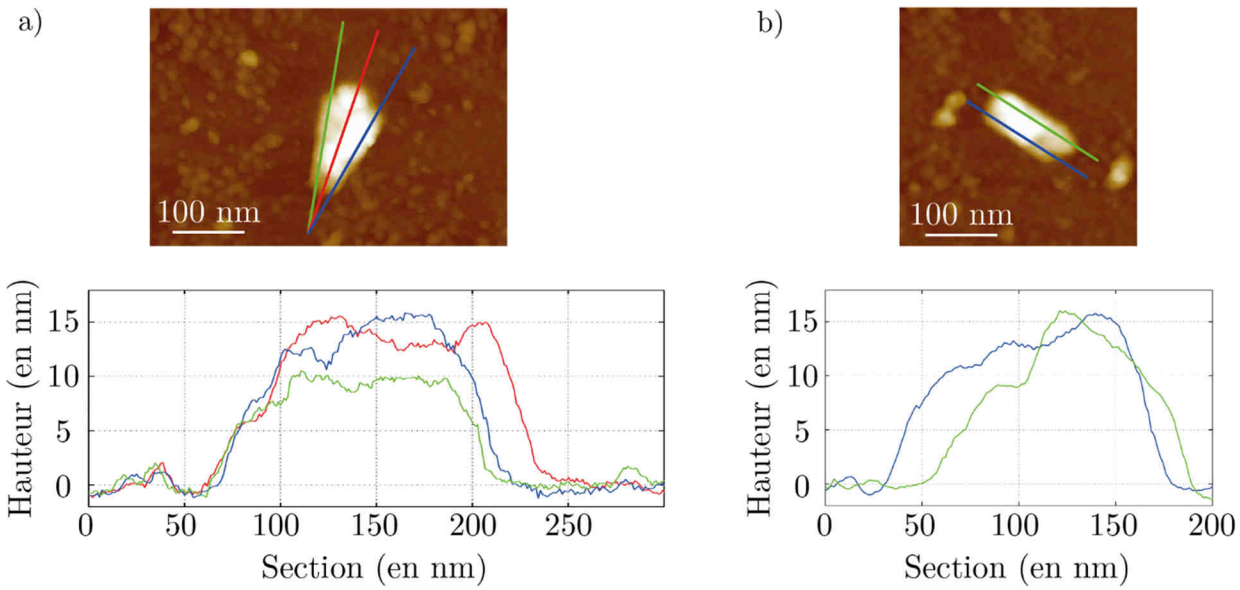


figure 3.6 - Sections d'un core conique et d'un core cylindrique.
Image d'AFM (*Peak Force Mode* avec un levier ScanAssyst HR)
a) (en haut) d'un core p8.2 de type conique. (en bas) Hauteur le long des sections de couleur sur l'image. Les coupes ne sont pas les mêmes selon la section considérée et ne présentent pas de régime linéaire clair.
b) (en haut) d'un core p8.2. de type cylindrique (en bas) Hauteur le long des sections de couleur sur l'image. Les coupes ne sont pas les mêmes selon la section considérée et ne présentent pas de palier évident correspondant à la partie cylindrique du core.

La deuxième méthode est malheureusement sensible à la convolution. Cependant, la hauteur des particules, cône et cylindre, est sensiblement la même ce qui sous-entend lors de l'analyse morphologique que les effets de la convolution par la pointe sont sensiblement les mêmes sauf sur l'angle, où elle aura tendance à augmenter l'angle seulement s'il s'agit d'un cône (Annexe A). La séparation entre les deux formes n'en sera que plus marquée. On pourra ainsi discuter de leurs propriétés morphologiques sans craindre un biais de la convolution.

On peut observer la présence d'une partie plus haute qu'ailleurs dans le core, qu'il soit conique ou cylindrique. L'hypothèse est que sous l'effet de l'effondrement, le génome est resté immobile : la position de ce « bulbe » dans la structure indiquerait la position du complexe NC-ARN. Cependant, cette hypothèse n'est pas supportée par d'autres observations expérimentales extérieures à l'équipe et ne sera pas exploitée par la suite (Woodward et al. 2015).

L'utilisation du script de mesure des angles est faite sur des images zoomées sur des cores. Avoir une haute résolution, permet de voir si l'algorithme peut séparer les cônes des cylindres. L'histogramme réalisé, à partir de 26 images de cores cylindriques ou coniques choisis totalement arbitrairement (figure 3.7.b), montre la séparation entre deux populations, une ayant un angle proche de 0, l'autre ayant un angle autour de 27° ± 4°. Cette valeur est proche de celle donnée par l'étude en cryoEM de cores obtenus par un autre protocole de purification (Briggs et al. 2003) qui se trouve autour de 23° et éloignée de celle théorique de 19,5° (Ganser 1999) attendue par une structure dont les pentamères se répartissent de la zone centrale selon une proportion 5/7 (voir Chap. I.). Ces écarts peuvent se justifier par la convolution de la pointe, inexistante dans les mesures par cryoEM. Par ailleurs, le programme Matlab permettant de simuler l'imagerie AFM en *mode contact* d'un core cylindrique d'angle 19°C, donne un angle autour de 27°C, dans le cas d'une pointe AFM de rayon 2 nm et d'angle 20°C.

La mesure de nouveaux paramètres morphologiques peut permettre de mieux caractériser la forme des cores comme la longueur du core, la largeur maximale (qui correspond au maximum du diamètre transverse atteint le long du core) et la hauteur. Cependant, les particules ont été sélectionnées lors de l'étape d'imagerie rendant cette étude moins pertinente d'un point de vue statistique (faible nombre et choix arbitraire).

L'idée a alors été de réaliser des images de 3 µm de côté, toujours pour avoir une étude statistique la plus objective qu'il soit. Cependant, la résolution de chaque image de core est plus faible puisqu'il y a moins de pixels par objet. Le programme a alors été légèrement modifié : on ne considère plus le contour propre de l'objet mais un contour lissé par la méthode des *splines* (voir Chap. 2.III.5). Cette modification permet d'augmenter le nombre de points du contour en respectant le plus possible la géométrie du contour.

Grâce à ce script, on a réalisé une étude statistique avec 190 cores p8.2 +ψ et tracé les densités de probabilité des angles et des grandeurs géométriques habituels (figure 3.8). Deux populations peuvent être isolées de la densité de probabilité de l'angle, une autour de 3° [1] (avec une dispersion en $\sigma_\theta = 3°$), correspondant aux cylindres et une autre autour de 27° (avec une dispersion en $\sigma_\theta = 5°$) attribuée aux cônes. La forme des

[1] L'angle n'est pas 0° car le lissage et le repliement des angles négatifs sur les angles positifs déplacent le pic des cylindres sur des valeurs légèrement plus grandes que 0°.

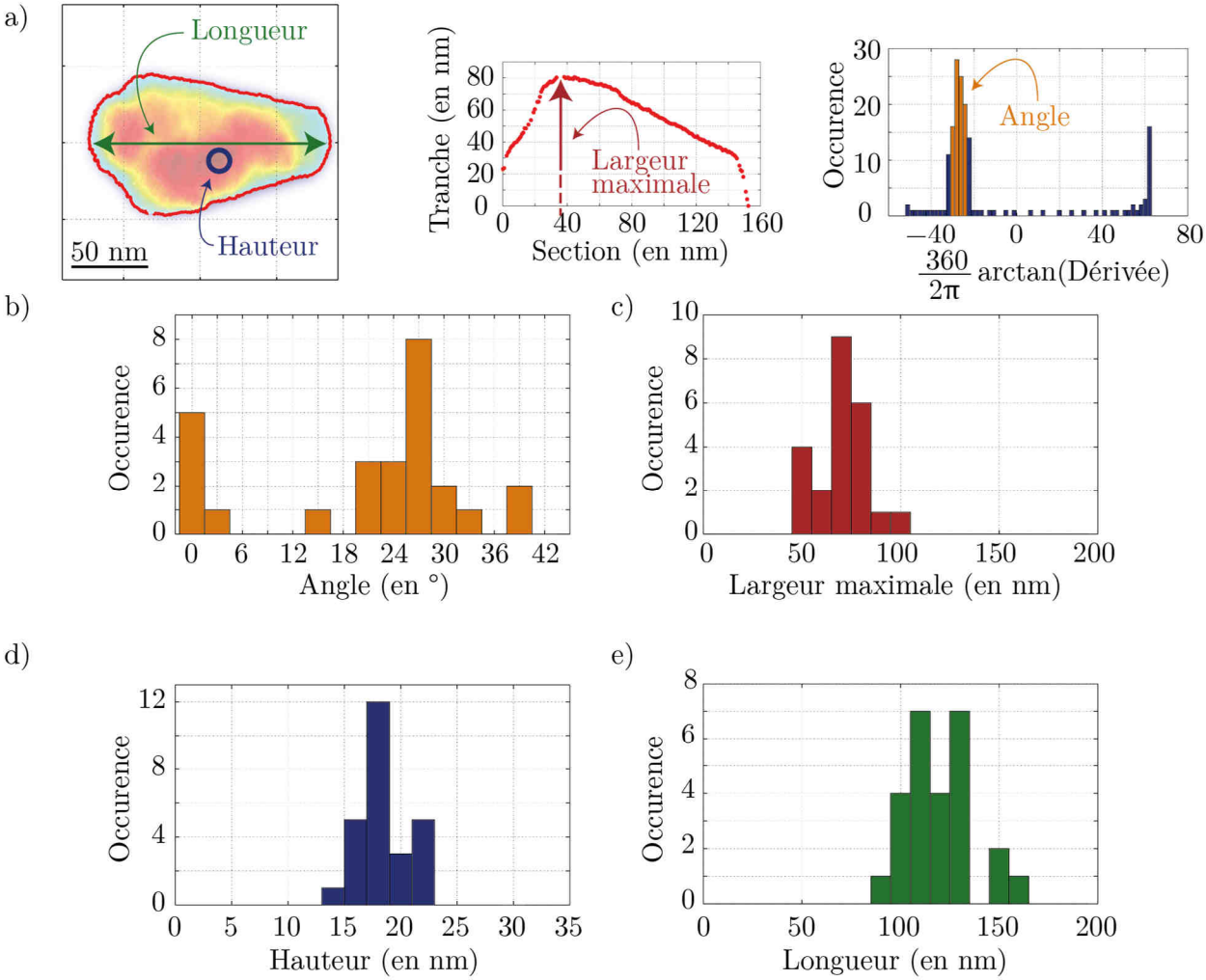


figure 3.7 - Etude morphologique complémentaire de cores p8.2 sélectionnés arbitrairement à partir de zooms de 400 nm par 400 nm sur les cores (N = 26).

a) Définition des paramètres morphologiques accessibles sur une image. (à gauche) Le contour de la particule (en rouge) est établi à la hauteur hseuil (définie lors de la sélection de la particule). La hauteur est définie comme la courbe iso-hauteur la plus haute (au nm près) accessible. La longueur correspond à la plus grande distance accessible entre deux points du contour de la particule. (au centre) La largeur maximale est définie comme le maximum de la tranche (voir Chap. 2.III.2.c.). L'angle est obtenu comme décrit au chapitre 2. La longueur, la largeur et l'angle sont sensibles à la convolution de la pointe.

b) Histogramme des angles mesurés à partir des objets sélectionnés arbitrairement. Les valeurs autour de 0° correspondent aux cores de types cylindres (6 objets). Les valeurs autour de 27° ± 4° correspondent aux cores de types cônes (20 objets).

c) Histogramme des largeurs maximales mesurées à partir des objets sélectionnés arbitrairement. La largeur (au niveau du seuil *hseuil*) la plus fréquente est de 70 nm ± 5 nm. Ce résultat se rapproche de l'étude morphologique précédente avec le petit diamètre (figure 3.4).

d) Histogramme des hauteurs mesurées à partir des objets sélectionnés arbitrairement. La hauteur la plus fréquente est de 17 nm ± 2 nm. On retrouve les résultats obtenus précédemment sur l'étude morphologique statistique (figure 3.3).

e) Histogramme des longueurs maximales mesurées à partir des objets sélectionnés arbitrairement. Les longueurs les plus fréquentes sont de 110 et de 130 nm (± 5 nm). Ce résultat se rapproche de l'étude morphologique précédente avec le grand diamètre (figure 3.4).

cores ne passe pas de cylindrique à conique de manière continue mais il existe un intervalle d'angles peu favorables. En considérant l'angle des cores, on peut ainsi discriminer les cônes des cylindres.

La longueur est proche de la valeur obtenue dans l'étude du petit et du grand diamètres des cores. Par contre, on observe une augmentation de la largeur. A cause de la géométrie particulière des cores coniques, le petit axe issu de l'ajustement elliptique est généralement inférieur à la largeur maximale calculée.

La hauteur quant à elle ne semble présenter qu'une seule population. Cependant on peut critiquer la pertinence de ce paramètre puisque les structures apparaissent, sur les images, partiellement effondrées sur elles-mêmes.

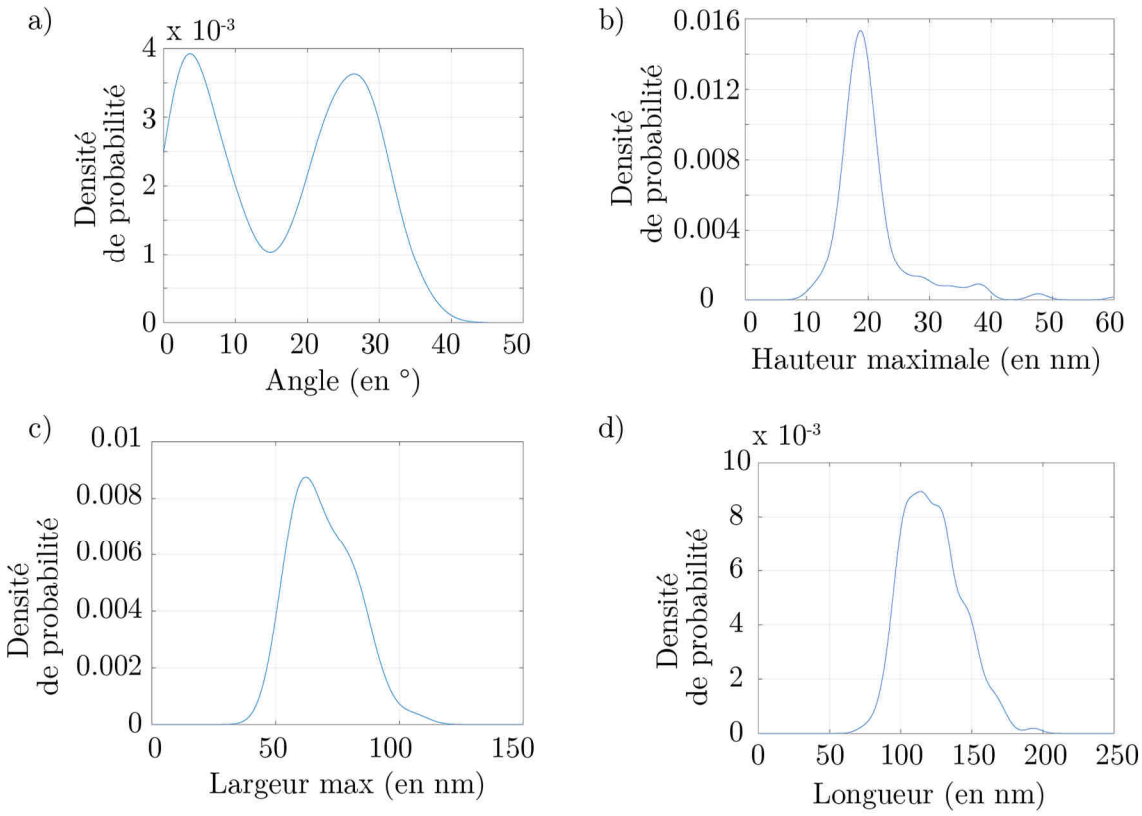


figure 3.8 - Etude morphologique complémentaire de cores p8.2 (N = 188) à partir d'images AFM de 3µm par 3µm.
La sélection se fait toujours par l'algorithme d'analyse morphologique (voir Chap 2.III.2.b).
a) Densité de probabilité des angles des cores p8.2. Une population de cores a un angle autour de 3° correspondant aux cylindres tandis qu'une autre population, celle des cônes, présente un angle distribué autour de 27°.
b) Densité de probabilité des hauteurs des cores p8.2. La hauteur la plus probable est d'environ 19 nm ± 2 nm.
c) Densité de probabilité des largeurs maximales des cores p8.2. La largeur maximale la plus probable est de 63 nm ± 4 nm.
d) Densité de probabilité des longueurs des cores p8.2. La longueur la plus probable est de 114 nm ± 4 nm.

Devant la séparation nette de ces deux populations, il est intéressant d'étudier les cartes de corrélation entre l'angle et les autres grandeurs morphologiques (figure 3.9).

La carte représentant la densité de probabilité de la hauteur maximale en fonction de l'angle (figure 3.9.a) montre deux tâches autour des deux angles caractéristiques autour de 3° et de 27° séparant ainsi les

cônes des cylindres. Par contre, le décalage entre les deux hauteurs n'est pas très important : 18 ± 2 nm pour les cylindres et 19,5 ± 2 nm.

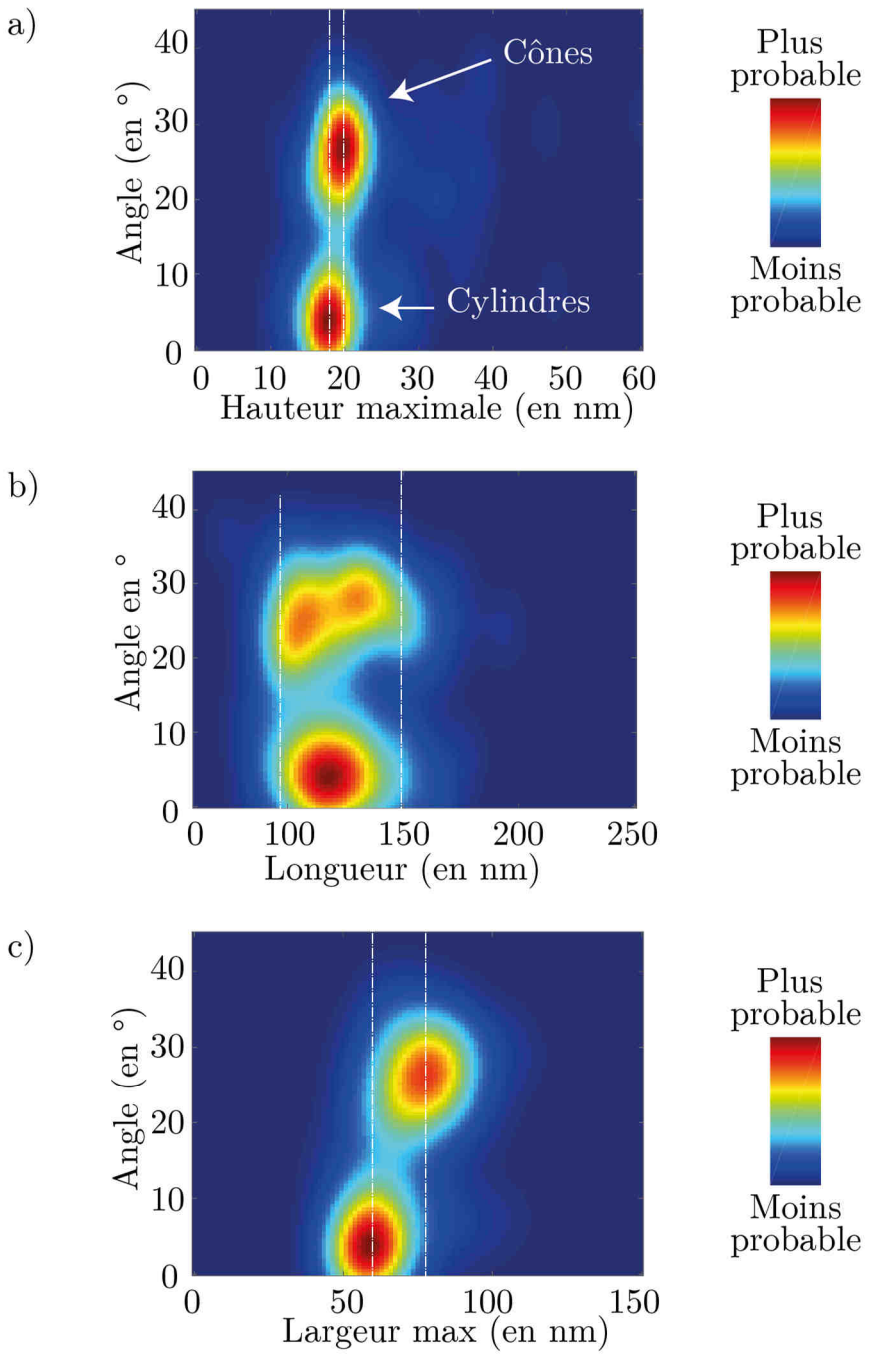


figure 3.9 - Corrélation entre l'angle des cores p8.2 et les paramètres morphologiques (N = 188).
a) Carte de corrélation entre l'angle et la hauteur maximale de core p8.2. Les deux types de cores apparaissent. Un léger décalage par rapport à la hauteur existe entre ces deux populations, les cônes et les cylindres.
b) Carte de corrélation entre l'angle et la longueur des cores p8.2. La longueur du core ne semble pas dépendre du type de cores considéré.
c) Carte de corrélation entre l'angle et la largeur maximale des cores p8.2. La largeur la plus probable dépend du type de cores considérés : pour le cylindre, la largeur la plus probable est de 63 ± 4 nm, tandis que pour le cône, la largeur est de 82 ± 4 nm.

La carte montrant la corrélation entre la longueur et l'angle (figure 3.9.b) présente toujours les deux tâches caractéristiques des deux formes mais celles-ci ne sont pas décalées selon l'axe des abscisses. Quelle que soit la forme adoptée par le core, sa croissance est bloquée par la paroi lipoprotéique de l'enveloppe.

La dernière carte relie la largeur maximale à l'angle (figure 3.9.c). La séparation entre les cores de type cône et de type cylindre se fait toujours nettement selon les angles mais il en est de même selon la largeur maximale. Les cylindres ont statistiquement un diamètre maximal (valeur caractéristique de 58 nm) plus petit que celui des cônes (valeur caractéristique de 78 nm).

A la vue de ces résultats, il nous a semblé intéressant de représenter une carte de corrélation entre la largeur maximale et la longueur maximale (figure 3.10) pour voir si cela permettrait (sans mesure d'angles) de séparer cores et cylindres. On observe une tâche de la forme d'un V renversé à 90°. En s'attardant sur les autres cartes de corrélation, on peut justifier que la branche supérieure est attribuée aux cônes tandis que la branche inférieure est attribuée aux cylindres ce qui est confirmé avec les nuages de points, longueur en fonction de la largeur maximale pour chaque forme, de la figure 3.10.b. Les cônes ont donc tendance à avoir une largeur maximale proportionnelle à leur longueur ce qui correspond bien aux propriétés de cette forme géométrique. La largeur maximale des cylindres par contre semble être faiblement corrélée à leurs longueurs.

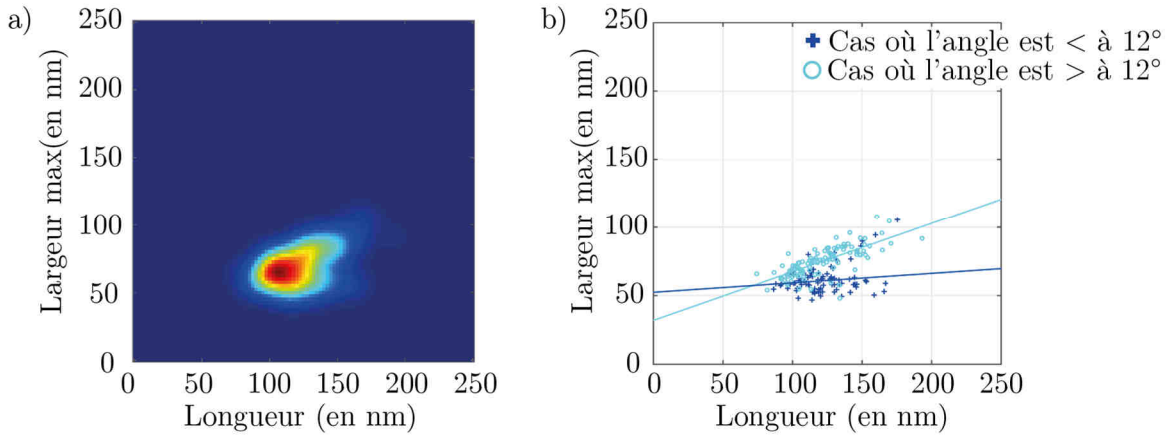


figure 3.10 - Corrélation entre la longueur et la largeur maximale des cores p8.2 (N = 188)
a) Carte de corrélation entre la largeur maximale et la longueur. On observe une forme en V penchée de la dispersion.
b) Nuage de points reliant en abscisse la largeur maximale et en ordonnée la longueur des cores. La dispersion des objets ayant un angle inférieur à 12° (en bleu foncé – N = 79) se fait majoritairement selon l'axe des ordonnées tandis que celle des objets ayant un angle supérieur à 12° (en bleu clair – N = 109) est oblique avec un coefficient de proportionnalité de 0,6.

d. Modèle des cores de VIH-1

Je propose ici un modèle extrêmement simple pouvant expliquer l'existence de structures de types cylindrique ou de type conique. Il s'appuie sur les travaux de W. Helfrich sur les membranes lipidiques (Helfrich 1973) et de l'équipe de W. Gelbart sur l'élasticité des cores (Nguyen et al. 2005).

En toute première approximation, le core peut être considéré comme une surface fermée continue constituée de trois parties : deux calottes sphériques et une partie centrale (figure 3.11). Comme l'indiquent les résultats obtenus par AFM (figure 3.4), le core est contraint aux extrémités par l'enveloppe lipoprotéique. Le

modèle géométrique peut donc se résumer par les paramètres R_1 et R_4 rayons des calottes (dans le cas du cylindre, $R_1 = R_4$), h longueur de la partie centrale et R rayon de l'enveloppe lipoprotéique (figure 3.11). L'angle α du core est alors défini par :

$$\alpha = \frac{R_4 - R_1}{\sqrt{R^2 - R_1^2} + \sqrt{R^2 - R_4^2}} \tag{3.1}$$

La contrainte apportée par la membrane impose la relation suivante entre les paramètres géométriques :

$$2R = \sqrt{R^2 - R_1^2} + h + \sqrt{R^2 - R_4^2} \tag{3.2}$$

Nous avons décidé de modéliser l'énergie de la structure en deux termes :

- L'énergie de *bending* : les protéines CA libres possèdent une courbure naturelle C_0. Dans la structure, les interactions avec les protéines voisines vont contraindre la protéine à adopter une nouvelle forme. L'énergie de *bending* mesure cet écart avec un modèle quadratique :

$$E_b = \frac{1}{2}\iint_S \kappa_B (C_1(\vec{r}) + C_2(\vec{r}) - C_0)^2 dS + \kappa_G \iint_S C_1(\vec{r}) C_2(\vec{r}) dS \tag{3.3}$$

  où C_1 et C_2 représentent les courbures locales au point $\vec{r}$ et S la surface

  Le deuxième terme est l'énergie de *bending* gaussienne qui dans le cas d'une surface fermée est constante. Le paramètre κ_B, homogène à une énergie, dépend de la nature des protéines CA.

- L'énergie de contour : la structure de notre core modèle, composée d'une partie centrale et de deux calottes sphériques, présente donc deux frontières. La contribution énergétique de ces frontières est modélisée par une énergie linéique γ :

$$E_c = 2\pi\gamma(R_1 + R_4) \tag{3.4}$$

  où γ l'énergie linéique de contour.

On suppose l'équilibre établi avec les protéines CA libres dans la particule virale[2], la surface S du core restant constante (le nombre de protéines CA constant donc). R étant fixé, le problème ne dépend plus que d'un paramètre libre. Dans ces conditions, une minimisation de l'énergie totale par protéine (et donc par unité de surface) nous indiquera quelle est la forme la plus stable.

La figure 3.11 représente l'évolution de l'angle minimisant l'énergie en fonction des paramètres structurel et énergétique adimensionnés :

$$\mu = C_0 R \text{ et } \Gamma = \frac{\gamma R}{\kappa_B} \tag{3.5}$$

Dans le cas où le système est libre, sans contrainte, il est aisé de montrer, avec ce modèle, que la forme la plus stable est le cylindre. Expérimentalement, cette situation est d'ailleurs vérifiée lorsque les protéines s'auto-assemblent *in-vitro* sans présence de membrane (Campbell & Vogt 1995). Par contre, en présence d'une

[2] Lors de la maturation, la polyprotéine Gag est scindée en trois domaines. Une partie des 4000 protéines CA s'assemble pour former le core, laissant environ 2600 protéines CA en équilibre dans le milieu (Briggs & Kräusslich 2011).

contrainte apportée par la membrane lipidique, l'énergie de *bending* peut expliquer à elle seule l'existence de cores à la géométrie conique. Seule cette forme permet au système d'avoir une énergie de courbure sur toute une zone de la partie centrale proche du minimum car la courbure de la structure reste voisine de la courbure naturelle, dans le cas où celle-ci est forte.

L'énergie de contour semble également faciliter l'obtention de cette forme. Plus la tension de ligne est importante, plus il est intéressant pour le système d'avoir une des extrémités quasiment fermée et donc d'annuler le périmètre d'une des frontières. Cependant, ce modèle reste simple : il ne prend pas en compte le rôle du génome à l'intérieur du core et l'énergie de *stretching*, tension due à la présence de pentamères dans la structure principalement hexamèrique, qui nécessiterait une étude discrète du système via la méthode des éléments finis par exemple.

La forme des cores pourrait donc se justifier par le modèle de croissance dans un milieu restreint. La présence de cônes et de cylindres serait alors expliquée par des fluctuations proches de la transition décrite.

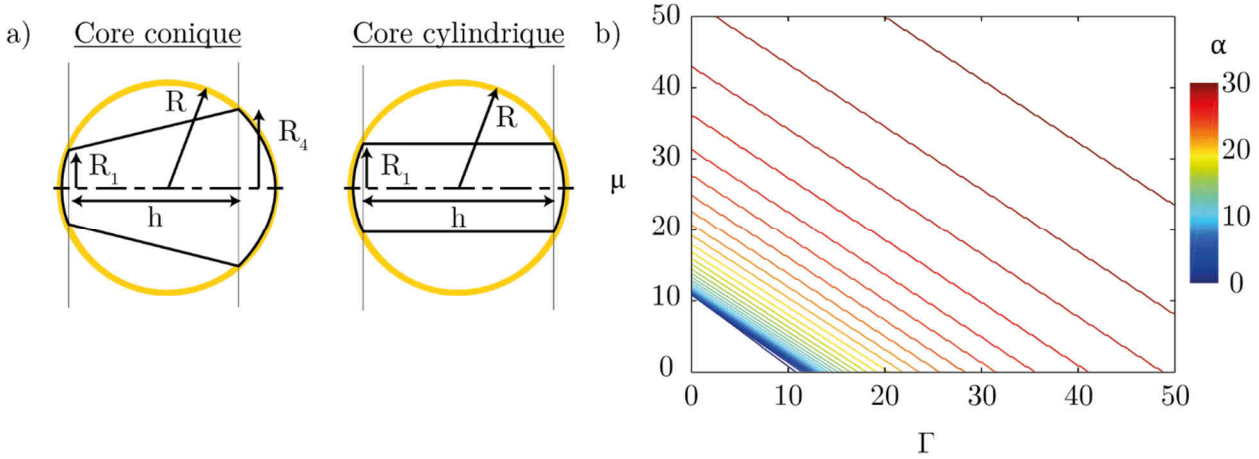


figure 3.11 - Modèle des cores du VIH-1
Modèle géométrique avec les paramètres définis dans le texte.
Evolution de l'angle des cores en fonction de μ, représentant l'effet de la courbure de la surface, et de Γ l'effet du contour de ligne aux extrémités du core. L'angle α représente l'angle du core.

3. Propriétés mécaniques des VLPs p8.2

L'étude des déformations des VLPs en réponse à l'appui de la pointe AFM quantifie sa rigidité, via la mesure de sa constante de raideur. Dans cette partie, nous avons réalisé des expériences de nano-indentation sur des VLPs p8.2. L'utilisation du script d'indentation permet de déterminer le centre de la particule et de sélectionner les courbes ayant été réalisées au niveau du centre de la particule (voir Chap. 2.IV.2).

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent (Chap. 2.IV), plus l'indentation est importante, plus on sonde les pentes k_m proche de la raideur du levier. Des expériences de nano-indentation ont été réalisés à faible indentation (déflexion du levier de 5 nm ce qui correspond à une force de 0,6 nN), à moyenne indentation (déflexion du levier de 10 nm équivalent à 1,2 nN) et finalement à forte indentation (déflexion du levier de 20 nm équivalent à 2,4 nN) avec des leviers dNPS, de raideur d'environ 0,11 ± 0,03 N/m. Les études de nano-indentation ont été réalisées dans le solvant de suspension des VLPs, le TNE. Le

script d'analyse a permis d'exploiter les courbes d'approches réalisées pour en extraire des informations sur les propriétés mécaniques des VLPs p8.2.

a. Les courbes de force

Dans le cas d'une faible indentation (figure 3.12), les courbes n'atteignent pas le régime de déformation totale et l'objet peut encore se déformer. Dans ces conditions, la carte des raideurs semble être la mieux adaptée pour déterminer la position de la particule. Le calcul de la pente en fin d'approche, représenté par les cercles rouges dans la figure 3.12.a, permet de sélectionner les courbes désirées, c'est-à-dire les numéros 014, 015, 016 et 020 (figure 3.12.b). La courbe 000 a été obtenue lors de l'appui sur la surface de mica fonctionnalisé. Un calcul de la dérivée fait apparaitre la présence d'un palier autour de 0,022 ± 0,003 N/m (figure 3.12.c) ce qui est

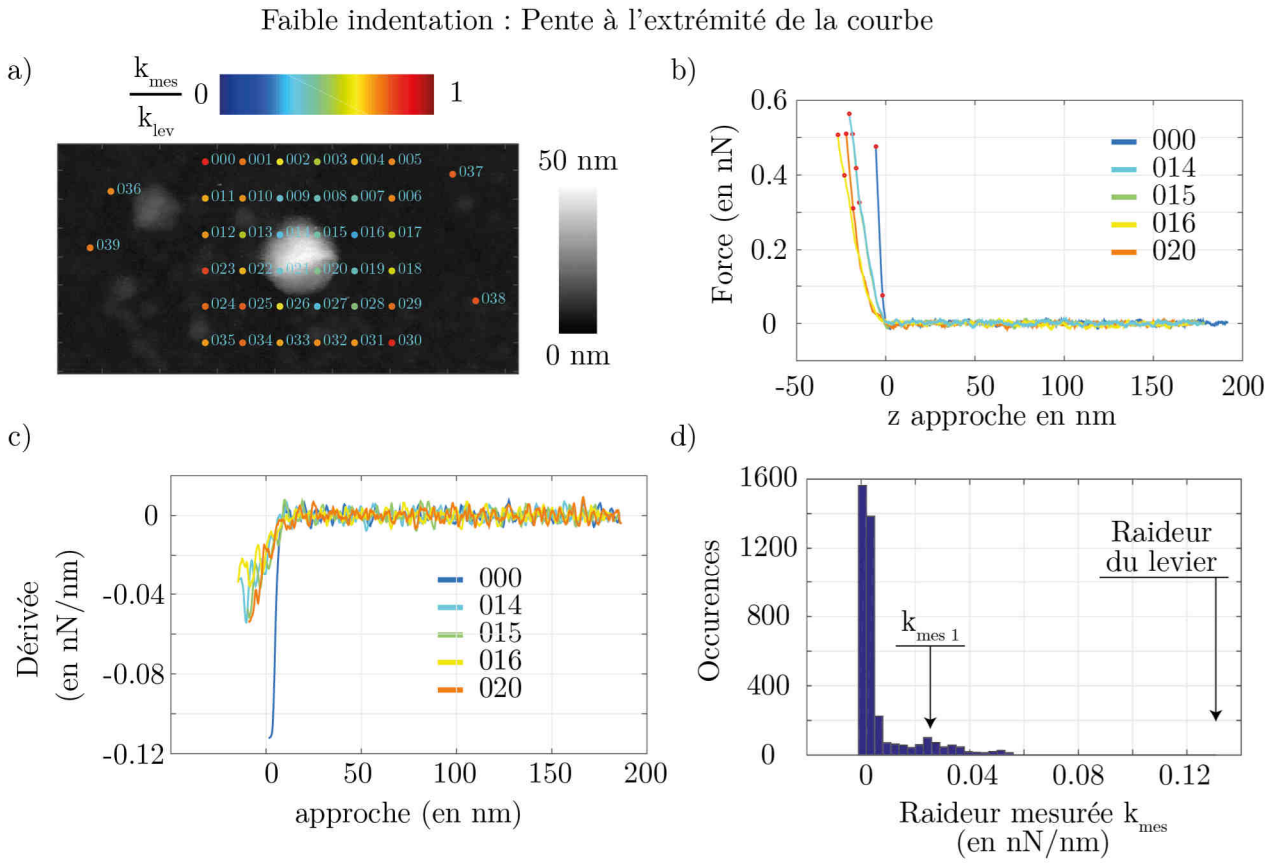


figure 3.12 – Expériences d'indentation sur une VLP p8.2 à faible indentation (5 nm).
a) Expérience de *Point&Shoot* sur une particule VLP p8.2 en milieu liquide (Solution tampon TNE) déposée sur une surface de mica fonctionnalisée à la Poly-L-Lysine. En noir et blanc, l'image AFM de la particule (mode *PeakForce* avec une pointe dNPS de raideur 0,13 N/m dans ce cas). En couleur, chaque point représente une expérience d'indentation, le code couleur associé correspond à la pente extrême de la courbe associée au point (ici, 000).
b) Courbes d'indentation au centre de la particule (014, 015, 016 et 020) et une courbe d'indentation sur la surface (000).
c) Dérivée des courbes d'indentation. On peut voir l'apparition d'un plateau entre de -0,02 et -0,04 N/m.
d) Histogramme des valeurs de la dérivée. Un pic de valeurs apparait lorsqu'il y a présence d'un plateau (ici à 0,022 ± 0,003 N/m).

confirmé par l'histogramme des dérivées (figure 3.12.d). L'appui sur la surface n'atteint pas le régime élastique du levier, avec un palier à 0,013 N/m, visible uniquement sur la courbe de surface.

Ce premier palier correspondrait à la déformation de la membrane, première paroi de l'objet touchée par la pointe. En appliquant la formule du modèle du 1er ordre (Chap. 2.IV.6, équation (2.21)) à k_{mes}, on obtient une raideur k_{vir} = 0,03 N/m.

L'idée d'une forte indentation est dans un premier lieu de balayer un intervalle de pentes plus importantes que celles de la faible indentation et dans un second lieu d'atteindre la réponse mécanique du core du VIH-1. Dans le cas d'une forte indentation (figure 3.13), le régime de déformation maximale est atteint pour les courbes de force réalisées sur la surface comme l'indique la dérivée de la courbe (figure 3.13.c).

Pour déterminer la position de la particule lors de cette expérience d'indentation, le critère sur l'aire entre la courbe étudiée et celle obtenue sur la surface (la 119) est préféré aux autres critères (figure 3.13.a). La sélection des courbes s'est centrée sur les courbes 095, 096, 099 et 100 (figure 3.13.b).

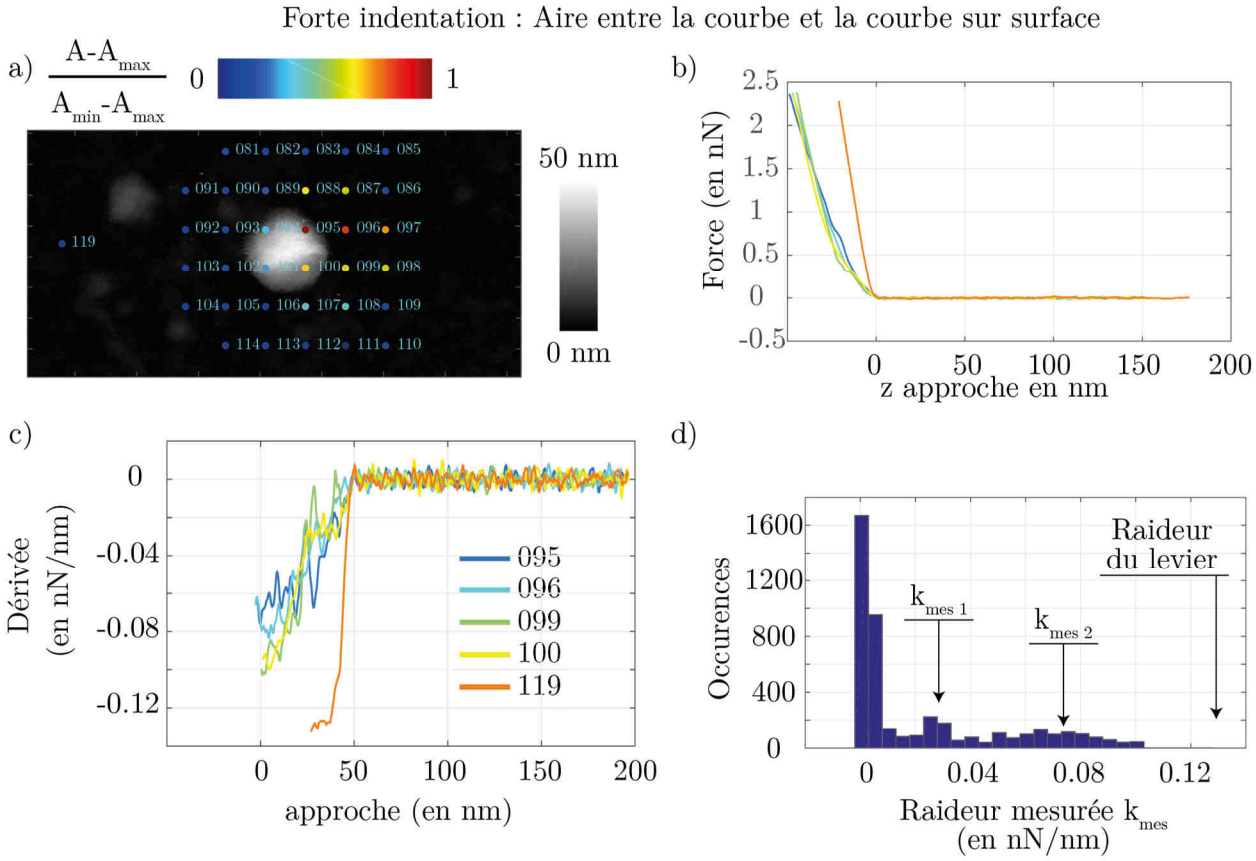


figure 3.13 - Expérience d'indentation sur des VLPs p8.2 à forte indentation (20 nm)
a) Expérience de *Point&Shoot* sur une particule VLP p8.2 en liquide (Solution tampon TNE). En noir et blanc, l'image AFM de la particule (*PeakForce Mode* avec une pointe dNPS, de 0,13 N/m dans ce cas-là). En couleur, chaque point représente une expérience d'indentation, le code couleur associé correspond à l'aire se trouvant entre la courbe associée au point et la courbe réalisée de la surface (ici, la 119). La dérive du cristal piézoélectrique a déplacé la particule par rapport à la figure précédente.
b) Courbes d'indentation au centre de la particule (095, 096, 099 et 100) et une courbe d'indentation sur la surface (119).
c) Dérivée des courbes d'indentation. On peut voir l'apparition d'un plateau entre de -0,02 et -0,04 N/m.
d) Histogramme des valeurs de la dérivée. Un pic de valeur apparait lorsqu'il y a présence d'un plateau (ici un pic fin autour de à $k_{mes\,1}$ = 0,025 ± 0,005 N/m et un pic large autour de $k_{mes\,2}$ = 0,065 ± 0,01 N/m).

Le calcul de la dérivée montre la présence de deux paliers, le premier autour de $k_{mes\ 2}$ = 0,025 ± 0,01 N/m, le second autour de $k_{mes\ 2}$ = 0,065 ± 0,01 N/m ce qui est confirmée par l'histogramme des dérivées faisant apparaitre deux pics (figure 3.13.d).

La largeur relativement importante du deuxième pic peut avoir deux raisons :

La première explication vient de l'incertitude de mesure. En effet, la formule de propagation des erreurs donne pour k_{vir} une incertitude de la forme :

$$\frac{\Delta k_{vir}}{k_{vir}} = \frac{\Delta(k_{mes} - k_{lev})}{k_{mes} - k_{lev}} + \frac{\Delta k_{mes}}{k_{mes}} + \frac{\Delta k_{lev}}{k_{lev}} \approx \frac{\Delta k_{mes} + \Delta k_{lev}}{k_{mes} - k_{lev}} + \frac{\Delta k_{mes}}{k_{mes}} + \frac{\Delta k_{lev}}{k_{lev}} \tag{3.6}$$

Le premier terme diverge pour une raideur proche de la raideur du levier ce qui est le cas pour le deuxième pic $k_{mes\ 2}$.

La deuxième explication pourrait être la non-homogénéité du core. En effet, sa forme particulière et sa taille variable pourrait justifier une non-homogénéité et une non-anisotropie des propriétés mécaniques. Dans cette étude, nous avons privilégié la détermination d'une constante de raideur globale mais une investigation plus raffinée pourrait permettre la caractérisation de cette hétérogénéité. Cependant, faute de temps et de matériel, cette approche n'a pas été possible.

Ces résultats ne concernent qu'une seule VLP. En appliquant cette analyse à plusieurs cartographies (faible et forte indentation) sur plusieurs VLPs, on obtient des distributions de valeurs de k_{vir}.

b. Histogrammes des raideurs

Pour chaque particule, quatre courbes sont sélectionnées comme se trouvant au centre de la VLP, pour une faible, une moyenne et forte indentations. Les dérivées des courbes sont alors calculées et réunies dans un histogramme de leurs valeurs pour pouvoir en extraire les pics, comme sur les figures 3.12.d et 3.13.d.

Les valeurs obtenues sont ensuite placées de nouveau dans un histogramme en séparant les premiers pics $k_{mes\ 1}$ relatifs à la membrane des autres pics (si présents) $k_{mes\ 2}$ pouvant être associés à la déformation du core. Les trois types d'expériences de nano-indentation font apparaitre le régime de la membrane. Cependant, il faut réaliser une forte indentation pour sonder le régime du core.

Les valeurs mesurées ne sont pas les constantes de raideurs de la particule. Pour les obtenir, il faut appliquer le modèle du 1er ordre (ressorts en série). Les résultats sont représentés sur la figure 3.14. Alors que pour les faibles indentations, le modèle du ressort est facilement applicable, lorsque pour les fortes indentations la pointe appuie également sur le core, le modèle se complexifie :

- Cas des faibles indentations : L'enveloppe se déforme à peine et le virus peut être modélisé dans ces conditions comme un simple ressort. L'équation (2.21) donne alors une valeur de la constante de raideur moyenne de la membrane lipoprotéique de k_{mem} = 0,035 N/m avec une dispersion standard de 0,01 N/m. Cette valeur est nettement inférieure à la raideur mesurée dans une étude de l'équipe de I. Rousso (Kol et al. 2007) trouvant une raideur six fois plus importante (mais l'expérience menée par l'équipe de I. Rousso se fait sur des VLPs possédant la protéine Env). La constante de raideur de

vésicules sans cholestérol de taille comparable aux VLPs a été mesurée autour de 0,05 ± 0,02 N/m (Liang et al. 2004).

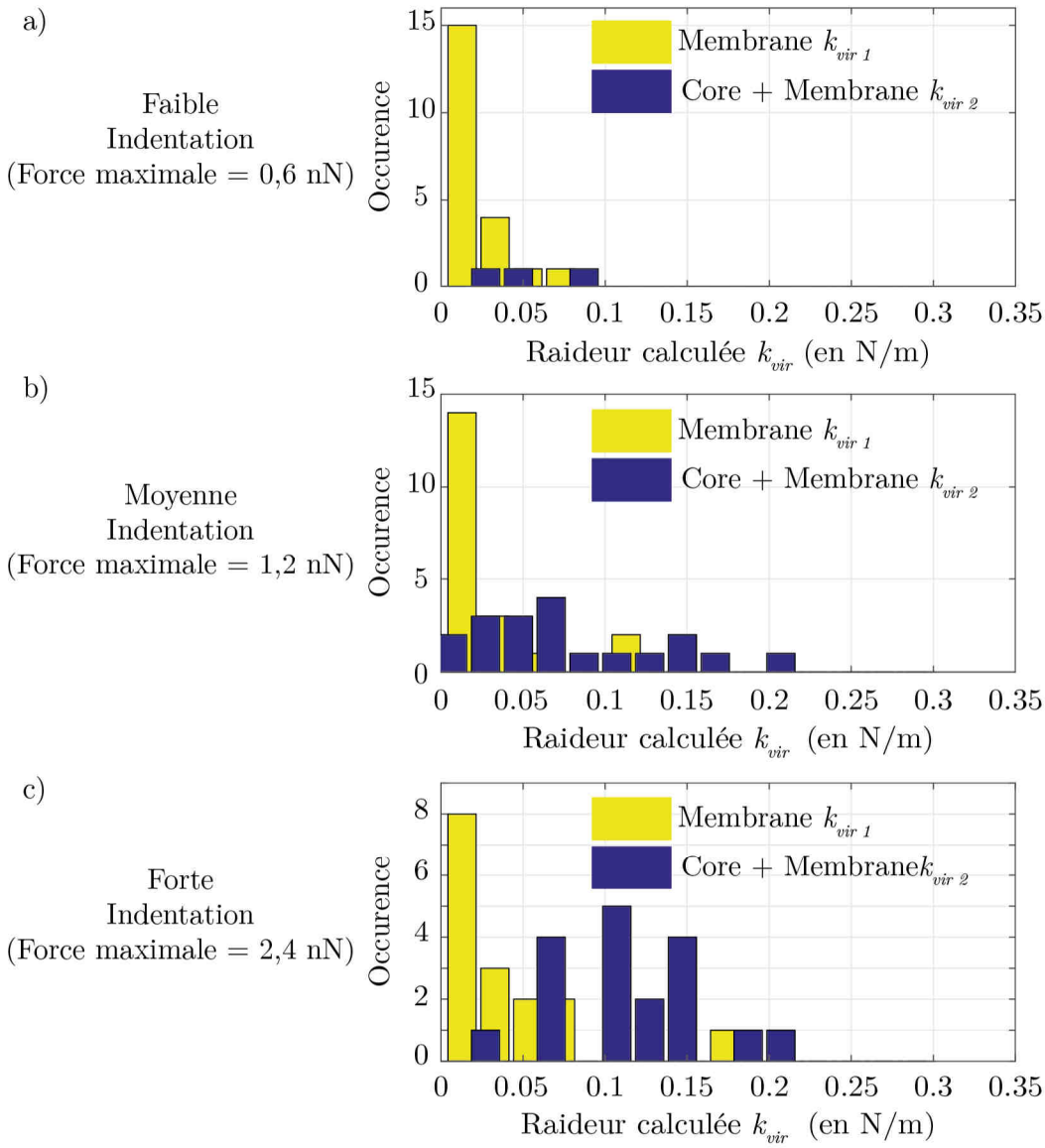


figure 3.14 - Histogramme des raideurs des virus pour les 21 particules pour différentes déflexions maximales.
a) pour une indentation faible (0,6 nN). On voit la raideur de la membrane lipoprotéique enveloppe de la VLP.
b) pour une indentation moyenne (1,2 nN). On appuie assez pour voir apparaitre des courbes ayant un deuxième régime différent de celui de la membrane lipoprotéique.
c) pour une indentation forte (2,4 nN). On appuie assez pour que la pointe indente également le core intérieur avec l'apparition des barres bleues.

- Cas des fortes raideurs : La détermination de la constante de raideur du core est plus complexe, à cause du modèle à employer pour passer de k_{mes} à k_{vir}. Lors d'une forte indentation, la membrane et le core sont tous les deux déformés. Le modèle du premier ordre tendrait à considérer deux ressorts k_{mem} et k_{core} en dérivation (figure 3.15), se déformant en même temps. On aurait alors la relation :

$$k_{core} = \frac{k_{lev}.k_{mes}}{k_{lev} - k_{mes}} - k_{mem} \tag{3.7}$$

La constante k_{core} serait donc décalée vers les valeurs inférieures par rapport à la raideur du système {membrane + core}.

Une autre difficulté est l'anisotropie de la particule. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente (Chap. 3.I.2), les cores peuvent être coniques ou cylindriques, selon l'endroit où l'expérience a été réalisée, la réponse n'est pas nécessairement la même.

Cependant, la valeur estimée de k_{core}, environ 0,1 ± 0,05 N/m, donne un ordre de grandeur équivalent à ceux obtenus sur d'autres virus non enveloppés (voir Chap. 1.II.3 et (Mateu 2012))

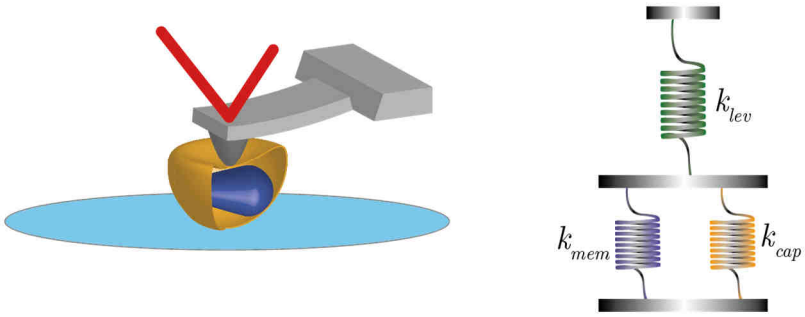


figure 3.15 - Modèle des trois ressorts.
Lors d'une forte indentation, la membrane et le core sont comprimés ensemble, ce qui justifie un modèle de ressorts en dérivation.

4. Discussion.

Dans cette première partie nous nous sommes intéressés aux propriétés morphologiques et mécaniques des VLPs et des cores du virus VIH-1.

La grande résolution de l'AFM a permis d'observer, d'analyser et de différencier les VLPs des cores du VIH-1. L'utilisation des différents programmes d'analyse d'images offre la possibilité de caractériser statistiquement la morphologie de ces deux types d'objets.

Nous avons ainsi montré que, grâce à des ajustements elliptiques, le grand-diamètre des VLPs est statistiquement équivalent à celui des cores. Ceci peut se justifier par la formation du core, lors de l'étape de maturation, dans le milieu restreint qu'est l'intérieur de la membrane lipoprotéique. Par contre, la valeur caractéristique du petit-diamètre des cores est deux fois plus petit que celui des VLPs (ce qui s'explique par la forme particulière des cores) et sa dispersion est, elle aussi, également inférieure à celle des VLPs. Cependant, en comparaison avec certains virus non-enveloppés comme le virus AAV, les VLPs et les cores du VIH-1 présentent une grande polydispersité de taille, comme l'indique la figure de la transition (figure T).

En outre les images obtenues par AFM permettent également de relever l'existence de deux formes de cores, cylindrique et conique avec un ratio privilégiant la forme conique (60% des cores). Cette répartition est ainsi différente des cores purifiés à partir de VLPs produites *in cellulo* par l'équipe de H. G. Krausslich avec une proportion de cônes de 90% (Welker et al. 2000). Cette différence aurait peut-être comme justification une

plus grande résistance des cores cylindriques lors des différentes étapes de purification et de dépôt sur la surface de mica.

Nous avons proposé un modèle simple s'appuyant sur la minimisation de l'énergie à l'équilibre de l'élasticité de la membrane protéique du core, s'assemblant dans un milieu restreint. Il peut expliquer l'existence de ces deux formes. En séparant les cores des cylindres, les corrélations entre les paramètres morphologiques montrent que la largeur caractéristique et la dispersion des cônes sont plus grandes que celle des cylindres ce qui n'est pas le cas lorsqu'on considère comme paramètre la longueur. De plus, l'analyse statistique montre que la longueur des cores (proche du grand diamètre obtenu par l'ajustement elliptique et donc proche du diamètre de la VLP) est indépendante de la largeur dans le cas des cylindres et proportionnelle à la largeur dans le cas des cônes. Ces différentes observations nous mènent à penser que lors de la maturation, la distinction cône et cylindre se fait avant que le core atteigne le bord de la membrane lipoprotéique. De plus, puisque la dispersion de longueur est la même entre les deux formes, et que cette longueur est proche du diamètre de la VLP, le volume accessible n'est pas un paramètre déterminant pour avoir un cylindre ou un cône. Si on se rattache à notre modèle, le fait que le volume de liberté du core soit contraint peut justifier les deux formes mais le paramètre R, rayon de la VLP, ne permet pas de dire si on obtiendra l'une ou l'autre.

Nous avons également sondé les propriétés mécaniques des VLPs grâce aux expériences de nano-indentation que permet l'AFM. L'indentation, définie par la déformation maximale autorisée du levier lors de l'enregistrement d'une courbe de force, apparait comme un paramètre important de l'expérience pour mesurer la raideur de la VLP : plus elle est importante, plus on a accès à une large gamme de k_{mes}. Nous avons ainsi pu mesurer, en passant par des modèles simples du premier ordre, la raideur de la membrane k_{mem} = 0,035 N/m et la raideur k_{core} = 0,1 N/m. On peut remarquer que quel que soit l'indentation maximale, la raideur de la membrane reste inchangée : ainsi, si on ne considère que le début de la courbe, donc une indentation faible, on ne sonde que la membrane et non le core, ce qui est le cas dans le travail de I. Rousso (Kol et al. 2007). Dans ce travail, la mesure de la raideur du core au sein de la VLP nous affranchit ainsi de l'étape de purification des cores, étape délicate et susceptible de modifier la mesure de k_{core} soit en sélectionnant les cores les plus stables soit par la présence de triton qui pourrait rester associé aux protéines.

Ce paragraphe a permis d'introduire les différents outils d'analyse, morphologique et mécanique, que nous allons utiliser par la suite pour comparer différents variants du VIH-1 ou pour caractériser l'effet du microenvironnement.

II. Comparaison de différents variants du VIH-1

Dans leurs travaux, les chercheurs en virologie sont amenés à produire différents types de virus, ou variants. Grâce à eux, ils peuvent étudier l'effet d'une protéine sur les propriétés biologiques, en rendant son efficacité plus importante ou au contraire plus faible (voir en bloquant son expression) que celle de la souche sauvage. Ces variants sont obtenus en modifiant le plasmide de transfection lors du protocole décrit dans le Chap. 2.II.1.

Cette partie se concentre sur l'étude des propriétés physiques de certains variants en les comparant avec les VLPs et les cores de p8.2 (pour rappel, les plasmides utilisés sont indiqués sur la figure 3.16):

1. Les VLPs et les cores p8.91.
2. Les VLPs et les cores Q151N.
3. Les VLPs pGag.

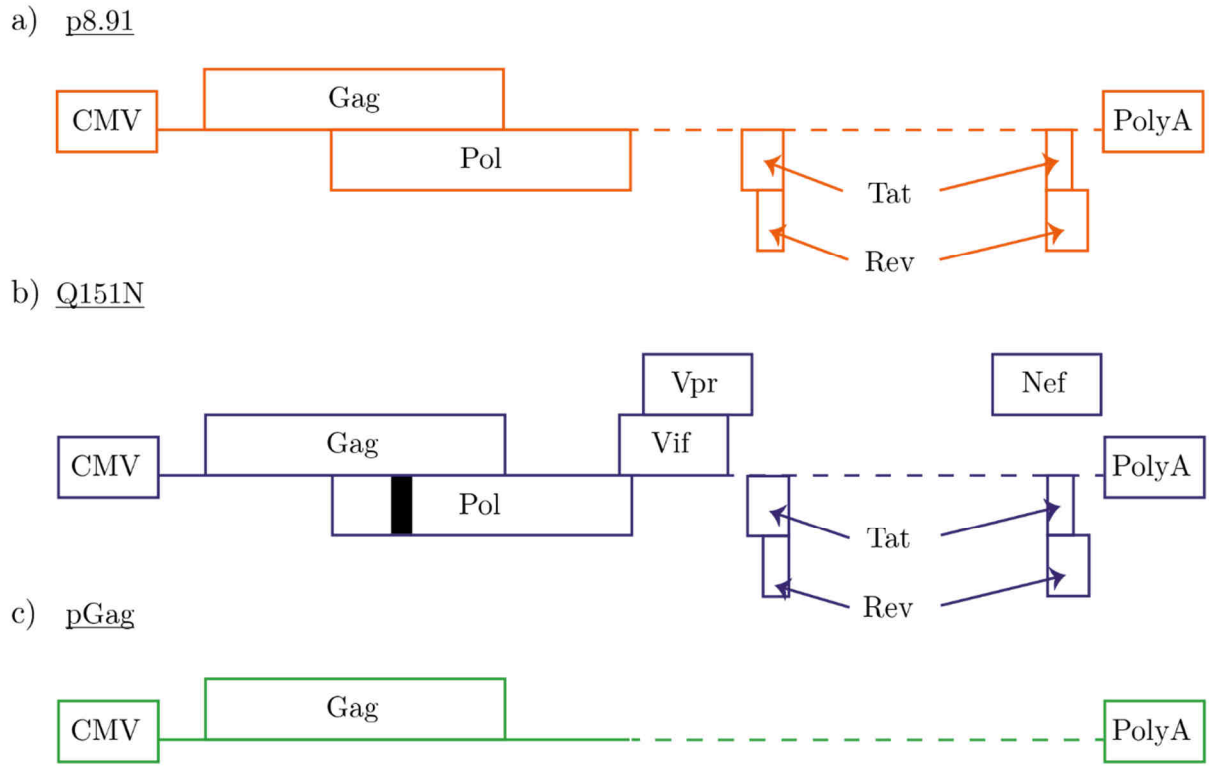


figure 3.16 - Schémas des plasmides des variants p8.91, Q151N et pGag.
a) Il diffère du plasmide p8.2 par l'absence du code pour la production des protéines accessoires (inspiré de (Zufferey et al. 1997))
b) Il diffère du plasmide p8.2 par la modification de la partie codant pour la rétrotranscriptase la rendant cinétiquement peu efficace (inspiré de (Skasko & Kim 2008))
c) Il diffère du plasmide p8.91 par l'absence du code Pol, permettant la production de certaines protéines recombinantes, en particulier la protéase assurant la maturation de la particule par clivage de Gag en trois domaines MA/CA/NC.

1. Comparaison p8.2 vs p8.91

Les particules p8.91 ne possèdent pas les protéines accéssoires Vif, Vpr, Vpu et Nef qui jouent un rôle biologique dans la réplication du virus ainsi que dans les transports du génome et des protéines de structure dans la cellule infectée (voir Chap. 1.IV). Pour étudier ce variant, nous comparons les propriétés morphologiques des VLPs (figure 3.17) et des cores de p8.2 (figure 3.18) avec ceux de p8.91.

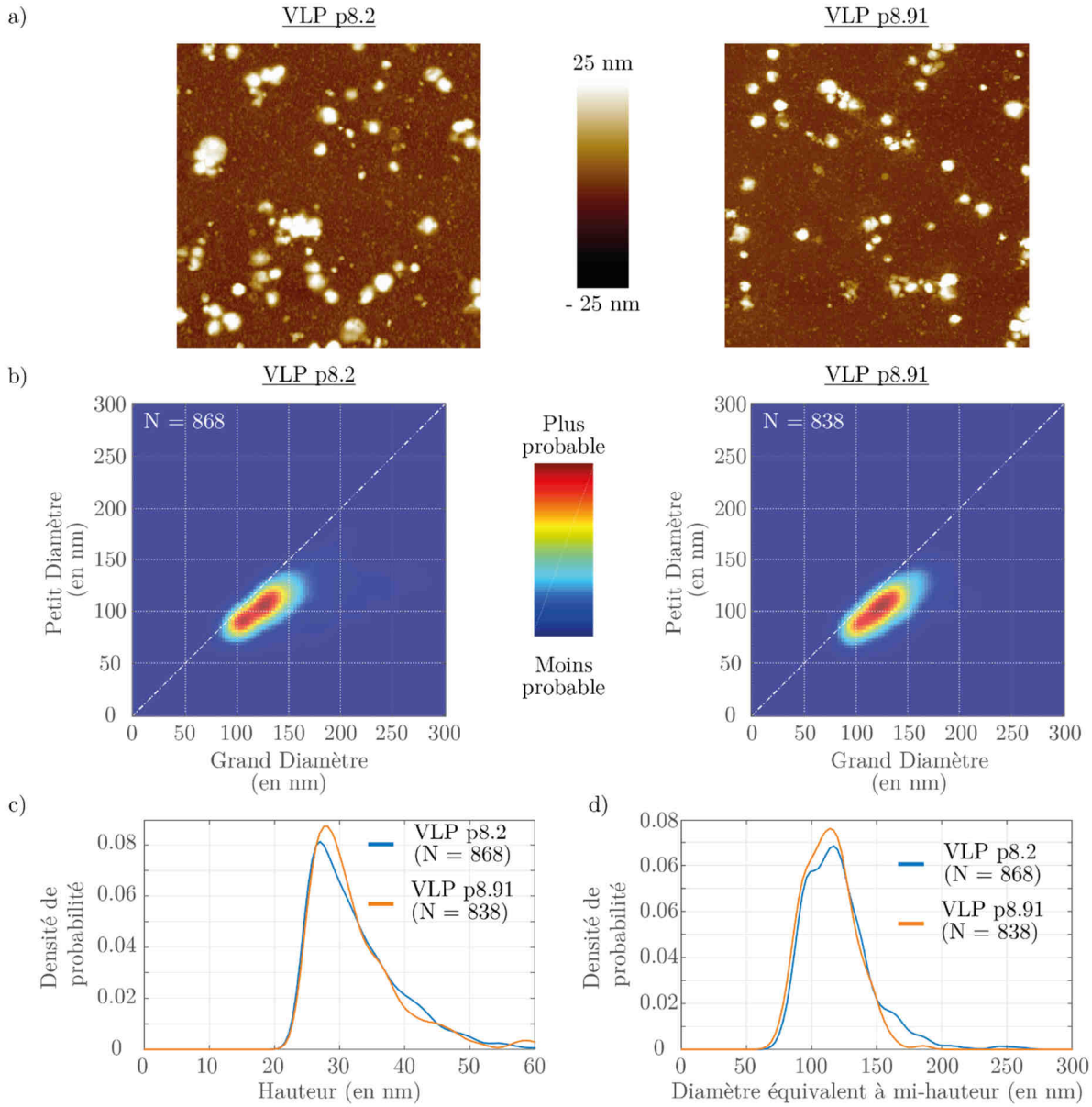


figure 3.17 - Comparaison des morphologies des VLPs p8.2 +ψ (N = 868) et des VLPs p8.91 + ψ (N = 838).
a) Images par AFM dans l'air (*Tapping Mode* avec un levier MPP11100) de VLPs p8.2 (à gauche) et de VLPs p8.91 (à droite).
b) Carte de corrélation entre le grand diamètre et le petit diamètre pour les VLPs p8.2 (à gauche) et les VLPs p8.91 (à droite). Les couples (a,b) les plus probables obtenus sont (126 ± 4 nm, 105 ± 4 nm) pour p8.2 et (123 ± 4 nm, 105 ± 4 nm) pour p8.91. L'asymétrie est respectivement de 0,85 et 0,84.
c) Densité de probabilité des hauteurs pour les VLPs p8.2 (en bleu) et les VLPs p8.91 (en orange). Les valeurs les plus probables sont respectivement de 27 ± 1 nm et de 27,6 ± 1 nm.
d) Densité de probabilité des diamètres équivalents à mi-hauteur pour les VLPs p8.2 (en bleu) et les VLPs p8.91 (en orange).

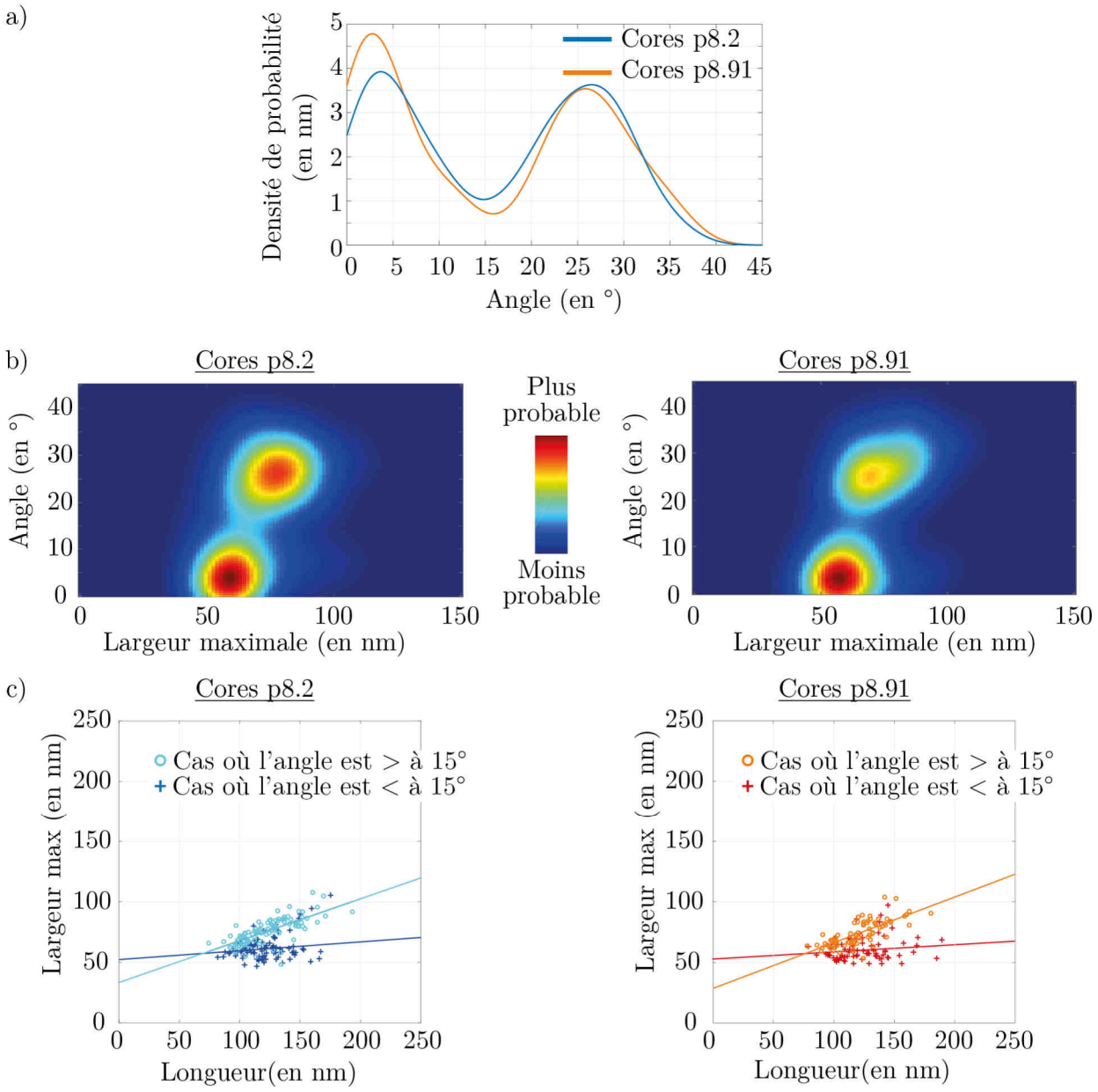


figure 3.18 - Comparaison morphologique des cores p8.2 + ψ (N = 188) et p8.91 + ψ (N = 117)
a) Densité de probabilité des angles des cores p8.2 (en bleu) et des cores p8.91 (en orange). La séparation entre les cores cylindriques et les cores coniques se fait autour de 15°. Les dispersions des cônes pour les cores p8.2 et p8.91 sont très proches.
b) Carte de corrélation entre la largeur maximale et l'angle des cores p8.2 (à gauche) et des cores p8.91 (à droite). Le décalage de largeur entre les cylindres et les cônes est observé pour les deux variants.
c) Nuage de points reliant en abscisse la largeur maximale et en ordonnée la longueur des cores p8.2 (à gauche - en bleu) et des cores p8.91 (à droite – en orange). La forme en V est observée pour les deux variants avec les deux branches séparant ainsi la population des cores cylindriques (en bleu foncé pour les cores p8.2 et en rouge pour les cores p8.91) et la population des cores coniques (en bleu clair pour les cores p8.2 et en orange pour les cores p8.91). La séparation des deux populations s'est faite pour une valeur d'angle frontière de 15°.

a. Propriétés morphologiques des VLPs

La sélection et l'analyse morphologique sur des VLPs isolés de type p8.2 et p8.91 (figure 3.17.a) déposés sur une surface de mica fonctionnalisée par la Poly-L-lysine donne une étude statistique pertinente sur plus de 800 objets.

L'ajustement elliptique présente des grands et petits diamètres équivalents autour de (126 ± 3 nm ; 105 ± 3 nm) pour p8.2 et (123 ± 3 nm ; 105 ± 3 nm) pour p8.91 (figure 3.17.b). La différence ne peut être significative du fait des incertitudes de mesure. De même, la dispersion, représentée par l'étalement de la tâche sur les cartes de corrélation, semble être du même ordre de grandeur pour les deux types de VLPs.

On peut en tirer la même observation par l'étude des densités de probabilité de la hauteur et du diamètre équivalent montrant ainsi que notre approche ne permet pas de distinguer morphologiquement les VLPs p8.91 et p8.2 ce qui suggère un rôle non structurant des protéines accessoires.

b. Propriétés morphologiques des cores

L'analyse morphologique des cores (mesure d'angle au sommet et dimensions) montre également un comportement similaire pour les deux types de cores, p8.91 et p8.2 (figure 3.18).

La répartition entre les cores de type cylindre et les cores de type cône sont à peu près les mêmes. Ainsi, pour p8.2, sur 188 objets, 42 % sont des cylindres et 58 % des cônes alors que pour p8.91, sur 151 objets, 45 % sont des cylindres et 55 % des cônes (figure 3.18.a).

En ce qui concerne les paramètres géométriques, que cela soit la forme des cores, ils sont proches pour les cônes (avec une largeur caractéristique de 70 ± 4 nm pour p8.91 et 80 nm ± 4 nm) et égaux pour les cylindres (57 ± 4 nm pour les deux variants) ainsi que la dépendance de la largeur du core avec sa longueur.

Le variant p8.91 diffère biologiquement par l'absence de protéines accessoires, le rendant moins efficace à la production. Par contre, il ne présente pas de différence morphologique avec les caractéristiques des cores et des VLPs p8.2 suggérant l'absence d'effet des protéines accessoires sur la formation du core au moment de l'étape de maturation.

2. Comparaison p8.2 vs Q151N

Une des hypothèses de recherche que nous avons posée, lors de cette thèse est le rôle de l'étape de rétrotranscription dans l'ouverture de la capside et la libération du génome viral dans la cellule infectée. Pour cela, nous souhaitons comparer les cores des deux variants p8.2, la particule sauvage, et un de ses variants, Q151N. Dans ce mutant, la protéine rétrotranscriptase RT présente une cinétique nettement réduite grâce à une mutation du site catalytique de la RT (partie Pol dans le plasmide Q151 N, voir figure 3.16).

Avant de comparer les stabilités de ces particules et leurs comportements lorsque la rétrotranscription est initiée, nous avons souhaité quantifier les propriétés physiques des particules virales produites par transfection de ce type de plasmide.

Pour cela, nous avons d'abord réalisé une étude de la morphologie des cores viraux. Les propriétés mécaniques ont également été caractérisées par nano-indentation AFM.

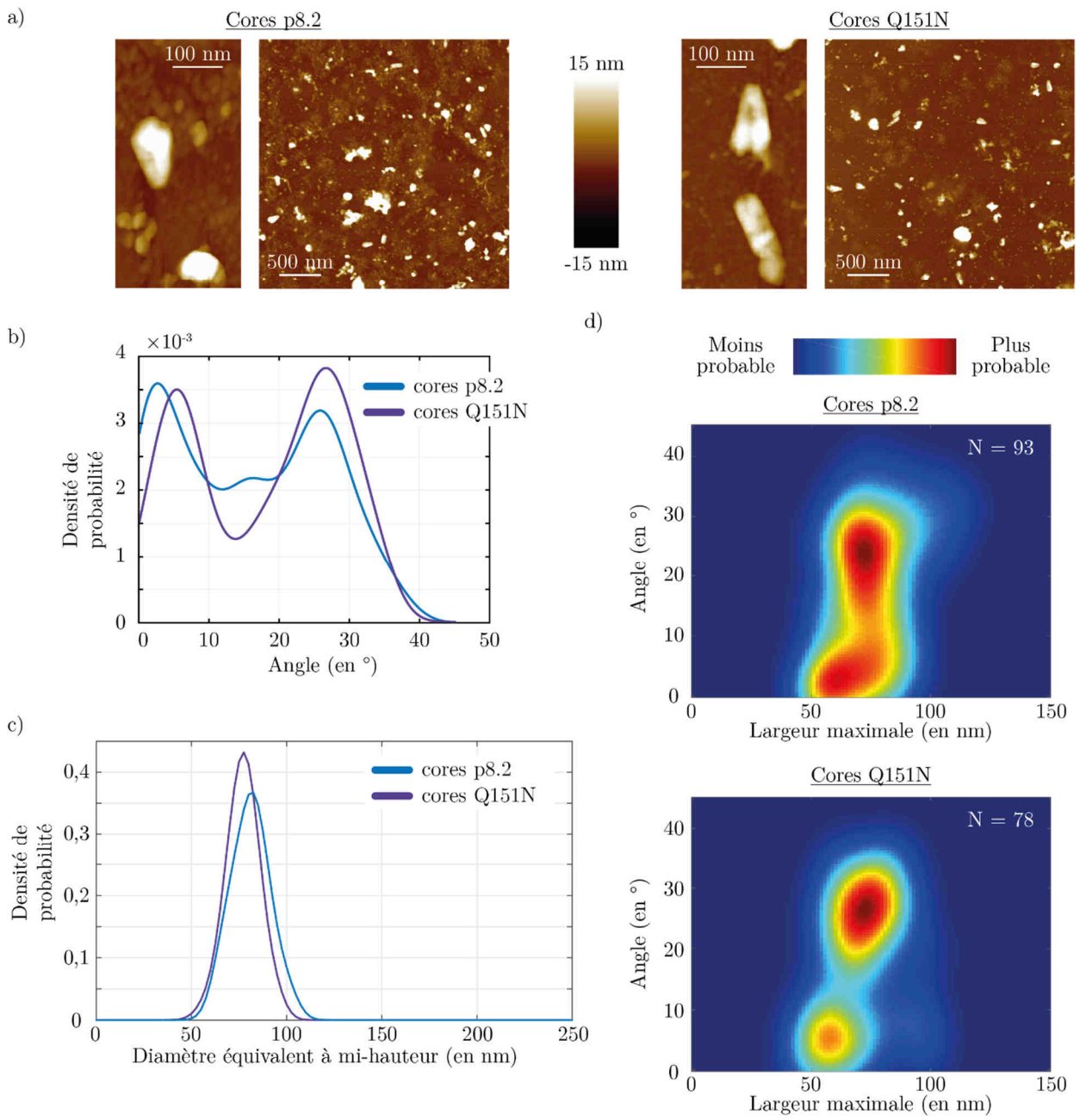


figure 3.19 - Comparaison morphologique des cores p8.2 (N = 93) et des cores Q151N (N = 78)
a) Image par AFM dans l'air (*Tapping Mode avec un levier MPP11100)* de cores p8.2 (à gauche) et de cores Q151N (à droite) sur une surface de mica fonctionnalisé à la Poly-L-Lysine.
b) Densité de probabilité de l'angle des cores p8.2 (en bleu) et des cores Q151N (en violet). La séparation des populations entre les cores coniques et les cores cylindriques se fait autour de 12°. La proportion des cores coniques (angle respectivement supérieur à 12°) représente 60% des cores p8.2 de et 63% des cores Q151N.
c) Densité de probabilité du diamètre équivalent à mi-hauteur pour les cores p8.2 (en bleu) et des cores Q151N (en violet). La valeur du diamètre le plus probable est de 82 ± 6 nm pour les cores p8.2 et 77 ± 6 nm pour les cores Q151N.
d) Carte de corrélation entre la largeur maximale et l'angle pour les cores p8.2 (en haut) et les cores Q151N (en bas). Le décalage de largeur entre les cylindres et les cônes est observé pour les cores Q151N et légèrement pour les cores p8.2.

a. Les propriétés morphologiques des cores p8.2 versus Q151N

Les images obtenues (figure 3.19.a) montrent une surface relativement sale mais où se trouvent quelques cores à géométrie cylindrique ou conique, que cela soit pour les cores p8.2 ou les cores Q151N. Le programme de sélection automatisé fonctionne malgré le bruit et permet d'isoler un certain nombre de cores se trouvant sur la surface de mica fonctionnalisé avec de la poly-L-lysine. Malheureusement, la statistique reste assez faible. Les résultats présentés doivent donc être nuancés par le faible nombre d'objets analysés.

Les deux familles de cores peuvent être séparées l'une de l'autre autour de 12° (figure 3.19.b), avec une répartition quasiment équivalente :

Pour les cores Q151N, sur 78 objets, 37 % sont des cylindres et 63 % des cônes. Pour les cores p8.2, sur 93 objets, 40 % sont des cylindres et 60 % des cônes. Les densités de probabilité de leurs diamètres équivalents à mi-hauteur sont également très proches, que ce soit la valeur la plus probable mais également la dispersion. Le décalage de la largeur maximale reste présent bien que le faible nombre d'objets atténue la distinction.

b. Les propriétés mécaniques des cores p8.2 versus Q151N

Bien que les propriétés morphologiques semblent être similaire, au niveau de précision que nous offre l'AFM, nous avons envisagé des expériences de nano-indentations pour voir d'éventuelles différences mécaniques de ces VLPs.

La meilleure approche aurait été d'étudier les propriétés mécaniques directement sur les cores. Malheureusement, en condition d'imagerie liquide, les cores coniques ou cylindriques sont très peu présents sur la surface rendant les expériences d'indentation directement sur les cores difficiles voire impossibles. Nous avons donc sondé la réponse mécanique des cores en réalisant l'indentation sur les VLPs.

Pour cela, nous utilisons un levier dNPS, de raideur 0,94 ± 0,05 N/m, sur des VLPs p8.2 et Q151N déposées sur des surfaces de mica fonctionnalisées avec de la poly-L-lysine. Nous appliquons le même protocole de nano-indentation et d'analyse des courbes de force déjà présenté dans la partie sur les VLPs p8.2 (Chap. 3.I.3).

Les résultats sont présentés dans la figure 3.20. Les expériences de faible indentation montrent un comportement élastique des VLPs avec une raideur moyenne k_{mem} de 0,025 ± 0,01 N/m pour les VLPs p8.2 et Q151N. Les expériences de fortes indentations montrent pour les deux mutants un deuxième régime, lorsque la membrane et le core sont déformés. Les raideurs mesurés, sur une large dispersion, présentent une moyenne très proche entre Q151N et p8.2 (0,12 ± 0,04 N/m).

Nous avons ainsi montré que la mutation de la rétrotranscriptase n'apportait pas de modification des propriétés morphologiques des cores ni des propriétés mécaniques des VLPs mesurés par AFM pour des objets conservés à 4°C sans initiation (à priori) de la rétrotranscription, c'est-à-dire à l'équilibre thermodynamique. Ce résultat permet ainsi d'exclure tout biais préliminaire dû à des propriétés intrinsèques différentes pour le mutant lors des futures expériences d'initiation de la synthèse d'ADN proviral par la rétro-transcriptase.

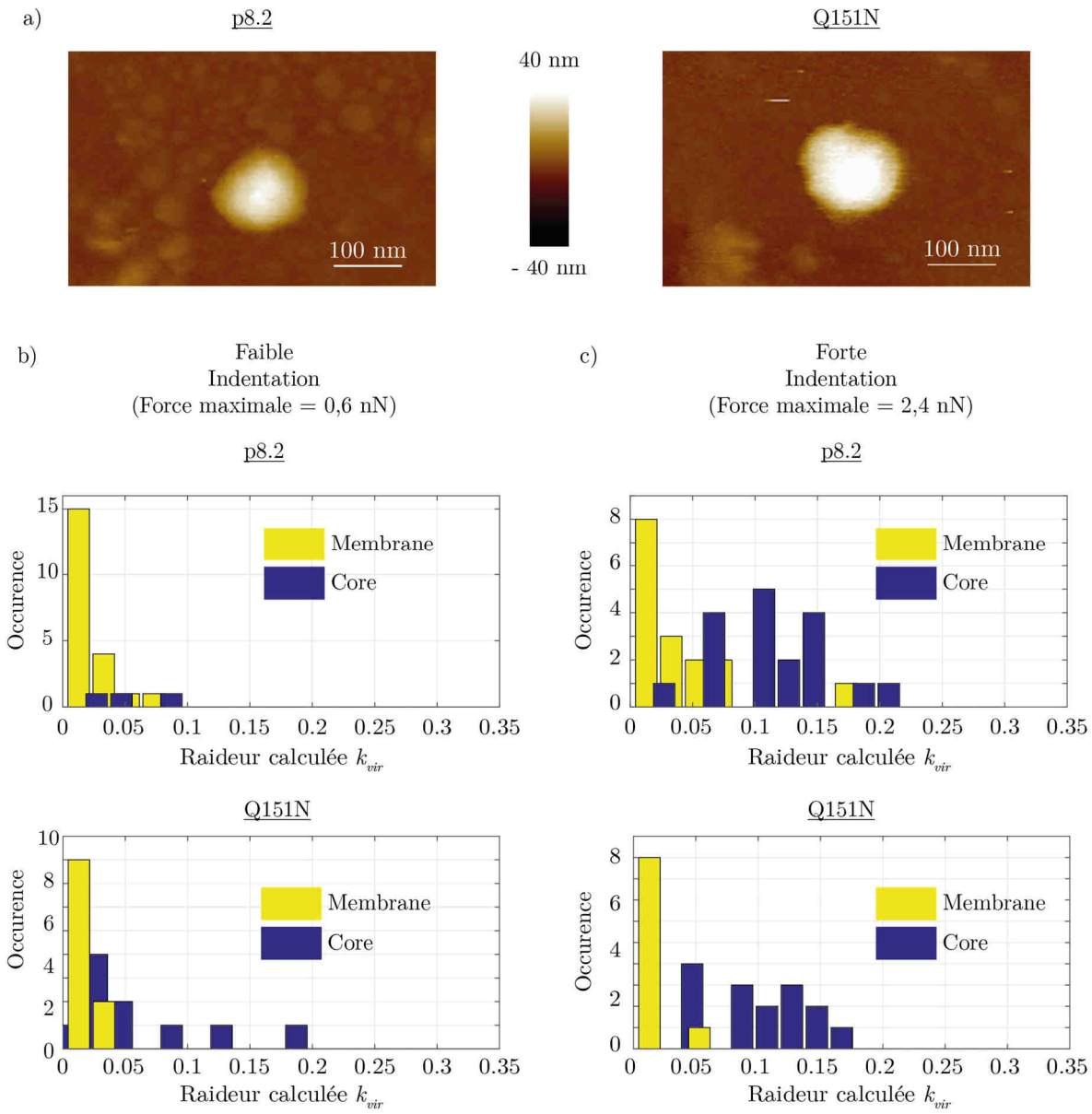


figure 3.20 - Indentation sur les VLPs p8.2 et Q151N

a) Image par AFM en liquide (solution tampon TNE – *PeakForce Mode* avec un levier dNPS) de VLPs p8.2 et Q151N.

Histogramme des raideurs calculés suite aux expériences d'indentation avec un levier dNPS de raideur k_{lev} = 0,011 N/m (± 0,03 N/m) sur les VLPs p8.2 (en haut) et sur les VLPs Q151N) pour (b) de faibles indentations et (c) de fortes indentations.

3. Comparaison VLP immature vs VLP p8.91 mature

Lors du bourgeonnement des virus à la surface de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée, les virus sont encore immatures. L'étape de maturation, où les virus passent à l'état mature (formation du core) grâce à l'action de la protéase virale (PT), est une étape nécessaire à l'infection et à la propagation du virus dans l'hôte. Dans cette partie, nous nous intéressons aux propriétés physiques de ces particules immatures en les comparant avec celles de la particule mature.

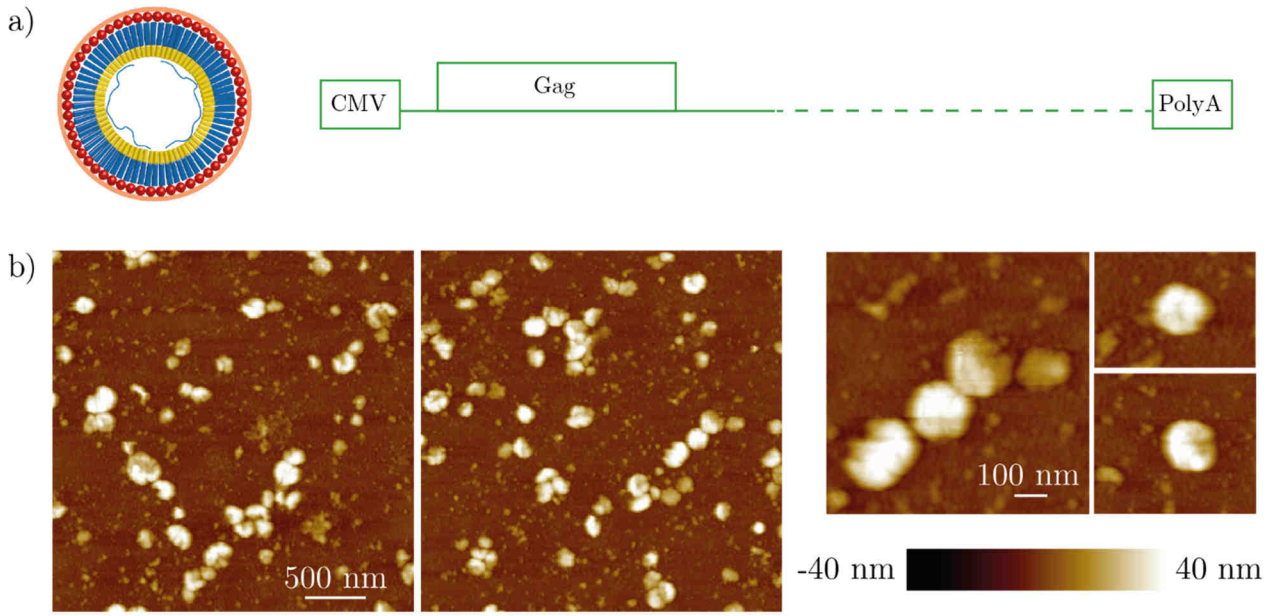


figure 3.21 - Imagerie par AFM des VLPs pGag.
a) (à gauche) Schéma simplifié de la particule pGag produite par une transfection du plasmide pGag (représenté à droite).
b) Image par AFM dans l'air de particules VLPs pGag (en *Tapping mode* avec un levier MPP11100) sur une surface de mica fonctionnalisée par la poly-L-lysine. Des images zoomées sur les VLPs montre la morphologie irrégulière des VLPs pGag et la présence d'une cavité sur certaines particules.

Pour cela, le protocole de transfection reste le même que celui utilisé pour p8.91 à ceci près que le plasmide pGag, n'exprime pas la polyprotéine GagPol qui après scission donne Gag, IN, RT et finalement la protéase PT qui permet la maturation de la VLP par clivage de Gag en MA, CA, NC et p6. Les VLPs ainsi créées sont bloquées à un état immature, ne contenant que Gag (figure 3.21.a).

Les images par AFM dans l'air de VLPs pGag montrent une morphologie proche des VLPs p8.91 (figure 3.17) à ceci près que l'on ne discerne pas la présence d'objets de type conique ou cylindrique à l'intérieur des VLPs ce qui est le cas pour p8.91 ou p8.2 mais plutôt un trou dans la structure interne. Cet caractéristique est à rapprocher des travaux de J. Briggs (Bharat et al. 2012; Schur et al. 2014). Par cryoEM, il observe que la polyprotéine Gag ne recouvre pas, à l'intérieur, la totalité de la bicouche lipidique, d'où peut-être la présence de ce trou observé par AFM.

La densité de probabilité des diamètres équivalents des VLPs pGag et des VLPs p8.91 (figure 3.22) montre une valeur caractéristiques des particules immatures (120 ± 4 nm) nettement supérieure à celle des particules matures (96 ± 4 nm). La dispersion est également nettement différente entre les deux types : la variance pour p8.91 est de 14 nm tandis que pour pGag elle correspond au double avec 28 nm.

Cette différence de taille caractéristique pourrait se justifier en s'intéressant aux nombres de poly-protéines assemblés dans les particules immatures. Environ 2500 protéines Gag recouvrent la face interne de la membrane de la particule immature (Briggs & Kräusslich 2011). Lors de l'étape de maturation, la protéase scinde principalement en trois parties la polyprotéine. Les protéines MA, issues de cette découpe, plus petites que Gag, se réarrangent pour former de nouveau une couche protéique sur la face interne de la bicouche lipidique. Du fait de la différence de taille entre MA et Gag, la gêne stérique oblige à la membrane d'une

particule immature une déformation plus important comparée à celle d'une particule mature pouvant ainsi expliquer cette différence de taille.

La taille du trou dans la couche de polyprotéines Gag, plus ou moins grande, pourrait expliquer la polydispersité importante du diamètre des particules immatures.

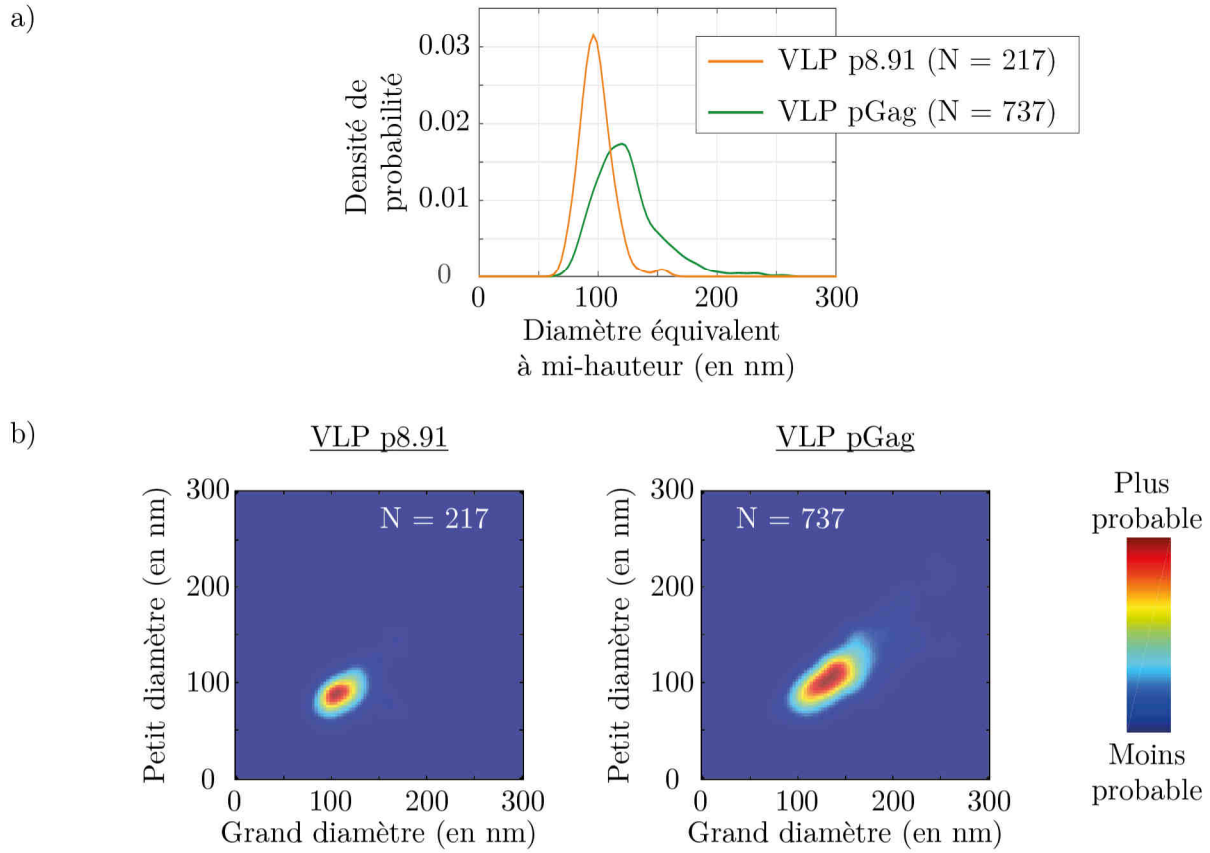


figure 3.22 - Etude morphologique comparée des VLPs p8.91 (N = 217) et des VLPs pGag (N = 737)
a) Densité de probabilité des diamètres apparents des VLPs p8.91 (en orange) et des VLPs pGag (en vert). Le diamètre caractéristique des VLPs p8.91 est de 96 ± 4 nm tandis que celui des VLPs pGag est de 120 ± 4 nm. La déviation standard σ est de 14 nm pour p8.91 et de 28 nm pour pGag.
b) Carte de corrélation des grands et petits diamètres des VLPs p8.91 (à gauche) et pGag (à droite). Le couple de diamètre caractéristique le plus probable est pour p8.91 (105 ± 4 nm ; 87 ± 4 nm) et pour pGag (135 ± 4 nm ; 105 ± 4 nm).

Une courte étude des propriétés mécaniques de la particule immature a été faite (figure 3.23). Alors que la pente de la courbe de force réalisée sur une VLP p8.91 montre la présence de deux paliers, un relatif à la raideur de la membrane, l'autre à celle du core à l'intérieur, celle obtenue sur une VLP pGag montre un régime non-linéaire difficile à exploiter. Le modèle du premier ordre ne peut être appliqué dans ce cas de figure. Un modèle utilisant une loi de puissance en fonction de l'indentation (loi de Hooke) semble le plus adapté. L'origine de l'allure de cette courbe pourrait être la présence du trou au niveau de la couche de poly-protéines Gag sur la face interne de la membrane lipidique, conduisant à une réponse plus complexe que la simple déformation d'une coque élastique.

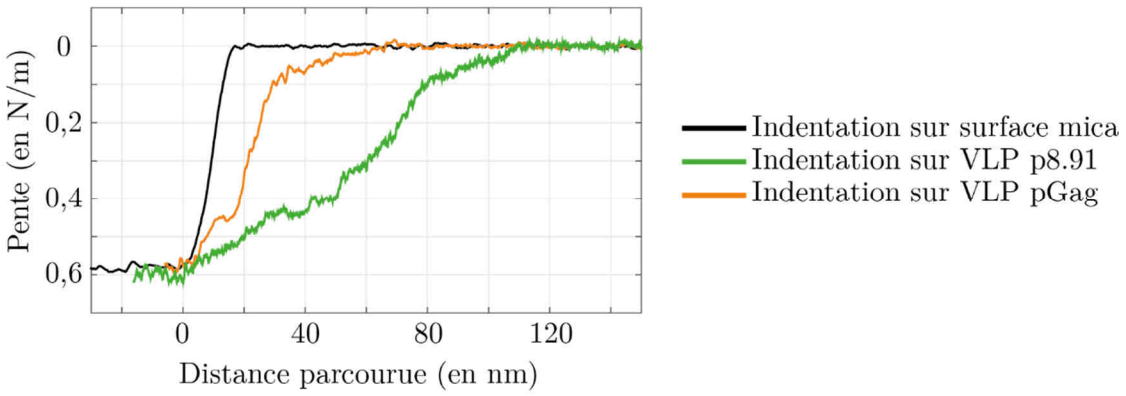


figure 3.23 - Pente de courbes de force réalisées sur des VLPs p8.91 (en orange) et p8.2 (en vert) pour une très forte indentation (20 nN).
L'expérience a été réalisée dans du TNE, avec un levier dNPS de raideur 0,6 N/m.
Le régime du levier est atteint. La courbe noire a été réalisée sur une surface dure.

4. Discussion

Dans cette partie, nous utilisons les outils mis en place dans le premier paragraphe pour comparer différents variants du VIH-1.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à confronter les particules, VLPs et cores, obtenues par la transfection du plasmide p8.2 avec celles obtenues grâce à p8.91. Ce plasmide ne diffère de p8.2 que par l'absence des parties codant pour les protéines accessoires, nous permettant ainsi de voir les effets de ces dernières sur les propriétés physiques des différentes particules obtenues. D'après nos résultats, la similarité des distributions pour les paramètres morphologiques des VLPs et des cores suggère que les protéines accessoires interviennent sur la formation des virus mais ne jouent pas de rôle morphologique lors du bourgeonnement (contrôlant la sortie des VLPs et donc leurs tailles) ni lors de l'assemblage assisté des protéines CA autour du complexe génome-protéique lors de la maturation du core (contrôlant la forme et la taille des cores).

La deuxième partie consistait à comparer le mutant Q151N, dont l'activité rétrotranscriptase est très atténuée, avec les particules p8.2. Aucune différence, ni morphologique ni mécanique, n'a été observée. Ce qui n'est pas étonnant puisque toutes les protéines de la capside virale (Gag, MA, CA et NC) sont sauvages, que ce soit pour p8.2 ou Q151N. Ces résultats nous permettent d'étudier l'ouverture du core viral et l'étape de rétrotranscription de rétrotranscription (Chap. 3.IV) sans considérer de biais issus de différences dues à la nature même des particules virales au départ.

La dernière partie s'est intéressée à l'étape de maturation du cycle viral du VIH-1 grâce à la comparaison entre les VLPs immatures (obtenues par la transfection du plasmide pGag) avec les VLPs matures (issues de la transfection p8.91). Des différences, à la fois morphologiques et mécaniques, sont observées. Les travaux réalisés par l'équipe de J. Briggs montrent par cryoEM également une taille plus importante des VLPs immatures (Schur et al. 2014). Ceux de I. Rousso (Kol et al. 2007) montrent par contre un comportement linéaire des déformations des VLPs immatures avec une raideur moyenne 10 fois plus importante que les

particules matures. Une continuité possible de cette étude serait la comparaison mécanique d'autres mutants, modifiant les interactions entre les protéines CA.

Dans ce paragraphe, les VLPs p8.2, p8.91 et Q151N étudiés sont matures, c'est-à-dire que les polyprotéines Gag ont été clivées pour former les cores, coniques ou cylindriques, autour du génome. Terminant la phase tardive, le bourgeonnement et la maturation sont déterminants pour permettre au virus d'infecter une nouvelle cellule. Nous nous intéressons également dans le paragraphe qui suit au rôle de l'ARN viral sur la morphologie de ces particules matures.

III. Comparaison des propriétés physiques : Effet du signal ψ

La dispersion en taille des VLPs du VIH-1, virus enveloppé, est nettement supérieure à certains virus non enveloppés, comme AAV. Nous avons focalisé une partie de la recherche sur l'effet de la présence du génome pseudo-viral dans cette dispersion. Pour cela, nous avons exploité le rôle du signal ψ dans l'étape de bourgeonnement.

Grace aux images réalisées par AFM et au programme d'analyse, nous avons comparé la morphologie de VLPs p8.91 produites en présence du signal ψ, VLPs +ψ et cores +ψ, ou non, VLPs –ψ et cores –ψ (voir Chap.2 II. 1.). Pour rappel, les VLPs +ψ contiennent, dans leurs cores, principalement le génome pseudo-viral et une faible quantité d'ARN cellulaires tandis que les VLPs –ψ contiennent uniquement des ARN cellulaires (Muriaux et al. 2001). Cependant, des travaux menés sur ces types de VLP, ont montré que la quantité d'ARN reste conservée, en présence ou en absence de signal ψ (Rulli et al. 2007) pour des particules de même taille.

L'étude des propriétés morphologiques des cores peut éclairer le rôle physique du signal ψ sur la maturation de la particule. S'intéresser aux VLPs donne un renseignement sur l'influence du signal ψ sur les propriétés morphologiques à l'issue des deux étapes de sortie des particules, c'est à dire le bourgeonnement puis la maturation.

Je présente dans cette partie, les principaux résultats obtenus dans cette étude. Pour plus de détails, se référer à l'article publié dans le journal Plos One en 2014 (Faivre-Moskalenko et al. 2014). A noter que le programme Matlab pour la mesure des angles des cores, développé après la publication de cet article, apporte de nouvelles informations sur la comparaison des cores +ψ et –ψ.

1. Aspect expérimental

Initialement, les VLPs et les cores ont été produites par des cellules 293T co-transfectées par les plasmides p8.91 et pψ. Cependant, la stabilité des cores n'était pas suffisante pour résister en nombre à l'étape de purification et pouvoir réaliser des expériences par AFM. Nous avons préféré utiliser des cellules 293T dites stables, produisant sans transfection le génome pseudo-viral. L'utilisation du plasmide pψ dans ce cas-là n'est donc pas nécessaire ce qui simplifie le processus de transfection d'un plasmide au lieu de deux. Ceci ne conduit pas à des différences notables de quantité des VLPs produites et purifiés ni à des modifications de leurs propriétés morphologiques. Par contre, la quantité de cores est nettement supérieure lorsque l'on utilise une simple transfection dans des cellules stables.

Ce travail repose sur l'observation par l'AFM de surfaces de mica, fonctionnalisées par la poly-L-Lysine, où les particules, VLPs ou cores, +ψ ou –ψ, ont été préalablement déposées. L'imagerie a été principalement réalisée dans l'air en *Tapping Mode* avec un levier de type MPP11100 mais les VLPs ont également été observées en liquide, en *Peak Force Mode* avec un levier de type *Scan Assyst Fluid +*.

Dans l'air, la présence de nombreuses VLPs p8.91 ±ψ (figure 3.24) sur la surface permet de réaliser une étude statistique de la morphologie des objets. Il en est de même avec les cores p8.91 ±ψ.

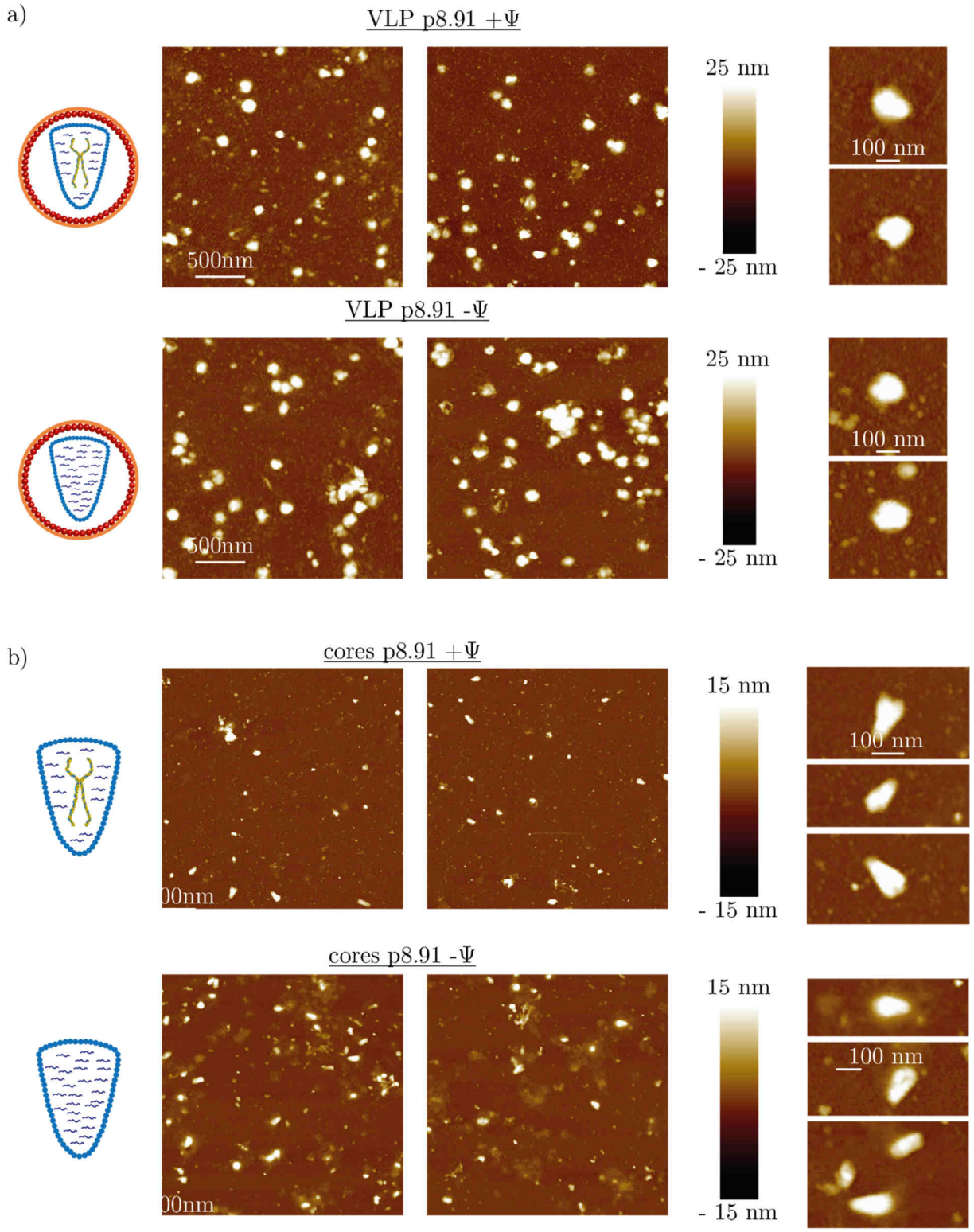


figure 3.24 - Images par AFM dans l'air de dépôts sur mica fonctionnalisé poly-L-lysine
Images par AFM (*Tapping Mode* avec une pointe MPP11100) de a) VLPs p8.91 +ψ (en haut) et – ψ (en bas) et de b) cores p8.91 +ψ (en haut) et – ψ (en bas).
Pour chacun des cas, des zooms sur les particules ont été réalisés (à droite).

2. Propriétés morphologiques

a. Propriétés morphologiques des VLPs

Les propriétés des VLPs doivent être liées à l'étape de bourgeonnement, lorsque les protéines Gag, liées à l'ARN viral via sa partie NC, se réunissent au niveau de la membrane cytoplasmique par interaction de MA avec les lipides pour permettre la formation et le bourgeonnement d'une particule immature. En l'absence de ce génome, la formation se fait quand même en utilisant des ARN cellulaires.

Les cartes de corrélation (figure 3.25) indiquent que dans les deux cas, les VLPs présentent une faible asymétrie. Les VLPs +ψ ont des diamètres caractéristiques de (105 ± 3 nm ; 87 ± 3 nm) avec un étalement selon la première bissectrice d'environ 65 nm. Les VLPs –ψ ont comme diamètres caractéristiques (110 nm ± 3 nm , 92 ± 3 nm) avec un étalement selon la première bissectrice de 100 nm.

Les VLPs +ψ sont donc généralement plus petites et présente une dispersion beaucoup plus faible devant les VLPs –ψ.

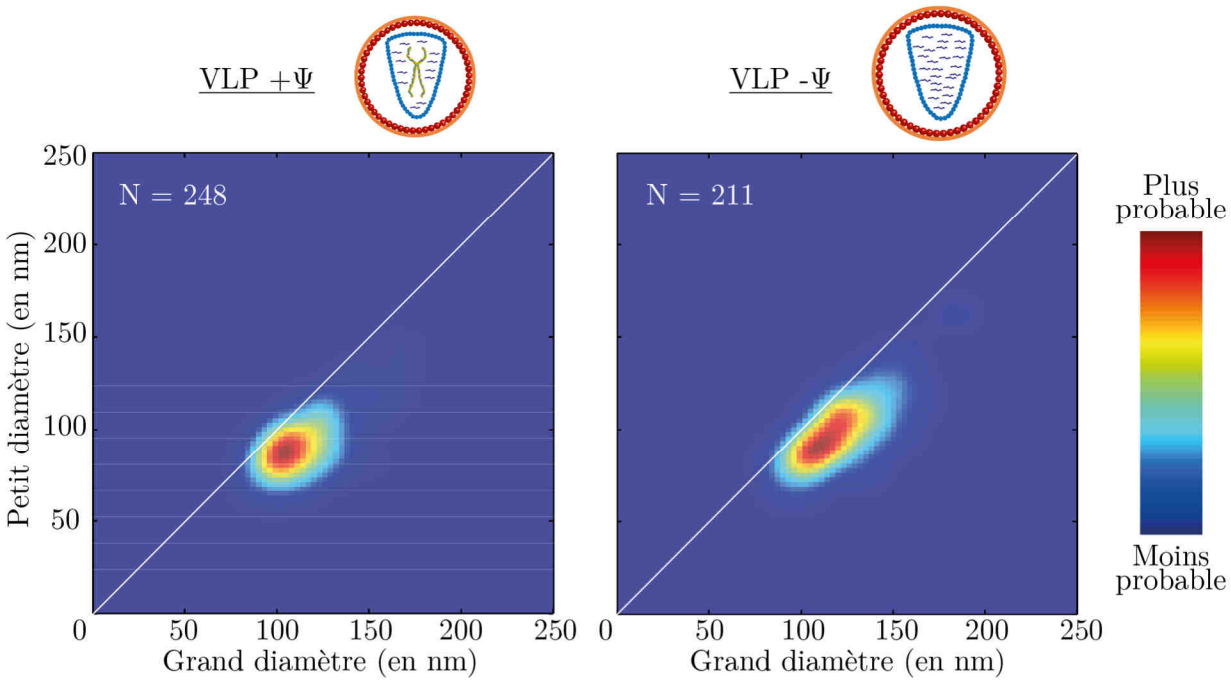


figure 3.25 - Carte de corrélation entre le grand et le petit diamètre des VLP p8.91
Pour les VLP p8.91 +ψ, la valeur la plus probable se trouve pour le couple (105 nm ± 3 nm ; 87 ± 3 nm). Pour les VLP p8.91 –ψ, la valeur la plus probable se trouve pour le couple (110 nm ± 3 nm , 92 ± 3 nm).
L'extension de la dispersion est beaucoup plus grande selon la première bissectrice pour la distribution des VLPs p8.91 –ψ par rapport aux VLPs p8.91 +ψ.

Ces conclusions se retrouvent résumées dans la figure 3.26 où les boites à moustache relatives aux diamètres équivalents des VLPs (à gauche) présentent la même tendance avec une dispersion représentée cette fois-ci par les quartiles q_1 et q_3 et une valeur médiane plus grande pour +ψ que –ψ.

Les VLPs, sur une surface de mica fonctionnalisé avec la poly-L-lysine, ont également été observées en milieu liquide (figure 3.27), avec une pointe *ScanAssyst Fluid* +, dans une solution tampon de type TNE, pour confirmer cette observation Malgré une statistique très faible, la tendance est la même, avec une valeur caractéristique du diamètre équivalent à mi-hauteur inférieur pour +ψ et une dispersion moins importante que pour –ψ (figure 3.26).

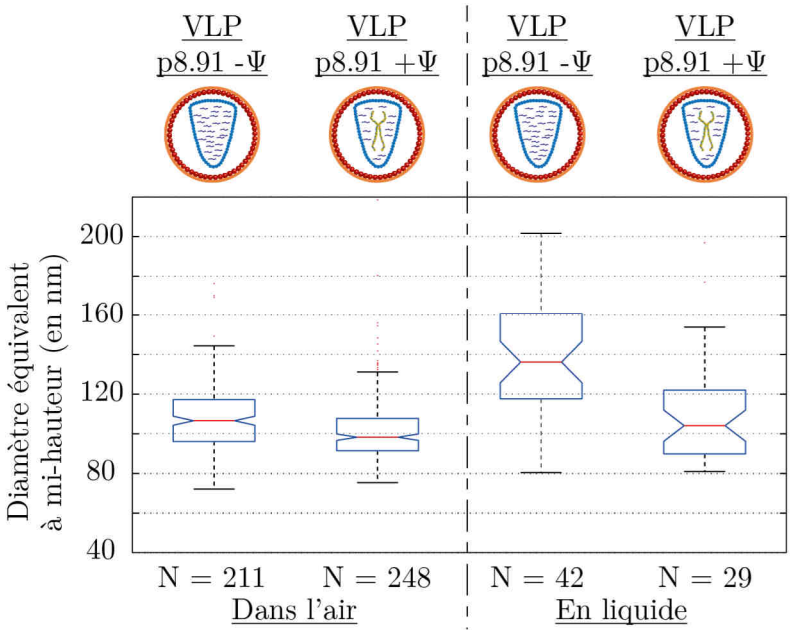


figure 3.26 – Boites à moustache du diamètre équivalent à mi-hauteur entre les différentes particules en milieu liquide TNE (à gauche) et dans l'air (à droite).
(à gauche) Dans l'air. Pour les VLP –ψ (N = 211) (à gauche). La valeur la plus probable est de 106 nm avec une dispersion caractéristique allant de 96 nm à 117 nm. Pour les VLP +ψ (N = 248) (à droite). La valeur la plus probable est de 99 nm avec une dispersion caractéristique allant de 91 nm à 107 nm.
(à droite) En liquide. Pour les VLP –ψ (N = 42), la valeur la plus probable est de 136 nm avec une dispersion caractéristique allant de 117 nm à 161 nm. Pour les VLP +ψ (N = 29). La valeur la plus probable est de 104 nm avec une dispersion caractéristique allant de 89 nm à 122 nm.

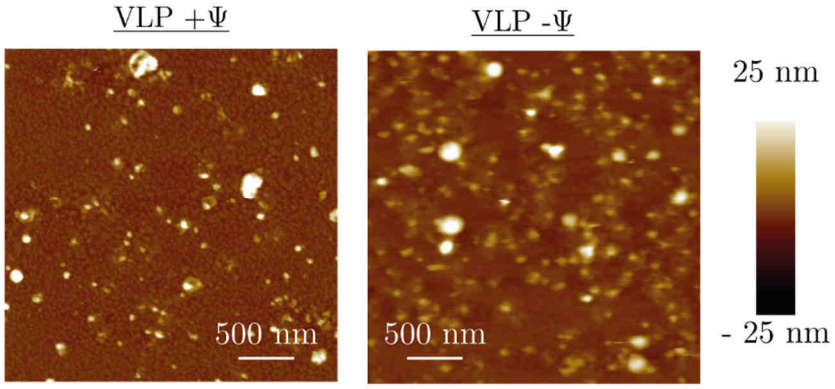


figure 3.27 - Images par AFM en liquide (TNE) des VLP p8.91
Images de VLPs p8.91 +ψ et – ψ dans la solution tampon TNE sur une surface de mica fonctionnalisé par la Poly-L-Lysine (*Peak Force Mode* avec une pointe *ScanAssyst Fluid*).

b. Propriétés morphologiques des cores

Les cores ont également été étudiés pour savoir si la présence du génome pseudo-viral pouvait avoir une influence sur leur morphologie et donc si la présence d'un ARN pseudo viral encapsidable par Gag, c'est-à-dire contenant un signal ψ pouvait jouer un rôle dans l'étape d'assemblage ou de maturation lors de la formation des VLPs.

Même si l'écart est moins marqué, les diamètres équivalents des cores présentent la même tendance que ceux des VLPs (figure 3.28). Les cores +ψ ont un diamètre caractéristique et une dispersion légèrement inférieurs à ceux des cores –ψ.

Si nous nous intéressons à l'angle, cette différence entre les cores +ψ et –ψ est beaucoup plus marquée (figure 3.29). L'imagerie des cores –ψ n'étant pas optimale, le seuil h_{seuil} a été rehaussé pour enlever au maximum le bruit. Ce réglage a été conservé sur les cores +ψ pour ne pas apporter de biais dans l'analyse. Ainsi, la répartition angulaire des deux formes, cylindre et cône, est plus large pour les cores –ψ que les cores +ψ. Cette dispersion est à relier avec celle de la largeur. La proportion de cônes (angles supérieurs à 15°) est de 40% pour les cores +ψ et de 46% pour les cores –ψ. On peut noter que dans cette purification, les cônes sont minoritaires par rapport aux cylindres. Cependant, la différence des répartitions est trop faible pour conclure un effet du signal sur la répartition. Les différences morphologiques entre les cores +ψ et –ψ peuvent se voir si l'on s'intéresse aux largeurs : alors que dans le cas des cores +ψ, la largeur des cylindres est statistiquement inférieure à celle des cônes, comme pour les cores p8.2, ce comportement n'est pas retrouvé en ce qui concerne les cores –ψ où leurs largeurs sont proportionnellement reliées à leurs longueurs. En l'absence de génome pseudo-viral, complexé avec les protéines NC, la croissance des cylindres se fait dans toutes les directions. En

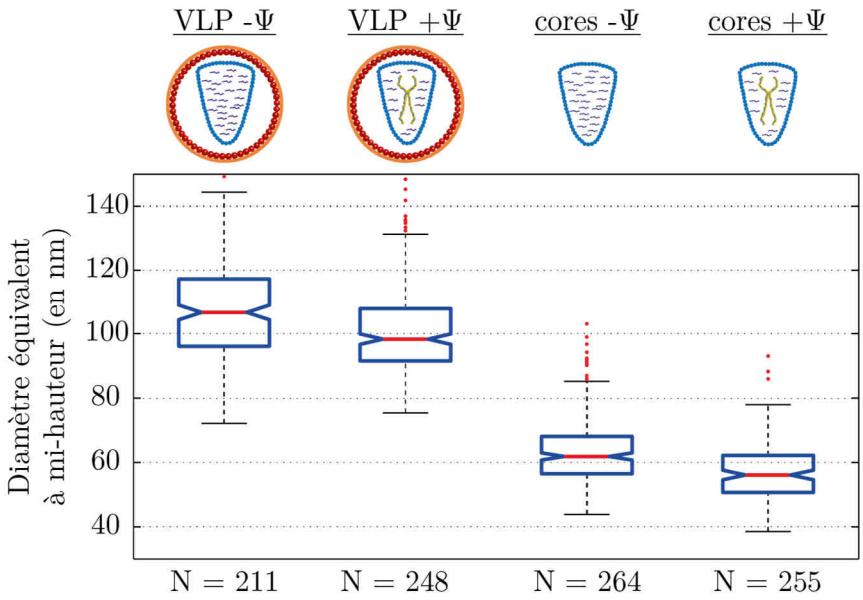


figure 3.28 - Boites à moustache du diamètre équivalent à mi-hauteur entre les différentes particules.
Pour (à gauche) les VLPs –/+ψ (N = 211/248). Même données que la figure 3.26.
Pour (à droite) les cores –ψ (N = 264), la valeur la plus probable est de 62 nm avec une dispersion caractéristique allant de 56,5 nm à 68 nm, et pour les cores –ψ (N = 255), la valeur la plus probable est de 56 nm avec une dispersion caractéristique allant de 50 nm à 62 nm.

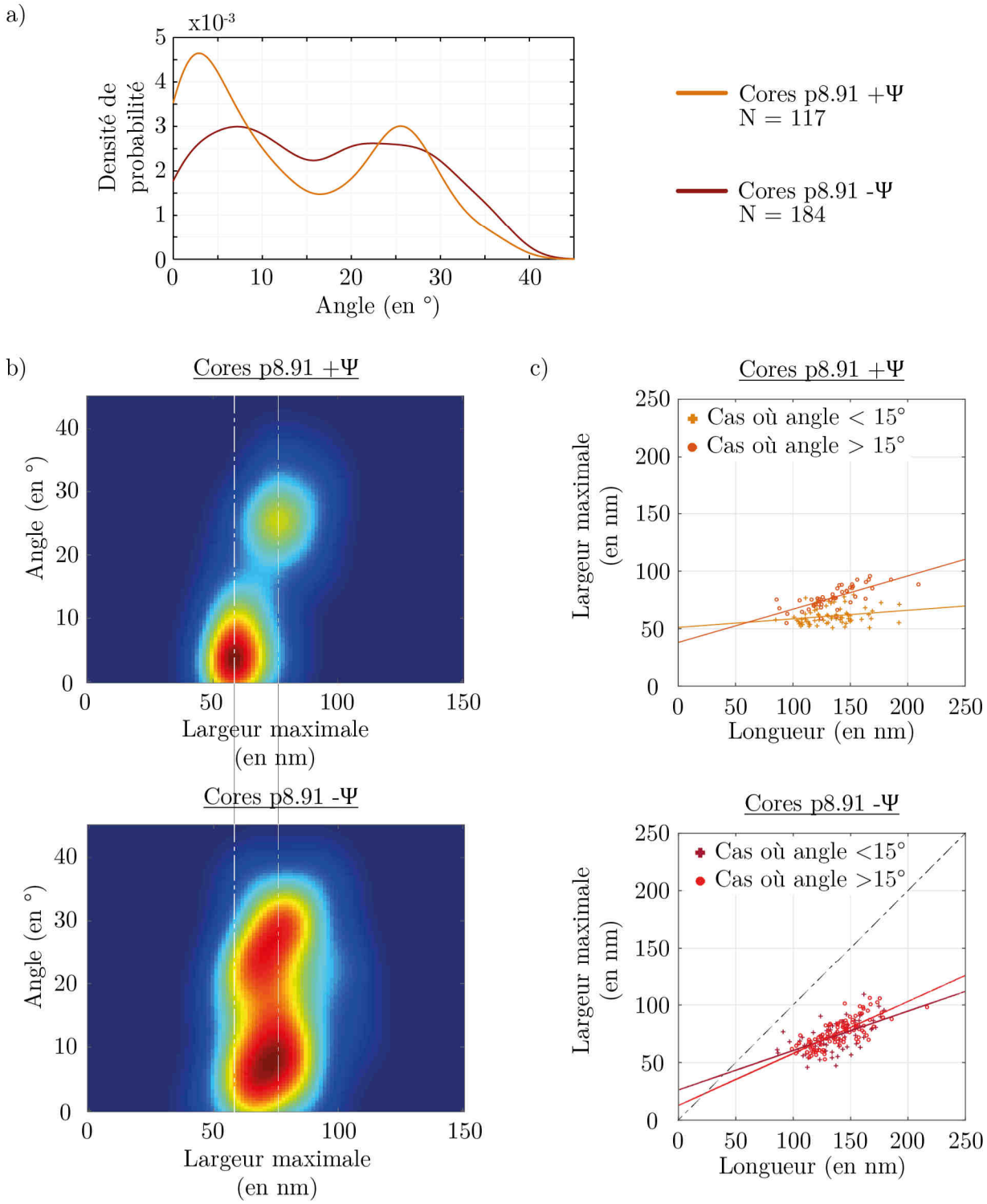


figure 3.29 - Etude des angles des cores p8.91

a) Densité de probabilité des angles des cores p8.91 +ψ (en orange - N = 117) et –ψ (en rouge - N = 184). La dispersion autour des deux angles caractéristiques des cores (respectivement 3° pour +ψ et 8° pour –ψ – relatif aux cylindres – et 25° – relatif aux cônes) est plus importante pour les cores –ψ.

b) Carte de corrélation entre la largeur maximale et l'angle des cores p8.91 +ψ (en haut - N = 117) et –ψ (en bas - N = 184).

c) Nuage de points représentant la longueur et la largeur maximale pour les deux populations coniques (angle > 15°) et cylindriques (angle < 15°) pour les cores p8.91 +ψ (en haut – N = 117 / 42 % de cônes) et –ψ (en bas – N = 184 / 46 % de cônes)

présence du complexe ARN-NC, la croissance du cylindre est contrainte : la largeur du core semble être fixée à une valeur indépendante de sa longueur.

La corrélation entre les longueurs et les largeurs maximales semblent également être différentes en présence ou en absence de l'ARN viral. Ainsi, dans le cas des cylindres, il y a une corrélation forte entre largeur et longueur dans le cas des cores –ψ avec une pente de l'ajustement linéaire non nulle, chose différente dans le cas des cores +ψ. On pourrait penser que cela vient également de l'imagerie : or la convolution va agrandir les dimensions de la même manière, que cela soit la largeur maximale ou la longueur, laissant intacte la tendance décrite. La relation entre ces grandeurs semble, par contre, suivre la même tendance, pour les cores coniques que l'ARN viral soit présent ou non.

L'ensemble des données morphologiques obtenues sur les cores et les VLPs suggèrent donc un rôle structurant de l'ARN viral ψ.

3. Modèle entropique

Un modèle entropique, développé par Martin Castelnovo dans l'équipe, permet de reproduire les observations faites par AFM sur les VLPs +ψ et –ψ. Plusieurs étapes sont nécessaires, je n'en expose que les grandes lignes. Pour plus d'informations, voir (Faivre-Moskalenko et al. 2014; Castelnovo et al. 2013).

La première étape est de décrire la formation de particules sans présence d'ARN à partir de briques élémentaires. Pour cela, on envisage un équilibre entre des briques isolées et structures formées de p briques.

Pour établir quelle particule est la plus stable, deux équations maitresses sont utilisées :

- La loi de conservation des masses : Cette équation permet de relier entre-elles les concentrations des différentes structures présentes.

$$\varphi_0 = c_1 + \sum_{p\geq 2} p c_p \tag{3.8}$$

où c_p est la concentration de structures à p protéines et φ_0 la concentration volumique initiale en briques élémentaires.

- La loi d'action des masses : Cette équation permet de décrire l'enthalpie libre du système à l'équilibre.

$$\frac{G}{kT} = c_1(ln(c_1) + F_1) + \sum_{p\geq 2} c_p\big(ln(c_p) + F_p\big) \tag{3.9}$$

où F_p est l'énergie libre du sous-système de structures à p protéines en équilibre avec le reste des structures.

La figure 3.30 montre l'évolution de l'état d'équilibre dans le cas d'une répartition bimodale imposée ($p = 21$ et $p = 42$) en fonction de la concentration volumique initiale en protéines φ_0. Les petites structures sont préférentiellement formées.

Sans une autre composante énergétique favorisant une structure plutôt qu'une autre, l'entropie privilégie l'obtention de plus de petites particules devant les grandes à concentration en briques élémentaires constante.

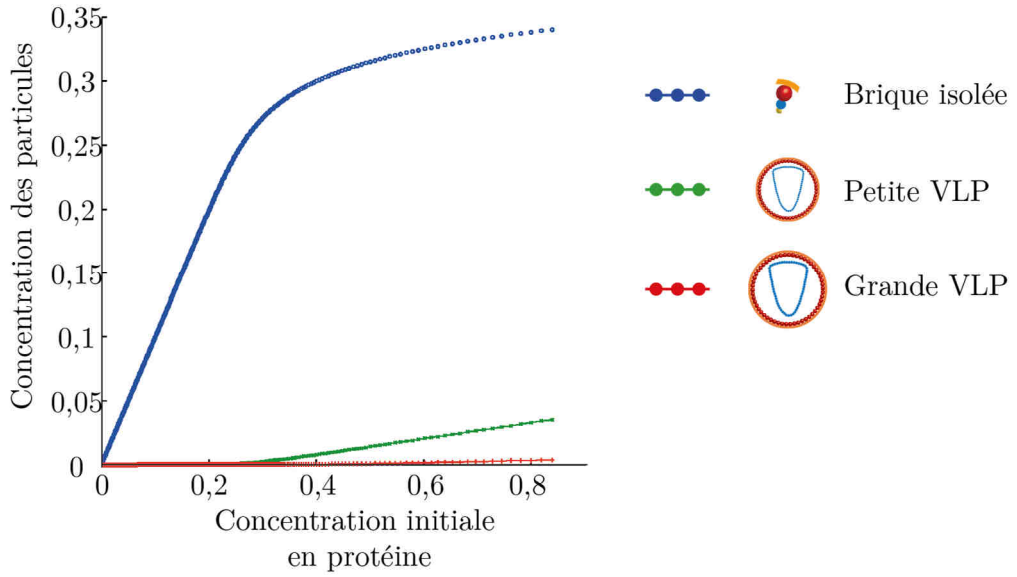


figure 3.30 - Evolution de la concentration des différentes structures accessibles en fonction de la concentration initiale en protéine φ_0. Répartition bimodale imposée.
A l'équilibre, la concentration en petite structure (p = 21) semble être plus importante que celle en grande structure (p = 42).

La deuxième étape est de rajouter la présence de brins d'ARN cellulaire, de petite taille dans le système. Il a été démontré que le nombre de protéines mis en jeu dans une structure était quasiment égale au nombre d'acides nucléiques encapsidés (Zandi & van der Schoot 2009). Dans le problème bimodal, les lois déjà citées, appliquées d'une part aux briques élémentaires et d'autre part aux brins d'ARN, sont croisées. L'entropie va de nouveau privilégier la formation de petites structures (figure 3.31).

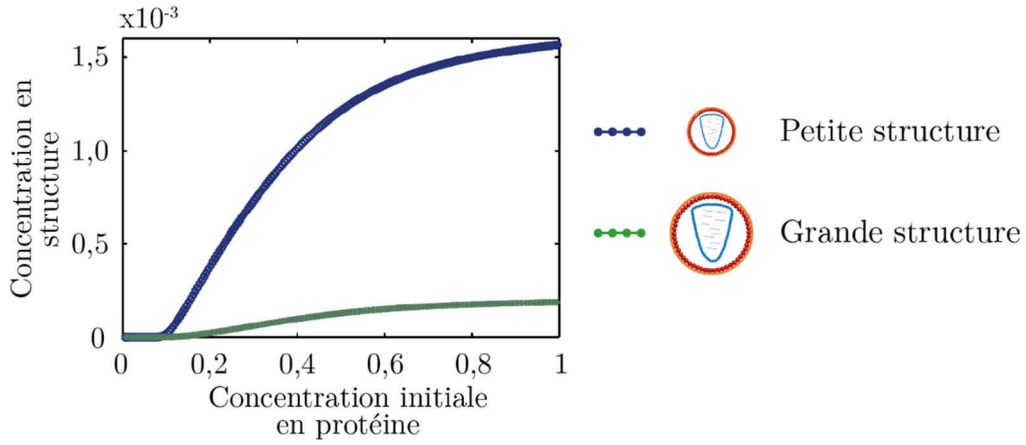


figure 3.31 - Concentration des petites particules (en bleu) et des grandes (en vert) contenant de l'ARN cellulaire en fonction de la concentration initiale en protéine.
La concentration des petites particules est, à l'équilibre et dans le cas d'une concentration en briques élémentaires fixées, supérieure à celle des grandes particules.

La troisième et dernière étape est la compétition des brins d'ARN cellulaire avec les brins d'ARN viraux, une dizaine de fois plus longs. La longueur totale d'ARN encapsidée reste proportionnelle au nombre

de protéines présentes au sein de la structure. En plus des fractions en structure, une nouvelle variable doit être prise en compte : la fraction d'ARN cellulaire (puisqu'il y a maintenant deux types d'ARN). La détermination de l'état d'équilibre oblige une minimisation de l'énergie libre par ces deux variables.

Dans un premier temps, on peut rester sur une seule taille de particule accessible et ne s'intéresser qu'à son génome : contient-elle, en plus de l'ARN cellulaire, de l'ARN viral ?

La figure 3.32.a décrit l'évolution de la fraction volumique des particules de même taille avec et sans ARN viral en fonction de la fraction volumique initiale d'ARN viral pour une fraction d'ARN cellulaire donnée. Le croisement des courbes indique la transition de prédominance entre les deux populations. En changeant la fraction d'ARN cellulaire, on peut construire un diagramme de prédominance des particules possédant ou non l'ARN viral pour des diamètres identiques (figure 3.32.b). La frontière entre les deux domaines se trouve en dessous de la première bissectrice, une augmentation de la concentration en ARN viral mène à une population de particules possédant majoritairement un ARN viral. Beaucoup plus de particules

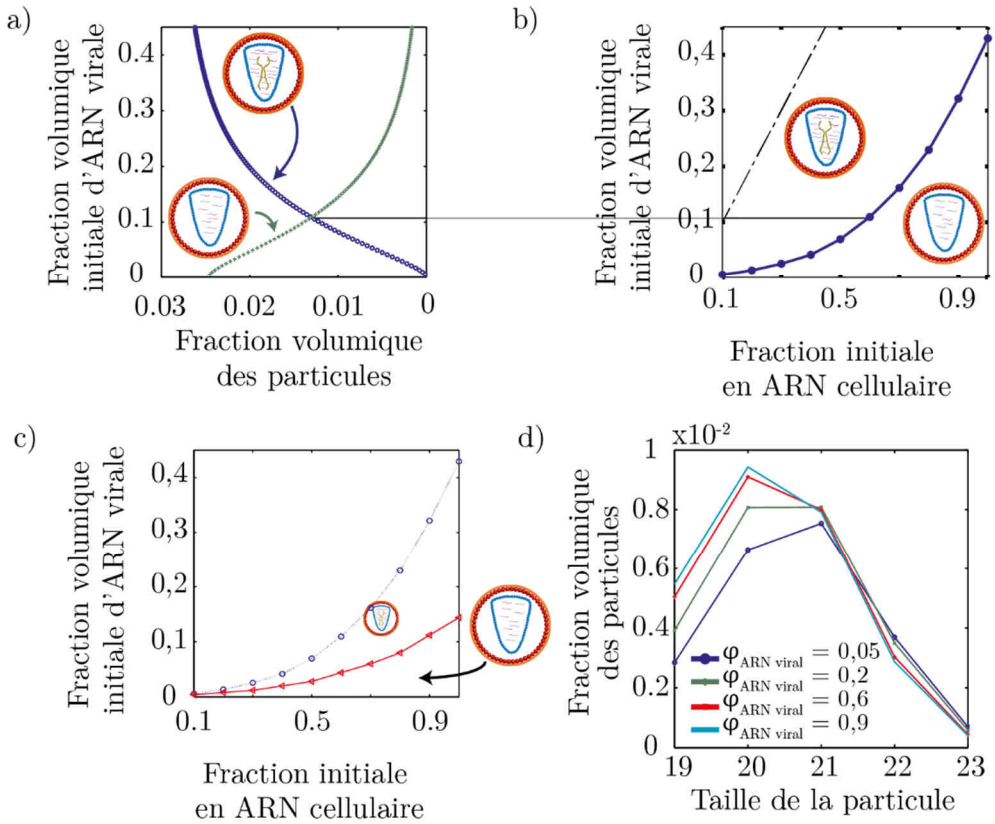


figure 3.32 – Présence du génome viral

a) Evolution de la fraction volumique des particules de même taille avec (en bleu) et sans ARN (en vert) viral en fonction de la fraction volumique initiale d'ARN viral pour une fraction d'ARN cellulaire donnée. Le croisement des courbes indique la transition de prédominance entre les deux formes.

b) Diagrammes de prédominance entre particules de même taille possédant ou non de l'ARN viral en fonction de la fraction d'ARN cellulaire et de la fraction d'ARN viral. En continu, la frontière entre les deux situations de prédominance des particules avec ARN viral (au dessus de la courbe) ou uniquement cellulaire (en dessous de la courbe). En pointillé, première bissectrice. Les particules ayant de l'ARN viral sont privilégiées.

c) Diagrammes de prédominance entre les particules de petit taille (p = 21) possédant de l'ARN viral et les particules de grande taille (p = 42) sans ARN viral en fonction de la fraction d'ARN cellulaire et de la fraction d'ARN viral. On voit un décalage de la frontière vers les faibles fractions d'ARN viral.

d) Fraction volumique des particules en fonction de leurs tailles p en présence (fraction de 0,9 – courbe bleue) et en l'absence (fraction de 0,05 – courbe cyan) d'ARN viral.

ayant un ARN viral peuvent être formées (le nombre de nucléotides, cellulaires et viraux est le même pour les particules créées), à concentration de brins d'ARN cellulaire donnée. Maintenant, en considérant deux tailles de particules, les petites ($p = 21$) possédant de l'ARN viral et les grandes ($p = 42$) ne possédant pas d'ARN viral, la frontière de prédominance est déplacée vers le bas augmentant la surface de prédominance des petites particules (figure 3.32.c).

Finalement, en présence d'ARN, les petites particules sont prédominantes devant les grandes particules. Si on considère les deux types d'ARN, la présence d'ARN viral favorise la prédominance des petites particules.

Nous n'avons précédemment considéré qu'un problème bimodal pour la variation des tailles des particules, c'est-à-dire avec deux familles de particules accessibles, les « petites » (p = 21) et les « grandes » (p = 42). En libérant la contrainte de taille (figure 3.32.d), la présence d'ARN viral favoriserait les particules de petites tailles, comme on peut le voir sur les distributions de taille de particules obtenues pour différentes concentrations en ARN viral.

Le modèle proposé montre qu'une approche entropique du problème privilégie la formation de petites particules avec ARN viral et en nombre plus important, pour une concentration de nucléotides donnée, ce qui correspond aux résultats obtenus par AFM sur le diamètre caractéristique des VLPs contenant (+ψ) ou pas (–ψ) de l'ARN viral (figure 3.26).

4. Discussion

Tout au long de cette partie, nous avons porté notre attention sur le rôle du signal ψ et son effet sur la morphologie des particules. Que cela soit pour les VLPs et les cores, la présence de l'ARN viral apparait comme un acteur dans le contrôle de la morphologie des particules, qui avait déjà été suggéré par les travaux de biochimie sur le rétrovirus MLV (*Murine Leukemia Virus)* réalisés par l'équipe d'A. Rein (Muriaux et al. 2001). Les travaux de biophysique que nous avons réalisés aident à mieux comprendre ce contrôle.

Les VLPs produites étant matures, les résultats sur ces objets aident à comprendre le contrôle du signal ψ sur la polydispersité et la taille des particules à l'issue des deux étapes, bourgeonnement et maturation. En exploitant la grande résolution de l'imagerie par AFM et en utilisant les programmes d'analyse morphologique, nous avons pu montrer que la présence du génome pseudo-viral dans la VLP lors de sa formation réduisait ses dimensions et les fluctuations associées, c'est-à-dire la polydispersité. Notre modèle s'appuyant sur l'entropie du système permet d'ailleurs d'expliquer cette observation expérimentale. Les particules, en présence de brins d'ARN formerait des particules plus petites et moins polydisperses que celles en présence de petits ARNs cellulaires.

L'étude s'est ensuite poursuivie par l'effet du signal ψ sur la morphologie, forme et dimension, des cores, à l'issu de l'étape de maturation. La mise en place de nouveaux moyens d'analyse de la morphologie des cores, comme celui de la mesure des angles, nous donne de nouvelles informations sur les cores et leurs formations lors de l'étape de maturation. En effet, nous avons vu que l'absence de génome –ψ modifie la relation entre largeur et longueur des cores de forme cylindrique mais pas des cônes. Donc l'interaction entre le complexe ARN-NC jouerait un rôle important sur la morphologie des cylindres (et donc lors de leurs

formations) mais peu déterminant (ou du moins pas accessible avec nos expériences et nos analyses) pour les cores coniques, leurs largeurs étant fixés par leurs longueurs (plus un cône est long, plus sa largeur l'est). Par contre, la répartition des formes quasiment identique entre les cores +ψ et −ψ laisse imaginer que le génome n'a pas de rôle prépondérant sur la forme privilégiée par le core lors de son assemblage. Cette interprétation peut apparaitre contradictoire avec les travaux publiés récemment par l'équipe de G. J. Jensen (Woodward et al. 2015) qui proposent comme hypothèse que la formation des cylindres est favorisée par la présence du génome pseudo-viral non pas à l'intérieur du core, mais ailleurs dans la VLP. Ce n'est pas ce que nous observons quantitativement. Cependant, l'AFM ne permet pas de savoir s'il y a dans les cylindres de l'ARN pseudo-viral ou non.

Les expériences et interprétations proposées dans ce paragraphe ont pour finalité de mieux comprendre des étapes de la phase tardive, le bourgeonnement, quand le virus sort de la cellule infectée, et la maturation, rendant le virus capable d'infecter une nouvelle cellule. Dans le paragraphe suivant, nous nous intéressons à la phase précoce et plus précisément au lien entre l'étape de libération du génome dans la cellule et la rétrotranscription.

IV. Initiation de la retrotranscription

La rétrotranscription est une étape nécessaire à l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. La rétrotranscriptase produit, à partir deux brins d'ARN monocaténaire de polarité positive et en passant par une structure ARN/ADN, un ADN proviral double brin qui va s'intégrer dans le génome de la cellule hôte (voir Chap. 1.III.3). L'ADN double brin présente une longueur de persistance beaucoup plus grande que l'ARN (Smith et al. 1996). Le volume de giration de l'ADN est 200 fois plus important que celui de la capside alors qu'il n'est que d'environ 3 fois pour celui de l'ARN. De plus, si la capside n'est pas détruite lors de la rétrotranscription, le volume occupé par l'ADN double brin est d'environ 30 % du core ce qui est très important devant celui occupé par l'ARN sans prendre en compte les protéines NC (voir Chap. 1.III.3). On s'attend donc, si la rétrotranscription a lieu à l'intérieur du core, à ce que la pression interne augmente lors de cette étape jusqu'à déstabiliser la structure du core pour l'ouvrir.

Pour étudier cette étape, nous avons proposé un protocole d'activation de la rétrotranscriptase par une élévation de la température à 37°C, sur deux types de VLPs et cores, la souche sauvage (p8.2) et un de ses mutants (Q151N) (voir Chap. 2.II.4 et Chap. 3.II.3). Pour rappel, la cinétique de rétrotranscription est nettement inférieure pour les mutants Q151N face à celle de la souche sauvage. Puis, nous avons observé par AFM, les particules, déstabilisées ou non, déposées sur une surface de mica fonctionnalisée avec la poly-L-lysine.

1. Imagerie AFM

Nous avons réalisé trois temps de chauffage : 15 minutes, 30 minutes et 2 heures en l'absence de nucléotides dNTPs ajoutées[3]. Quelques images obtenues sont représentées dans la figure 3.33.

Le nombre de cores sur la surface, formes cylindriques et coniques confondues indiquées par des cercles orange sur la figure, semble diminuer en fonction du temps d'incubation. Cette évolution peut s'expliquer par la déstabilisation des cores induite par la rétrotranscription. D'ailleurs, après certaines étapes de chauffages, on peut observer des formes particulières de faibles hauteurs associées aux cores sur la surface de mica (figure 3.34). Nous pouvons les classer en trois grandes familles :

- Les *chaines* : Ces structures sont observées principalement sur les dépôts réalisés avec Q151N pendant 15 minutes. On peut voir une pelote de petites boules à la suite l'une de l'autre et dont la hauteur est supérieure à 5 nm (figure 3.34.a).
- Les *soleils* : Ces structures particulières avec une partie centrale plus ou moins haute et des filaments, ne dépassant pas 1 nm de hauteur, sont présents dès 15 minutes de chauffage, pour les cores p8.2 et Q151N (figure 3.34.b).
- Les *filaments seuls* : On peut observer dans des zones isolées, des filaments seuls, sans présence de cores à proximité (figure 3.34.c). La hauteur du filament de droite est de 1,5 nm.

[3] Des dNTPs cellulaires sont présents dans l'échantillon obtenu après purification. Cette dernière étape du protocole n'est pas assez sélective pour les enlever.

Les différentes structures ont été observées dans différentes situations.

Pour avoir un contrôle permettant de connaitre l'apparence d'ADN double brin et d'ARN simple brin, nous avons réalisé les dépôts des filaments purifiées et avons réalisé leurs images par AFM (figure 3.34.d). La hauteur associée à l'ADN double brin est de 0,7 nm pour un diamètre apparent autour de 15 nm tandis que

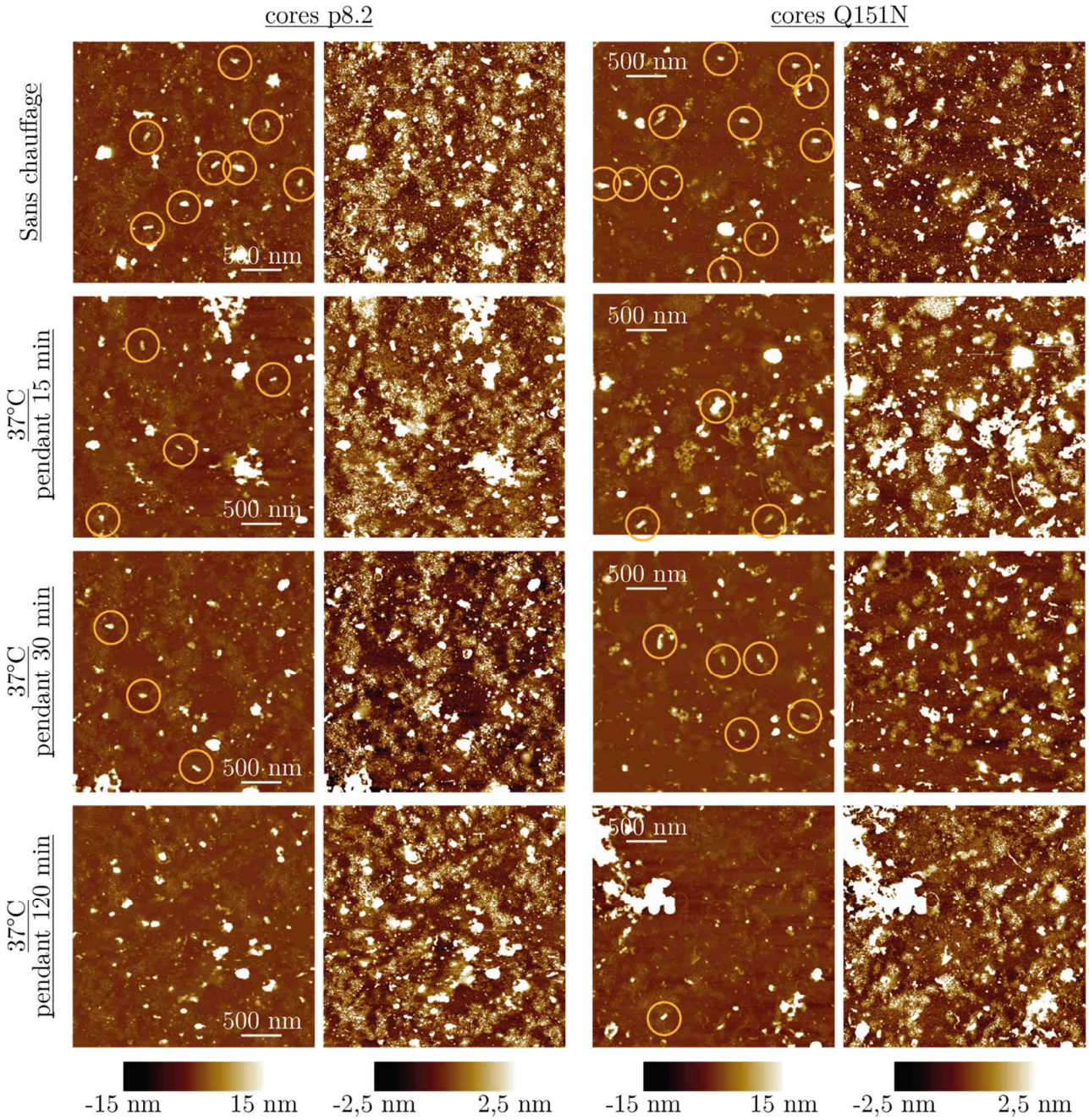


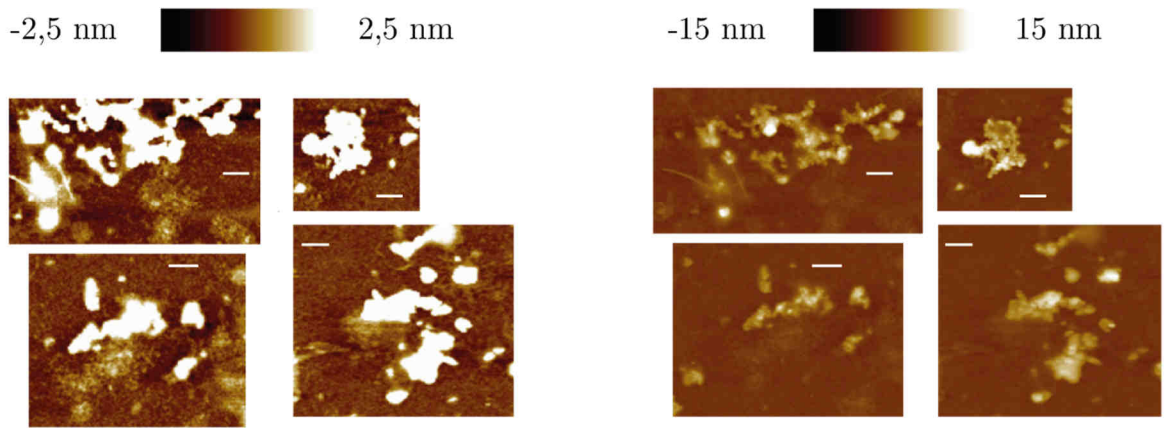
figure 3.33 - Images par AFM de dépôt de cores p8.2 (à gauche) et Q151N (à droite) pour différents temps de déstabilisation.

La première ligne sont les dépôt sans déstabilisation. Les suivantes sont obtenues après dépôt d'échantillons chauffés à 37°C pendant, dans l'ordre, 15 minutes, 30 minutes et 2 heures.

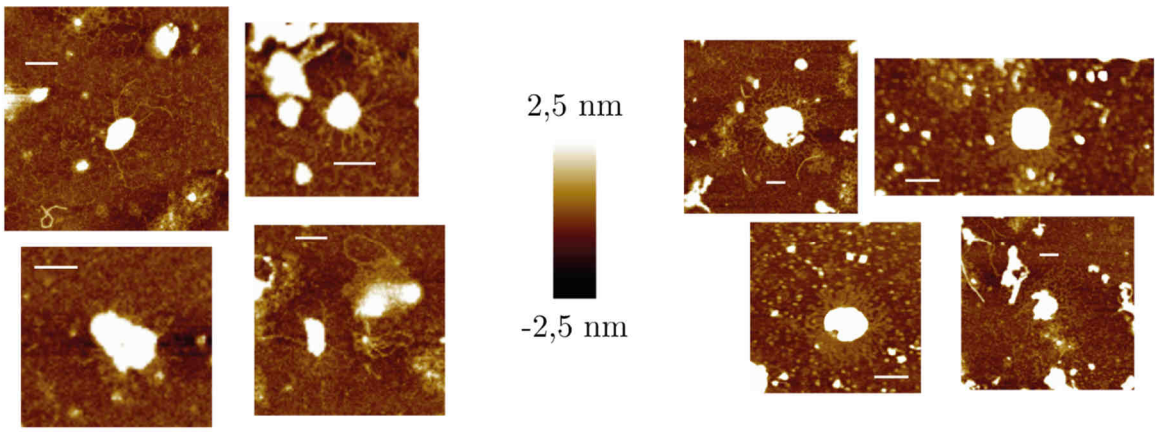
Les images sont obtenues par AFM (*PeakForce Mode*, avec un levier *ScanAssyst HR*).

Deux echélles de hauteur sont choisies pour visualiser soit les cores intacts (de -15 nm à 15 nm) soit les éventuels filaments d'acides nucléiques échapés des cores et proches de la surface (de -2,5 nm à 2,5 nm).

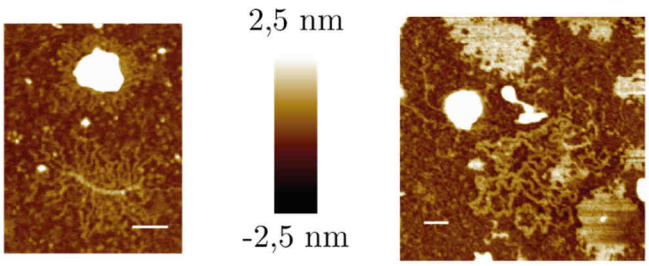
a) *Chaines*



b) *Soleils*



c) *Filaments seuls*



d)

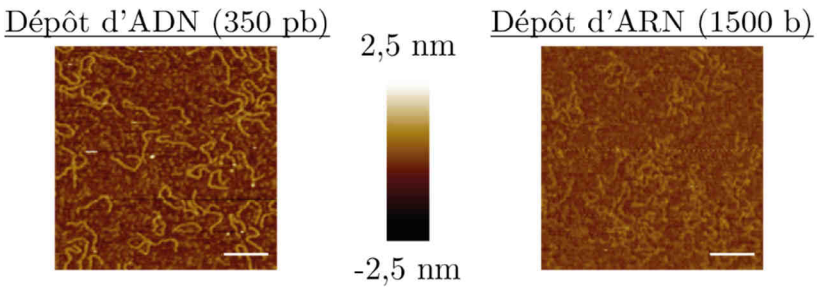


figure 3.34 - Zoologie des formes particulières après chauffage des cores p8.2 (à gauche) et Q151N (à droite) à 37°C pendant différents temps.
a) Chaines. Les images sont présentées selon deux échelles : entre -15 et 15 nm (à gauche) mettant en évidence la présence de « boules » et entre -2,5 et 2,5 nm (à droite) mettant en évidence un tapis filamendreux.
b) Soleils. Particules entourées de filaments. Deux familles de soleil sont observées : des filaments présentant une grande longueur de persistance (à gauche) et des filaments avec une petite longueur de persistance (à droite).
c) Filaments seuls. Des filaments sous différentes formes (grandes longueurs de persistance (à gauche) et petites (à droite))
d) Exemple de dépôts d'ADN (350 paires de bases) et d'ARN (1500 bases) sur mica + poly-L-lysine.
La barre blanche représente 100 nm ce qui correspond à la longueur de persistance de l'ADN double brin à 2D.

pour l'ARN simple brin, la hauteur est autour de 0,5 nm pour un diamètre apparent de 10 nm. Les brins d'ADN présentent une rigidité apparente supérieure à celle des brins d'ARN. La longueur de persistance pour l'ADN (un peu moins d'une centaine de nanomètre à 2 dimensions) est en effet dix à vingt fois supérieure que pour l'ARN simple brin (Smith et al. 1996).

Les structures en *chaine* (figure 3.34.a) ont été observées sur les échantillons chauffés du mutant Q151N. La hauteur étant supérieure à l'ADN et à l'ARN nus, nous pensons qu'il s'agit de brins d'ARN complexés avec les protéines NC et les débris du core associé. La cinétique de la rétrotranscription étant fortement ralentie, on peut supposer la présence d'ARN dans la plupart des cores, les particules fragilisées par le chauffage libèrent le génome pseudo-viral complexé qui va se déposer sur la surface.

Les structures en *soleil* sont observées pour les cores p8.2 et les cores Q151N chauffés (figure 3.34.b). Nous pensons que les filaments sont des brins d'ADN (ou d'ARN/ADN) qui semblent nus, non complexés avec la NC, et sortent des cores détruits par la pression interne. La différence de longueur de persistance observée pourrait se justifier par la nature double brin de l'ADN (figure 3.34.b à gauche) ou simple brin de l'ARN non couvert de NC (figure 3.34.b à droite). Dès 15 minutes de chauffage, il serait donc possible d'observer les produits de la rétrotranscription. Ceci pourrait apparaitre contradictoire avec le fait qu'*in vivo*, on observe que le temps moyen de la rétrotranscription est environ 45 minutes après l'entrée du core dans la cellule infectée. Mais on peut imaginer que nos expériences *in vitro* se font sur des cores qui se trouvent dans un tampon physiologique en l'absence de toute machinerie cellulaire pouvant ralentir cette étape.

Finalement, les *filaments seuls* sont rarement observés et uniquement lorsque le chauffage dure longtemps, c'est-à-dire 120 minutes dans notre expérience. Deux types ont été observés. Le premier d'une hauteur inférieure au nanomètre, composé d'un squelette avec des filaments peu courbés de part et d'autre. Cette forme particulière pourrait être de l'ARN (le squelette) en train d'être rétrotranscrit en ADN (filaments latéraux). Le second filament par contre, se rapprocherait plus de l'ARN par sa plus grande flexibilité, peut-être complexé aux protéines NC. Ces filaments pourraient être issus de la déstabilisation des cores, avec rétrotranscription et sans rétrotranscription.

2. Analyse morphologique des cores non déstabilisés

Sur la figure 3.33, on observe des cores « intacts ». Des images zoomées sur ces particules ont été répertoriées dans la figure 3.35. Leurs morphologies sont alors analysées : nous nous sommes intéressés à l'évolution des populations des deux familles de cores, les cônes et les cylindres. Pour cela, nous utilisons le

script permettant de mesurer l'angle au sommet du core, la séparation entre les deux familles se fait à 12°, en référence à la densité de probabilité des angles à température ambiante (figure 3.19). On résume les résultats dans l'histogramme de la figure 3.36.

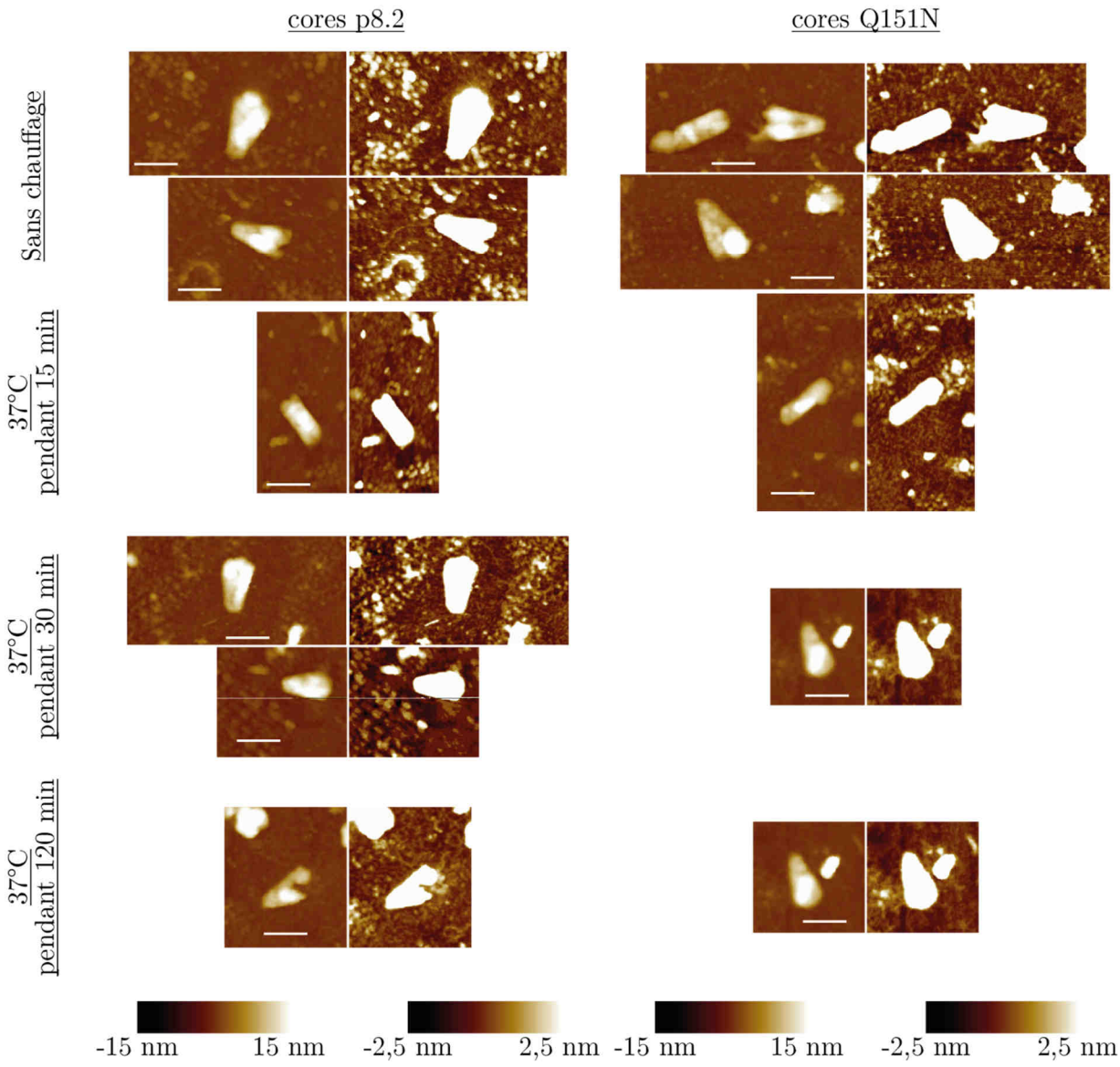


figure 3.35 - Zooms sur des cores ayant été chauffés à 37°C pendant différents temps mais qui semblent intacts.
Quelque soit la durée du chauffage, certaines particules restent plus ou moins intactes.
La barre blanche représente 100 nm.

Cette répartition ne semble pas évoluer en fonction de la durée du chauffage, autour de 60% de cores coniques pour p8.2 et 65% pour Q151N.

Initialement, nous pensions pouvoir voir une différence d'évolution, avec une prédominance des structures de types cylindriques au fur et à mesure du chauffage que nous attendons plus stables. En effet, si on s'appuie sur les travaux récents de l'équipe de G.J. Jensen, le génome se trouverait majoritairement à l'extérieur du core cylindrique (Woodward et al. 2015) et donc ne perturberait la structure de ce dernier lors de la

rétrotranscription. Lors du chauffage, les structures cylindriques deviendraient donc prédominantes face aux structures coniques avec un retard du phénomène pour les cores Q151N devant les cores p8.2 or nous n'observons pas cette tendance.

Des expériences de déstabilisation ont été réalisées en amenant la concentration en acides nucléiques (dNTPs) initialement faible à 25 µM et également la concentration en magnésium de 0mM à 5mM, nécessaire à la réalisation de la rétrotranscription. Le résultat est le même que précédemment, avec l'observation de particules déstabilisées et des structures exposées dans les figures 3.34 et 3.35. Ce résultat suggère que la concentration en dNTPs n'est pas limitante pour l'initiation de la rétrotranscription dans nos conditions expérimentales.

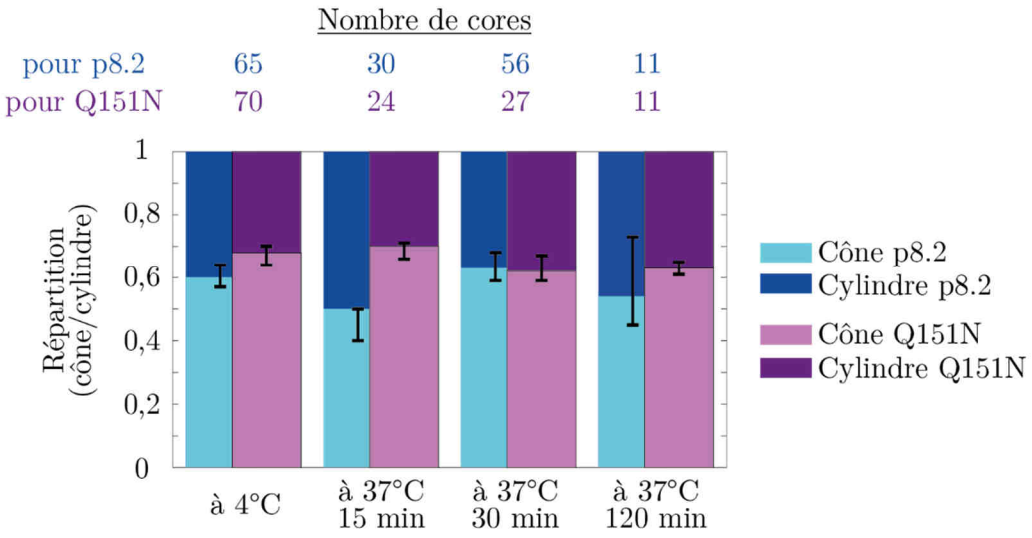
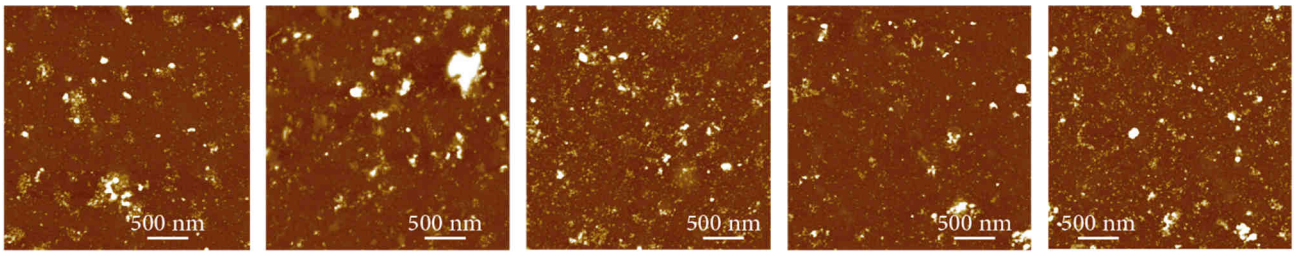


figure 3.36 - Evolution de la répartition cores coniques / cores cylindriques pour p8.2 et Q151N en fonction du temps de chauffage.
(en haut) Le tableau représente le nombre de particules sélectionnées via le script d'analyse pour les différentes expériences réalisées.
La séparation entre cône et cylindre se fait pour un angle de 12°. Les barres d'erreur correspondent à une séparation à 10° et 14°.
La répartition n'est pas grandement modifiée en fonction de la durée de chauffage.

Il faut cependant critiquer notre expérience pour plusieurs raisons. Premièrement, la statistique reste extrêmement limitée par le faible nombre de cores intacts présents sur la surface. Deuxièmement, il faut considérer la déstabilisation apportée par la rétrotranscription mais aussi la déstabilisation apportée par l'agitation thermique qui perturbe la structure protéique même. Pour caractériser la contribution du chauffage sur le core seul, il faut bloquer l'action de la rétrotranscriptase. C'est pourquoi, nous avons réalisé la même expérience sur les cores p8.2 en produisant les particules et en les chauffant en présence de drogues inhibant totalement la protéine RT, un mélange de névirapine et d'AZT. Cependant peu de particules ont été produites comme le présente la figure 3.37.

Ces expériences ne sont que préliminaires. Une statistique supérieure pourrait conforter ces observations. De plus une analyse plus poussées, par une approche biochimique par exemple permettrait de comprendre la zoologie des objets observés sur la surface des dépôts de cores chauffés et la nature précise des filaments observés sur les différentes structures (soleils, filaments isolés, chaines, …).

D'autres expériences par AFM pourraient également être réalisées. Une étude mécanique serait intéressante. En effet, l'hypothèse de l'augmentation de la pression interne du core s'accompagnerait, avant la décapsidation, d'une augmentation de la constante de raideur du core (soit par l'étude directe des cores à condition d'arriver à obtenir des cores non effondrés, soit par la méthode indirecte de mesure de la raideur du core (à l'intérieur de la VLP - Chap. 3.I.3). A 4°C, les raideurs de cores p8.2 et de Q151N sont semblables. Cependant, après chauffage, on s'attendrait à ce que la constante de raideur des cores Q151N évolue peu à cause de la faible cinétique de la rétrotranscription, ce qui ne serait pas le cas pour p8.2. Ainsi, on observerait une évolution différente de la constante de raideur des cores en fonction du temps de chauffage.



à 4°C | à 37°C pendant 15 min | à 37°C pendant 30 min | à 37°C pendant 60 min | à 37°C pendant 120 min

figure 3.37 - Evolution des dépôts de cores p8.2 produits et chauffés en présence de drogues bloquant la rétrotranscription.
Sauf à 4°C, où l'on peut observer un core cylindrique au centre de l'image, aucun core intact n'est observé à 37°C.

Conclusion

Les différentes expériences menées se sont réparties sur mes trois années de thèse. Plus d'une cinquantaine de purifications ont été réalisée. La plus grande difficulté a été d'obtenir des objets en nombre suffisant, de bonnes qualités avec peu de débris. Plus la purification est efficace lors de la centrifugation (voir protocole Chap. 2.II.1), plus le nombre de débris est faible mais moins le nombre d'objets est important. Il est d'ailleurs important de noter que cette étape de purification sélectionne les cores les plus solides, puisqu'ils passent à travers un coussin contenant un détergent (ce qui n'est pas le cas pour les VLPs). Devant ces difficultés, nous avons dû adapter certains programmes d'analyse d'image voire en créer, pour extraire des données obtenues par AFM pouvant éclairer le lien entre propriétés physiques du virus VIH-1 et son cycle viral complexe.

Nous avons essayé à travers ces travaux de recherche d'appliquer des méthodes physiques, grâce à l'AFM, pour comprendre différentes étapes du cycle viral.

Utilisant différents variants, nous avons ainsi étudié les propriétés physiques des cores ou des particules virales. La comparaison entre les VLPs et les cores s'appuie sur le virus mature et la caractérisation morphologique du core réalisée pour la première fois par AFM et en mettant en évidence la présence de cores cylindriques et de cores coniques. Cette partie a permis de relier des propriétés morphologiques et mécaniques avec des observations biologiques sur l'étape de maturation du VIH-1.

Une partie du travail à consister à comparer différents variants pour étudier la phase tardive du cycle viral, l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation.

La comparaison entre les VLPs des variants p8.2 et p8.91 s'intéresse à l'effet des protéines accessoires du VIH-1 sur la morphologie des particules matures. D'après nos analyses, ces protéines ne semblent pas apporter de différence morphologique sur les VLPs matures ni sur les cores.

Des analyses comparées de la morphologie des VLPs et des cores p8.91 produits avec la co-transfection ou non du plasmide pψ contenant le signal viral d'encapsidation combiné à un modèle entropique d'assemblage viral ont clarifié en partie le rôle du génome sur la taille et la polydispersité des particules.

La comparaison des VLPs pGag et des VLPs p8.91 illustre les différences morphologiques et mécaniques entre les particules matures et immatures. La présence de la couche interne de Gag, avec le défaut dans sa structure MA, rendrait les particules immatures plus polydisperses que les particules matures. Sa réponse mécanique serait également non linéaire du fait de sa structure particulière. Cette dernière observation doit être complétée par l'application de modèles plus complexes pouvant mettre en évidence ce comportement lors d'une déformation.

Finalement, les expériences sur les VLPs et les cores p8.2 et du mutant Q151N (caractérisation morphologique, mécanique et déstabilisation par chauffage des cores) offrent des résultats préliminaires sur les étapes de décapsidation. Certains aspects de ces expériences doivent être améliorés pour compléter cette étude. Tout d'abord, obtenir des échantillons propres permettant de pouvoir déterminer avec plus de précision la nature des filaments et des objets sur la surface. Un contrôle de la rétrotranscription par l'utilisation de drogues pourrait alors être proposé pour comparer les propriétés morphologiques mais aussi mécaniques des objets déstabilisés par le chauffage.

Chapitre 4 Propriétés physiques des vecteurs AAV

La thérapie génique utilisant les vecteurs AAV s'appuie sur les capacités de ces derniers à pénétrer de façon efficace dans des cellules cibles et à véhiculer son matériel génétique dans le noyau. Comprendre les paramètres physiques qui contrôlent les différentes étapes nécessaires au vecteur pour délivrer son génome et faire le lien avec les propriétés biologiques permettraient d'optimiser le transfert de gênes.

Ce chapitre s'intéresse aux propriétés physiques, morphologiques et mécaniques de la capside des vecteurs AAV dont la production a été décrite dans le chapitre Chap. 2.II.1. Le principal instrument de cette étude est le microscope à force atomique (AFM). Nous avons été amenés à réaliser des expériences de diffusion de la lumière et de biochimie pour compléter les observations et les résultats obtenus par AFM.

Comme nous l'avons vu, la capside du *dependovirus* existe sous la forme de différents sérotypes. Dans la première partie, nous nous intéresserons au sérotype AAV8. Le vecteur utilisé contient un ADN simple brin, de 3 700 bases. Nous avons d'abord caractérisé la capside, morphologiquement et mécaniquement à température ambiante (environ 23°C). Nous avons ensuite réalisé une mesure de sa stabilité en utilisant la température comme paramètre de mesure. Cette caractérisation préliminaire permet d'introduire la stratégie expérimentale, d'observation et d'analyse que nous avons exploitée dans la suite de notre étude.

Les sérotypes présentent des propriétés biologiques distinctes. Par exemple, le sérotype AAV8 infecte préférentiellement les cellules du foie alors que le sérotype AAV9 est un outil efficace pour le transfert de gènes dans le muscle cardiaque et dans le système nerveux central et périphérique (Wang et al. 2005; Sands 2011; Dayton et al. 2012). La question reste donc la même que pour le VIH-1 et ses variants : si les sérotypes d'AAV possèdent des propriétés biologiques distinctes, présentent-ils des propriétés physiques différentes et si oui,

peuvent-elles justifier certaines observations comme leurs efficacités relatives à véhiculer un transgène dans une cellule cible. Nous comparerons les sérotypes AAV8 et AAV9 contenant le même génome simple brin à l'intérieur (de 3700 bases), en ce qui concerne leurs propriétés morphologiques et mécaniques mais également leurs stabilités devant une augmentation de la température.

Au cours du cycle viral de l'AAV, les capsides sont acheminées dans le cytoplasme au sein de vésicules endosomales. Cette phase du trajet intracellulaire s'accompagne d'un changement du pH, qui décroit progressivement partant d'environ 7 au niveau de la membrane cytoplasmique jusqu'à atteindre une valeur autour de 5, lorsque les endosomes se situent à proximité de la membrane nucléaire. Dans une troisième partie, pour étudier l'influence du pH sur la stabilité des capsides d'AAV, nous nous sommes intéressés à la comparaison de la capside AAV8 (contenant toujours le génome simple brin de 3700 bases) dans deux microenvironnements différents, un à pH neutre, l'autre à pH acide, autour de 5.

Les biologistes peuvent facilement modifier la nature ou la longueur du génome incorporé dans le vecteur. Dans la quatrième partie, nous proposons une étude préliminaire de l'effet de la longueur du génome sur la stabilité thermique des vecteurs, en utilisant des capsides, AAV8 et AAV9 contenant des ADNs simple-brin ou double-brin.

Finalement, dans la cinquième et dernière partie, nous présentons des expériences dans le but de quantifier l'effet de la pression interne exercée par l'ADN sur la paroi de la capside en s'intéressant au mécanisme d'éjection de l'ADN double brin d'une capside AAV2 et en faisant varier la pression osmotique à l'extérieur de la capside.

Cette partie de ma thèse n'aurait pu se faire sans l'important travail de Lara Gardette, stagiaire de L3 (en 2013), et Anny Fis, stagiaire de M2 (en 2014) et sans un séjour de quatre mois dans l'équipe du Professeur Alex Evilevitch à l'université Carnegie Mellon de Pittsburgh (Pennsylvanie, Etats Unis).

I. Caractérisation des propriétés physiques des vecteurs AAV8 simple brin.

AAV8 est l'un des sérotypes les plus utilisés en thérapie génique. Ses cellules cibles se situent principalement dans les muscles et le foie (Millet et al. 2013). Lors de l'infection, la capside est amenée à traverser un milieu fortement hétérogène, du cytoplasme au noyau, puis à se déstabiliser pour libérer le génome (Chap. 1.IV.3).

Caractériser physiquement les capsides d'AAV8 grâce aux performances de l'AFM permet d'obtenir des informations sur ses propriétés mécaniques et sa stabilité face à différentes contraintes physiques, ici la température. Les protocoles mis en place ont été décrits dans le chapitre Chap. 2.

Les capsides étudiées sont donc du sérotype 8 de diamètre environ 20 nm et contiennent un génome d'ADN simple brin de 3700 bases ce qui représente une longueur de l'ordre de 1250 nm (si on se réfère au pas du simple brin estimé à 0,34 nm ce qui constitue une très grosse approximation car dépendant fortement de la séquence génomique), remplissant environ 18% du volume libre d'une capside de rayon interne 10,8 nm (Chap. 1.IV.3).

1. Imagerie dans l'air

Les capsides d'AAV8 sont déposées sur une surface de mica selon le protocole décrit précédemment (voir Chap. 2.II.3.c). Elles sont ensuite observées grâce à l'AFM en mode *PeakForce* (figure 4.1.a) ou en mode *Tapping* (figure 4.1.b). On compte un nombre important de particules sur la surface. La hauteur des particules, sur l'image apparait être d'environ 15 nm et présentent une forme isotrope dans le plan dont le diamètre est d'une quarantaine de nanomètres. La rugosité de la surface n'excède pas le nanomètre.

Plusieurs remarques peuvent alors être faites pour la suite de l'étude :

- Le nombre élevé de particules justifie une étude statistique des propriétés morphologiques des capsides.
- Cependant, le rayon (Nam et al. 2007) observé par cryo-microscopie électronique des particules AAV est du même ordre de grandeur que celui de la pointe dans le cas des leviers *ScanAssyst HR* (environ 10 nm). La convolution par la pointe sera donc une source importante d'erreur de l'étude

Paramètres des filtres	AAV
Seuil bruit $h_{seuilbruit}$ (en nm)	5
Hauteur min $h_{seuilobjet}$ (en nm)	13
Aire min A_{min} (en nm^2)	1000
Aire max A_{max} (en nm^2)	100 000
Nombre fractal min F_{min}	0,75
Nombre fractal max F_{max}	1,2
Circularité min C_{min}	0,1
Circularité max C_{max}	1

Tableau 4.1 - Valeurs typique des seuils de filtrage pour l'analyse morphologique des capsides AAV.

et une variation du diamètre pourra être due soit à une variation du diamètre réel de la particule soit à celui de la pointe. Bien que la mesure du diamètre à mi-hauteur minimise cet effet de convolution, nous éviterons de nous attarder sur de faibles différences de diamètres lors de la comparaison de deux types de particules.

- Nous avons utilisé préférentiellement les leviers *DLCS* dont l'extrémité de 2 nm. Ce faible rayon permet de minimiser la convolution (figure 4.1.b). Cependant, on peut voir un motif de répétition triangulaire sur l'image proposée. Dans ce cas plusieurs pointes du levier sont en interaction avec la surface. Cependant, une différence de hauteur des objets mesurés avec la pointe principale et les

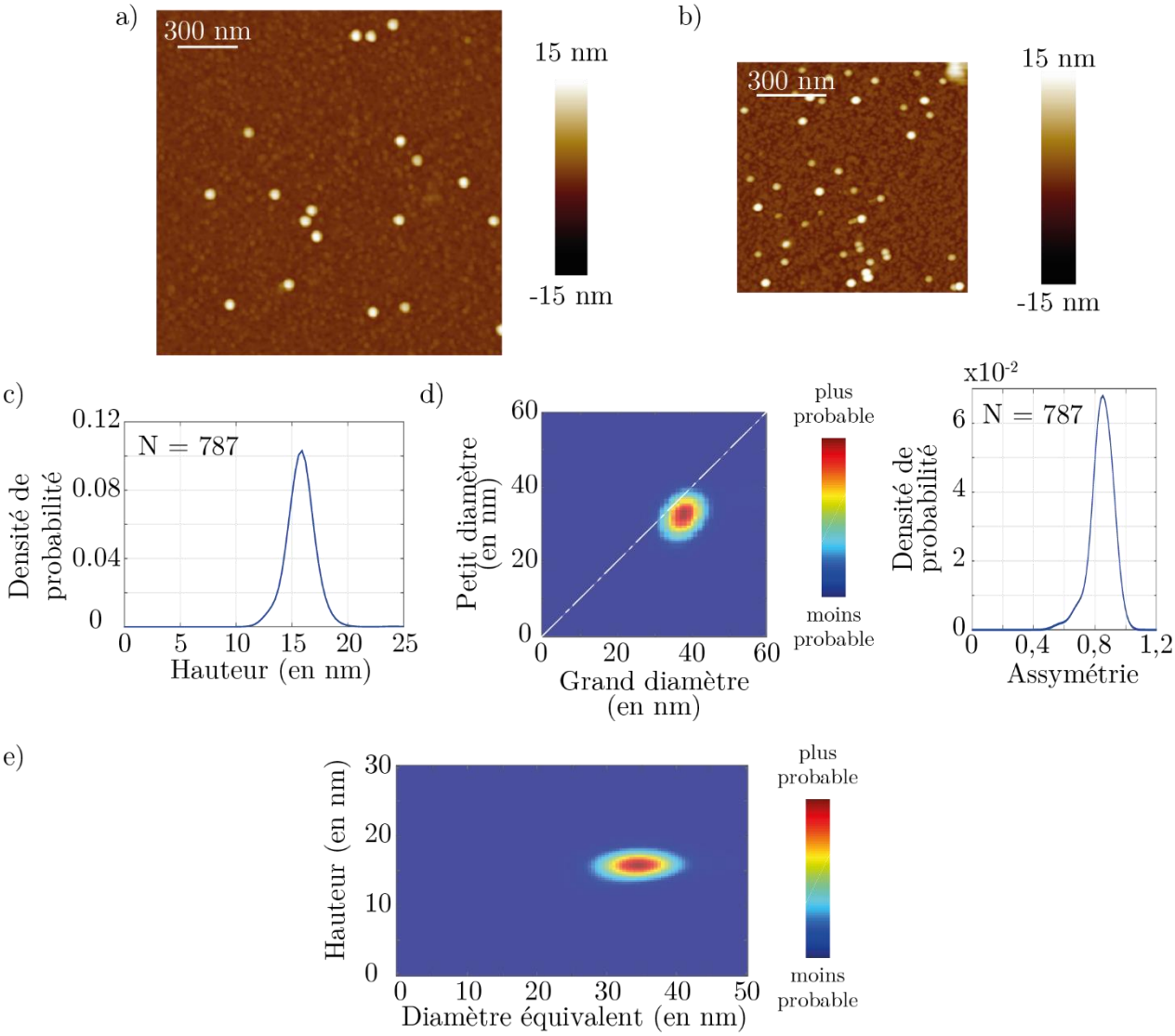


figure 4.1 - Morphologie des capsides AAV8 sur mica
a) Image AFM en mode Peak Force avec un levier ScanAssyst HR.
b) Image AFM en mode Tapping avec un levier DLCS.
c) Densité de probabilité de la hauteur des capsides AAV8. La hauteur moyenne est de 15,78 ± 0,05 nm avec un écart type de 1,25 nm (N = 787).
d) Carte de corrélation du petit et du grand diamètre de AAV8 (à gauche). Le couple moyen est (35,3 ± 0,2 nm ; 32,1 ± 0,1 nm). Densité de probabilité de l'assymétrie (à droite). L'assymétrie est d'environ de 0,85 avec un écart-type de 0,01.
e) Carte de correlation entre le diamètre équivalent à mi-hauteur et la hauteur des capsides de AAV8 (N = 787).

pointes secondaires (voir Chap. 2.III.1.a et figure 2.16) est clairement visible. Par un filtre de hauteur adapté, le programme de sélection ne garde que les particules originales (tableau (4.1)).

La figure 4.1.c) représente la densité de probabilité de la hauteur obtenue par l'étude de 787 capsides déposées sur la surface. Sa forme se rapproche d'une distribution de type gaussienne. Nous pouvons donc utiliser les grandeurs statistiques, comme la moyenne, avec les incertitudes associées (dans le cas de la moyenne, il s'agit de l'erreur standard $\sigma / \sqrt{N}$ où σest la déviation standard et N le nombre de particules) pour décrire les propriétés morphologiques des particules. La hauteur caractéristique est de 15,9 ± 1 nm tandis que sa moyenne, grandeur statistique, est de 15,79 ± 0,05. La mesure de la moyenne est donc moins incertaine que la grandeur caractéristique. La déviation standard est de 1,25 nm. La hauteur est éloignée de la valeur attendue, c'est à dire du diamètre réel des capsides : ceci est dû au fait que l'AFM donne une carte d'interaction et non une topographie de la surface. De plus, les interactions existant entre la capside et la surface, nécessaires pour son adhésion, peuvent aplatir légèrement la structure du virus. Il est à noter que cette différence de hauteur peut sensiblement varier entre deux dépôts des mêmes capsides car si la hauteur n'est pas sensible à la convolution, elle reflète les interactions entre la capside et la pointe. Selon les paramètres environnementaux (humidité de l'air, température ambiante…), elle peut varier de quelques dixièmes de nanomètres, c'est pourquoi les comparaisons se font généralement sur des images obtenues à deux instants proches, dans une atmosphère comparable.

Les diamètres principaux horizontaux de chacune des particules, grâce à l'ajustement elliptique, sont représentés dans la carte de corrélation entre le petit et le grand diamètre de la figure 4.1.c). On observe une tâche relativement circulaire centrée sur la valeur maximum de la répartition (38 ± 2 nm ; 32 ± 2 nm). La position de tâche, très proche, de la première bissectrice peut se justifier par la forme icosaédrique de la capside. Le décalage prend lui sa source sur le fait que le programme détermine automatiquement un petit et grand diamètre ce qui occasionne un repliement de la distribution par rapport à la première bissectrice imposant une asymétrie artificielle de la capside dans le plan. Cette symétrie peut être retrouvée par la lecture de la densité de probabilité du rapport entre le petit et le grand diamètre (ou ce que nous avons appelé l'asymétrie) des capsides AAV8 (figure 4.1.d) : la moyenne est de 0,85 pour une dispersion de 0,1, ce qui est plus proche de 1 que celle des cores (conique et cylindrique) du VIH-1 autour de 0,57 avec une large dispersion de 0,3 : les capsides AAV sont donc plus symétriques.

La carte de la figure 4.1.e) représente la corrélation entre hauteur et diamètre des particules. Dans le cas des capsides AAV8, on a une unique tâche dont la largeur est plus petite selon la hauteur que selon le diamètre, ce qui peut se justifier par l'effet de la convolution par la pointe intervenant sur le diamètre et non sur la hauteur.

Le grand nombre de particules permet ainsi une étude statistique des propriétés morphologiques des capsides AAV8. Les comparaisons entre deux sérotypes ou entre deux microenvironnements seront donc possibles.

2. Imagerie en liquide

Observer les capsides AAV en liquide nous permet de pouvoir contrôler facilement l'effet de l'environnement. En ajoutant des ions monovalents comme Na^+ et Cl^-, on diminue les interactions électrostatiques entre la pointe et la surface ou le virus. En ajoutant des ions divalents comme Mg^{2+}, on module

à la fois l'interaction entre la surface et la capside et la compaction de l'ADN par création de ponts ioniques entre différentes zones du brin.

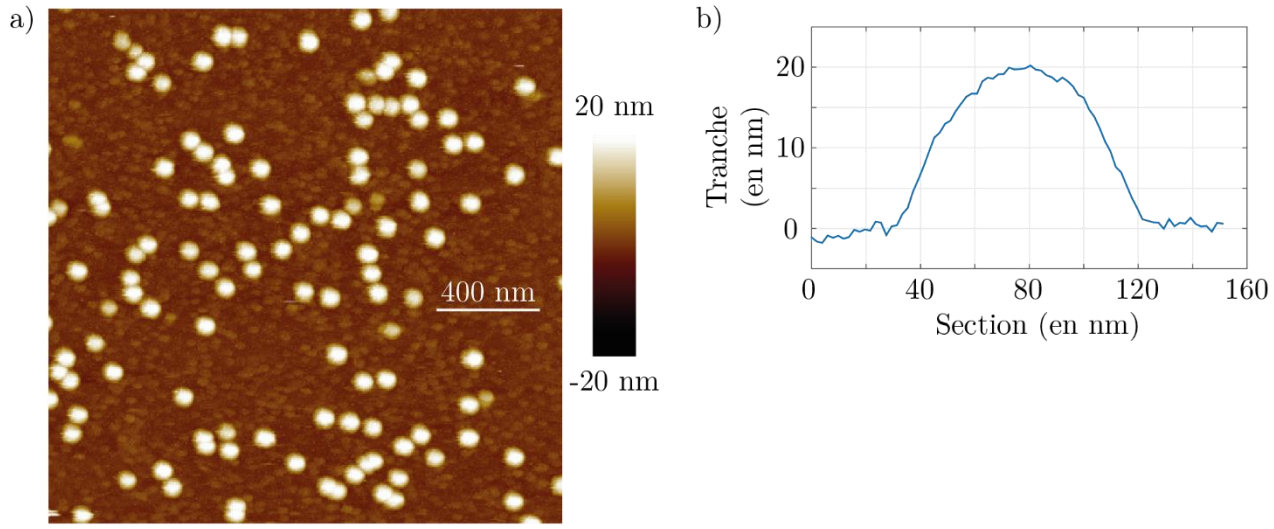


figure 4.2 - Imagerie en liquide (solution tampon TM – [Mg^{2+}] = 5 mM) de capsides AAV8.
a) Image par AFM d'un dépôt de AAV8 sur une surface de mica en liquide TM (en *mode Peak Force,* avec une pointe Scan Assyst Fluid +).
b) Evolution de la hauteur le long d'une section sur une capside.

La présence d'un nombre important de capsides sur la surface nous a permis de réaliser des images en liquide des capsides AAV8 dans différents tampons. Quelques images de capsides AAV8 dans la solution TM, dont la concentration en ions magnésium Mg^{2+} est de 5 mM, sont présentées dans la figure 4.2. Le diamètre à mi-hauteur apparent est de l'ordre de 60 nm, ce qui nous empêche de conclure sur le diamètre réel de la capside. La pointe utilisée en liquide ayant un rayon plus important à celle utilisée dans l'air, la convolution est plus grande. D'autre part la hauteur semble être supérieure à celle dans l'air.

Nous nous sommes donc intéressés à l'évolution de la hauteur mesurée selon différents tampons (TE, TNE et TE avec des ions Mg^{2+}). Les résultats des expériences sont résumés sur la figure 4.3. En considérant les courbes associées aux solutions TE et TNE, la hauteur des particules AAV8 ne semble pas être sensible à la présence d'ions monovalents : la hauteur moyenne est de 20,71 ± 0,03 nm pour le TNE et de 23,0 ± 0,2 nm pour le TE avec une grande dispersion.

Na^+ et Cl^- sont souvent utilisés pour leur capacité à écranter les interactions électrostatiques entre deux parois et ce sur une distance dite de Debye λ_D :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_D k_B T}{[Na^+] + [Cl^-]}} \tag{4.1}$$

où ε_D est la permittivité électrique du milieu, T la température et k_B la constante de Boltzman.

Dans notre cas, nous avons une longueur de Debye d'environ 1 nm (si on suppose que seuls Na^+ et Cl^- ont un rôle), ce qui est de l'ordre de grandeur de la distance d'interaction pointe/capside. L'écrantage n'est donc pas total. On s'attend cependant à voir une légère différence entre la hauteur mesurée dans le TE et celle

dans le TNE ce qui est le cas (figure 4.3). Les interactions électrostatiques semblent donc avoir un petit effet sur la hauteur effective mesurée par l'AFM.

Les autres courbes (figure 4.3) correspondent à la densité de probabilité de la hauteur des capsides imagées dans une solution TE contenant différentes concentrations d'ions Mg^{2+}. La hauteur moyenne diminue en fonction de la concentration, pour $[Mg^{2+}] = 0$ mM $h_{moy} = 23{,}0 \pm 0{,}2$ nm, pour $[Mg^{2+}] = 5$ mM $h_{moy} = 22{,}0 \pm 0{,}3$ nm, pour $[Mg^{2+}] = 10$ mM $h_{moy} = 21{,}1 \pm 0{,}3$ nm, et finalement pour $[Mg^{2+}] = 20$ mM, $h_{moy} = 19{,}2 \pm 0{,}3$ nm. En opposition, la dispersion de hauteur augmente, passant de 1,65 nm à 4,45 nm.

La longueur de Debye associée à une concentration de 20 mM d'ions divalents Mg^{2+} est de 0.04 nm environ et est de 0.08 nm à 5 mM. En considérant que la pointe dans le *mode Peak Force* est très proche de la capside (moins que le nanomètre), les effets de charge sont écrantés.

On remarque donc que plus la concentration en ions divalents sur la surface est importante, plus l'interaction entre la surface est importante, plus les particules sont aplaties. Nous avons donc utilisé par la suite une concentration de Mg^{2+} inférieure à 5 mM.

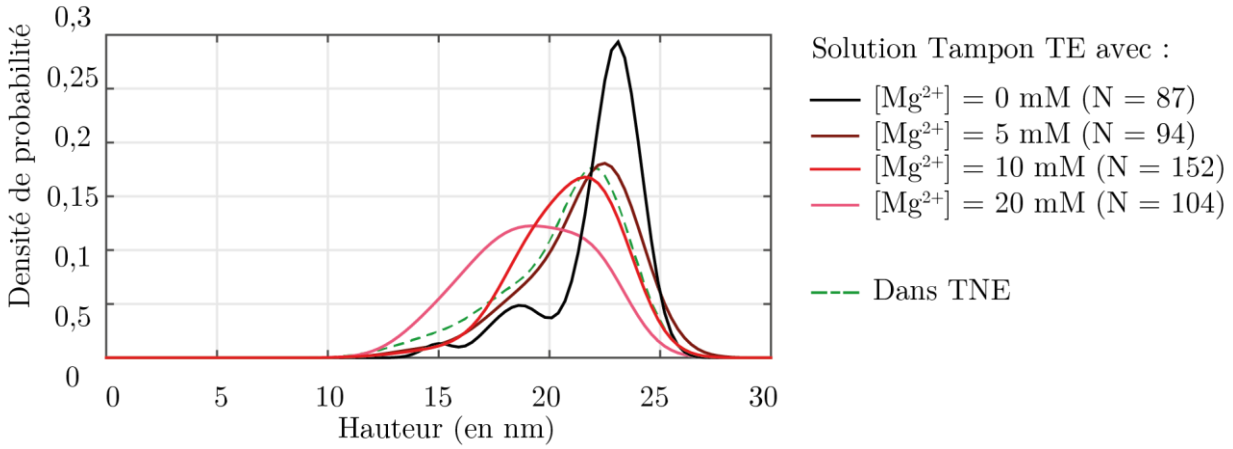


figure 4.3 - Densité de probabilité de la hauteur d'AAV8 en fonction de divers tampons.
Les images utilisées ont été réalisés dans des solutions dont la base est le TE ([Tris] = 10 mM, [EDTA] = 1 mM, pH = 7,4) avec différentes concentrations d'ions Mg^{2+} (en dégradé de rouge) - la concentration indiquée est celle des ions magnésiums libres, c'est-à-dire en tenant compte de la chélation par l'EDTA – et en présence d'ions monovalents Na^+ et Cl^- (100 mM). Elles ont été obtenues en *mode Peak Force* avec un levier SNL.

3. Expériences d'indentation

Les propriétés mécaniques des capsides AAV8 ont été sondées grâce aux expériences de nano-indentation. Pour cela, nous avons utilisé la même stratégie que celle déjà exposée dans le chapitre précédent pour les VLPs du VIH-1 (voir Chap. 3.I.3).

Nous avons utilisé comme solution tampon du TNE, immergent la surface de mica où avait été préalablement déposées les capsides AAV8. Nous avons ensuite utilisé des *ScanAssyst Fluid +*, ayant une raideur importante de $k_{lev} \simeq 1$ N/m. Nous avons appliqué la même stratégie d'analyse des courbes pour finalement obtenir la distribution de la raideur des virus (en appliquant la formule (2.23)) représentée par la boite à moustache sur la figure 4.4. La valeur moyenne est de 0,125 N/m pour une médiane à 0,12 N/m et une dispersion de 0,05 N/m.

Ce protocole expérimental et cette méthode d'analyses des courbes seront ensuite réutilisés pour comparer les différences mécaniques entre deux sérotypes ou dans des milieux différents.

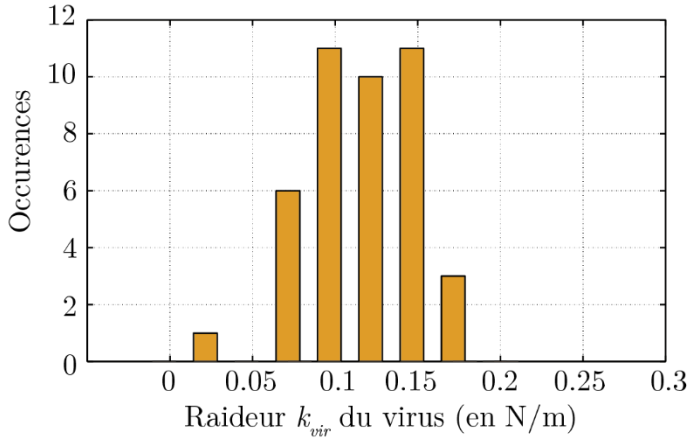


figure 4.4 - Raideur k_{vir} des capsides AAV8 dans une solution TNE.
Dans le cas d'un levier de grande raideur (1 N/m), la raideur moyenne est de 0,125 N/m (N = 51 courbes).

4. Mesure de la stabilité des capsides

Les trois précédents paragraphes exposent les expériences menées sur les capsides AAV8 à l'équilibre avec leurs environnements directs. Mais lors du cycle viral d'AAV, la capside traverse un grand nombre d'environnements différents menant à la libération du génome dans le noyau. Nous avons voulu mimer simplement et artificiellement cette étape de déstabilisation. Pour cela, nous avons utilisé la température comme moteur d'éjection forçant ainsi les capsides hors de l'équilibre thermodynamique avec le milieu environnant. Le protocole est exposé dans le deuxième chapitre (Chap. 2.II.4).

La figure 4.5 est une galerie d'images AFM dans l'air de chaque dépôt réalisées après le chauffage pendant 15 minutes à différentes températures de capsides AAV8 dans une solution tampon PBS+. Pour chacune des situations, on peut caractériser la nature des objets sur la surface.

Pour les faibles températures, 4°C et 37°C, les capsides sont intactes (à gauche) et la surface, mise en valeur par les images avec une échelle basse (à droite), semble relativement propre. Pour des températures légèrement supérieures, entre 50°C et 60°C, les capsides semblent toujours intactes mais il apparait sur la surface des filaments. Pour 65°C, ce phénomène s'amplifie. A partir de 70°C, les capsides semblent avoir une hauteur plus basse comme l'indique l'échelle de couleur et les filaments sont de plus en plus nombreux sur la surface. A partir de 75°C, il ne reste aucune capside isolée et majoritairement des filaments sur la surface de mica.

Tout d'abord, établissons les propriétés morphologiques des capsides AAV8 sur la surface. Nous avons utilisé pour chacune des conditions faisant apparaitre des capsides isolées, notre programme de sélection et de caractérisation des objets en abaissant toutefois le seuil de hauteur de détection des capsides à 7 nm. Les résultats sont résumés dans la figure 4.6.

Bien que le nombre d'objets ait tendance à diminuer avec l'augmentation de la température, il reste à chaque fois important ce qui renforce l'étude statistique. A température ambiante, le couple diamètre-hauteur caractéristique se situe autour de (32 ± 2 nm ; 17,5 ± 1 nm) avec une déviation standard de la hauteur de 0,6 nm. Ce couple n'est pas modifié jusqu'à 60°C. A partir de 65°C, on peut voir une légère augmentation de la dispersion, passant à 1,2 nm, avec une tâche se déformant vers des hauteurs inférieures autour de 15 nm. Le couple caractéristique reste cependant quasiment inchangé (30 ± 2 nm ; 16,5 ± 1 nm). La dispersion en hauteur est très importante, la tâche complète s'étalant sur une dizaine de nanomètre. Pour un chauffage à 70°C, alors

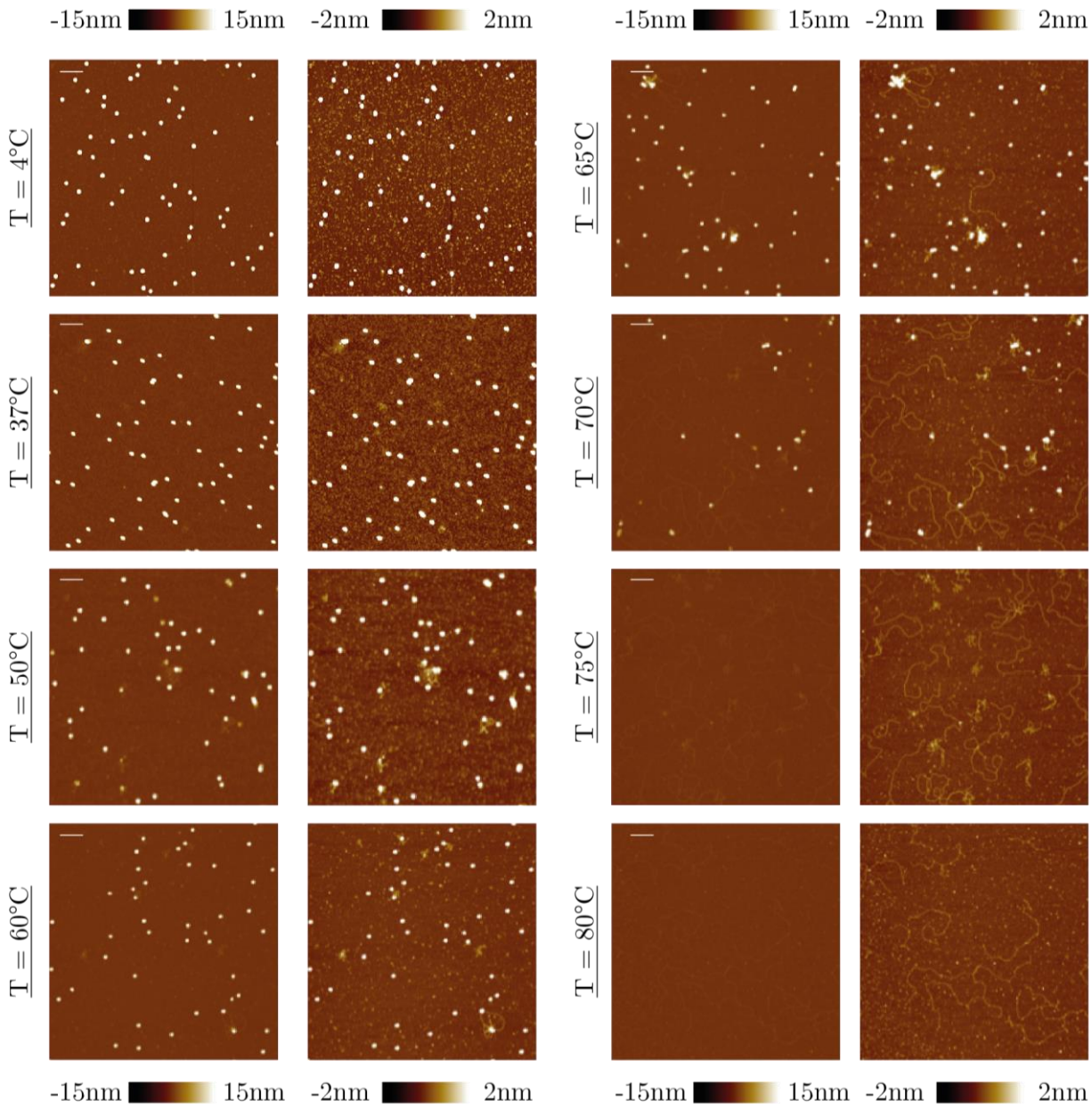


figure 4.5 - Image de dépôts de capsides AAV8 après chauffage 15 min en fonction de la température (sur une surface de mica).
En mode *Peak Force*, avec un levier Scan Assyst HR.
Pour chaque température, (à gauche) image à basse échelle pour voir la présence ou non d'ADN simple brin (à droite) image à grande échelle pour voir la morphologie des capsides.
Sur chaque image, la barre blanche représente 200nm.

que la valeur caractéristique du diamètre reste à 29 nm ± 2 nm, la hauteur caractéristique chute à 12 nm ± 1 nm. En parallèle, la déviation standard, elle, est multipliée par 3, par rapport à 65°, pour atteindre environ 3,6 nm.

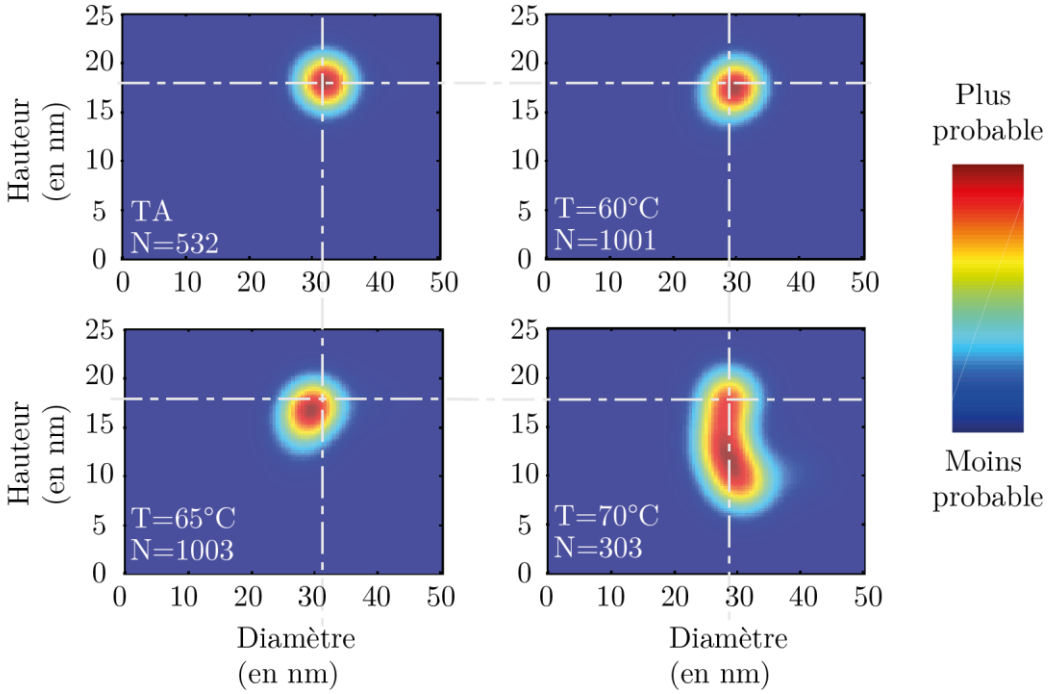


figure 4.6 – Carte de corrélation entre le diamètre équivalent à mi-hauteur et la hauteur des capsides AAV8 après chauffage à différentes températures.
TA représente la température ambiante, c'est-à-dire 23°C.
Les tâches de corrélation ne semblent pas être modifiées pour des températures allant jusqu'à 65°C. A 70°C, deux populations de capsides apparaissent : une ayant une hauteur de 17 nm et l'autre de 12 nm avec le même diamètre autour de 29 nm.

On peut finalement remarquer que les températures où les hauteurs diminuent correspondent à celles où il y a le plus d'ADN sur la surface, à l'extérieur des capsides.

Les filaments d'ADN sur la surface se trouvent sous deux formes particulières (figure 4.7.a) : décompactés sur la surface (il est facile de déterminer leur longueur dans ce cas à condition qu'ils ne se croisent pas) ou compactés. Entre 60 et 75°C, la proportion de la première forme est de 80% environ. Ces configurations se rapprochent des observations faites sur de l'ADN simple brin déposé sur une surface *HOPG* dans le travail de l'équipe de G. Dietler (Adamcik et al. 2006). A 80°C, la deuxième forme a complètement disparu ne laissant sur la surface que des brins étendus. Une mesure « à la main » de la longueur de ces filaments donne environ 1200 ± 200 nm. Il faut remarquer la différence de longueur entre celle estimée (1250 nm) et celle mesurée sur la surface AFM : il est rare de pouvoir discerner les ITRs aux extrémités du polymère de plus le pas des bases dépend de la concentration en ion (dans notre cas en Mg^{2+}) mais également de la séquence (Adamcik et al. 2006; Hamon et al. 2007).

Pour caractériser l'évolution des différents objets sur la surface, nous avons réparti chaque objet dans une des trois grandes familles : tout d'abord les capsides qui semblent complètes, elles présentent une hauteur proche de 17 nm. La deuxième famille est constituée des capsides virales reliées avec un brin d'ADN. La dernière famille correspond aux brins d'ADN isolés, compactés ou étendus. Ceci étant fait sur le même nombre d'images représentant la même surface de mica observée, cette répartition en fonction de la température nous permet d'établir un certain scénario d'éjection. On peut dès à présent observer sur la figure 4.7.b une diminution du nombre total d'objets au fur et à mesure de l'augmentation de la température. A partir de 65°C, l'ADN éjecté est présent de manière significative et sa quantité et longueur moyenne semblent augmenter avec

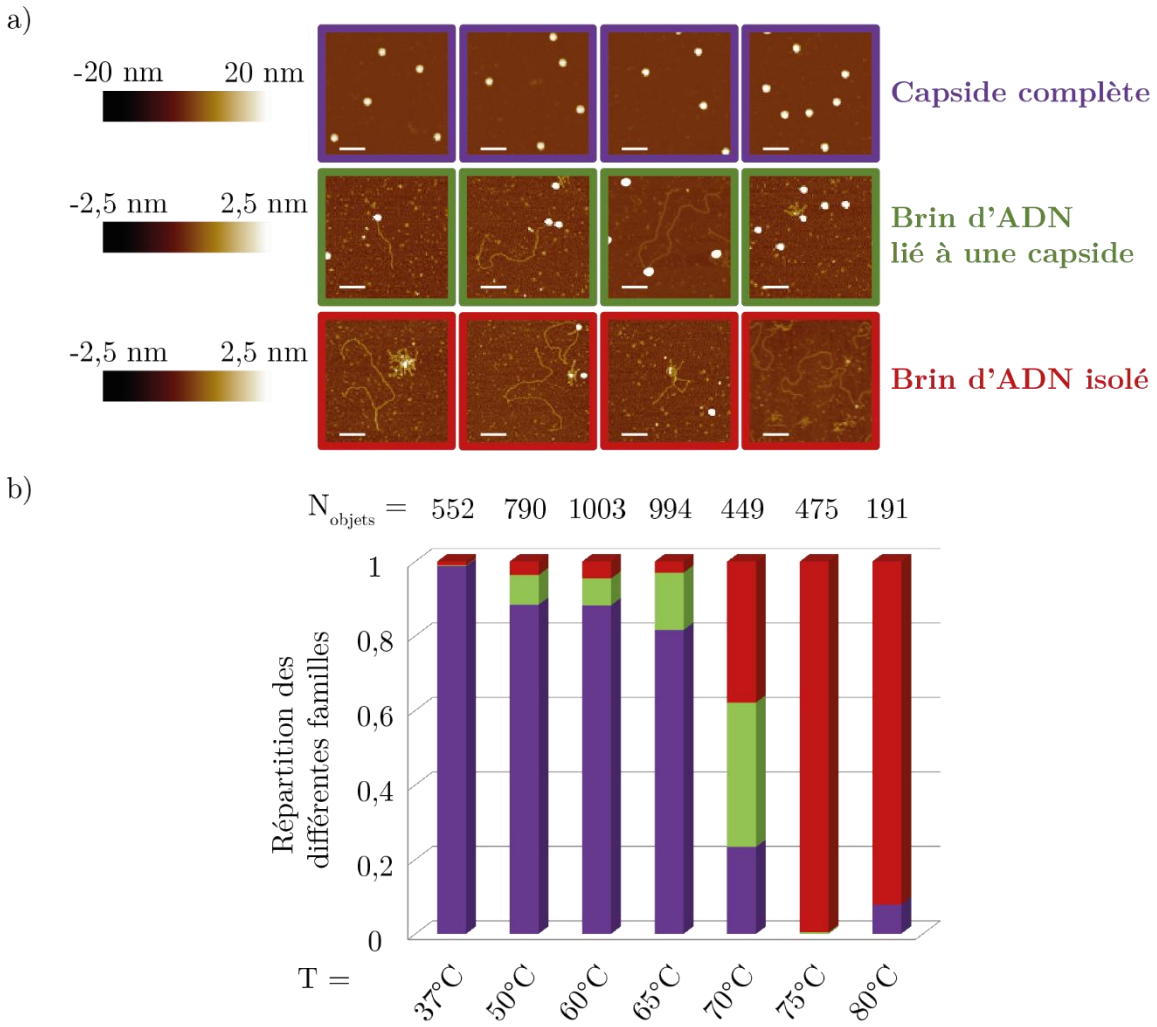


figure 4.7 - Scénario d'éjection de ssAAV8

a) Images par AFM des trois familles observées. Les capsides dites complètes présentent une hauteur proche des capsides non chauffées et forment la famille violette. La deuxième famille, verte, est composée des capsides dont la hauteur est proche de celles des capsides non chauffées liées à un brin d'ADN simple brin. Les brins isolés constituent la dernière famille en rouge.

La barre blanche représente 100 nm sur la surface.

b) Evolution de la répartition des populations des familles observées en fonction de la tempéarature. Majoritaires à 37°C, les capsides complètes sont de moins en moins dominantes plus la température augmente. A 80°C, les brins d'ADN sont majoritairement observés. Les brins d'ADN liés à une capside représentent un état intermédiaire.

la température. A 70°C, les trois familles sont réparties de façon égale. Et finalement, pour les températures supérieures, les brins isolés sont majoritaires.

La dernière caractérisation faite concerne l'évolution de la longueur d'ADN sur la surface en fonction de la température. Le *script* de mesure de la longueur d'ADN (Chap. 2.III.5) nous donne accès à la densité de probabilité de la longueur de l'ADN isolé sur la surface (figure 4.8). On peut remarquer que le nombre d'objets analysés augmente avec la température. Il y a de plus en plus de filaments linéaires libérés sur la surface. Pour les trois températures, un pic en dessous de 0,2 µm est présent. Il peut être dû à des objets parasites considérés comme des brins d'ADN par le programme mais qui sont sous la forme de brins d'ADN compactés dont on ne peut pas mesurer avec précision la longueur. On voit l'existence, pour une température de 60°C et 65°C, d'un palier qui se transforme en un pic à 75°C, pour une longueur d'ADN d'environ 0,5 µm. Pour 75°C, un deuxième pic apparait vers 1,1 µm proche de la longueur totale du génome des capsides AAV8 utilisées. Dans certains cas, deux filaments peuvent s'assembler à cause des ions divalents magnésium (Mg^{2+}) présents dans le milieu : la longueur mesurée par le programme est donc plus grande que celle du génome utilisé.

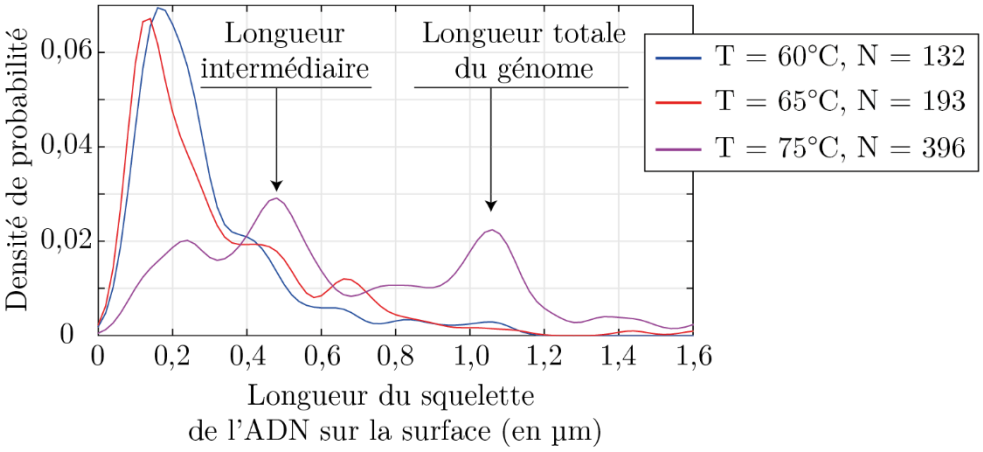


figure 4.8 - Longueur éjectée de l'ADN simple brin des capsides AAV8.
Densité de probabilité de la longueur du squelette éjectée. La longueur de l'ADN simple brin mesurée par le programme AAV8 est autour 1100 nm. On peut voir des longueurs intermédiaires sous forme de pics de densité de probabilité.

Grâce à ces différentes remarques, nous proposons un scénario d'éjection (figure 4.9) :

La température sert ici de moteur à l'agitation thermique. Ainsi plus la température est élevée, plus l'éjection du génome est facilitée. Les capsides semblent être résistantes à de fortes agitations puisqu'il reste des capsides dites intactes à 65°C. Cependant, à cette température, l'éjection a déjà commencé. Deux scénarios sont envisageables : soit l'ADN est éjecté par un pore de la capside restée quasiment intacte (sur la figure 4.6, la hauteur semble être conservée) ce qui donne les structures de type {capside + ADN étendu} ou encore {ADN étendu isolé} (figure 4.7), soit la capside est détruite complètement ou partiellement donnant les structures de type {capside + ADN compacté} ou {ADN compacté} (figure 4.7).

Dans le premier cas, l'ADN est décompacté, donnant ces longs filaments. Cependant, l'existence de structures couplées {capside + ADN étendu} et du pic intermédiaire sur la densité de probabilité de la longueur d'ADN éjecté (figure 4.8) pourrait s'expliquer par une éjection étape par étape : à 65°C et 70°C, l'énergie thermique apportée par le milieu chauffé n'est suffisant pour extraire qu'une partie de l'ADN, bien précise

(autour de 0,5 µm, c'est-à-dire environ 1 470 bases). A 75°C, seule une partie des ADNs partiellement éjectés arrive à s'extraire totalement, les autres restants bloqués dans cette étape intermédiaire, au grès des fluctuations. On pourrait ainsi modéliser le système par trois états d'équilibre, le premier étant la capside complète, le deuxième à 0,5 µm d'ADN libéré et le troisième avec tout l'ADN libéré. Plus la température est élevée, plus il est facile de peupler le troisième état.

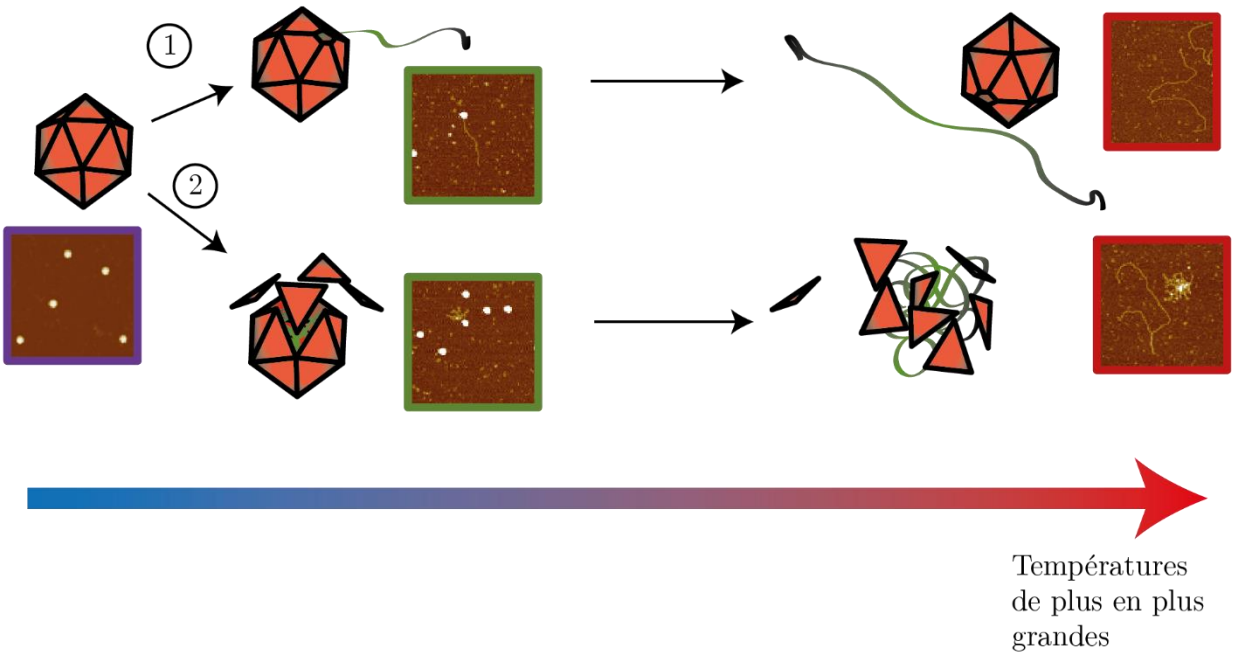


figure 4.9 - Scénarios de déstabilisation des vecteurs AAV8
Deux scenarios d'éjection de l'ADN sont proposés : 1. L'ADN est éjecté au travers d'un pore de la capside avec une étape intermédiaire où le génome est partiellement sorti (environ 0,5 µm). L'ADN totalement sorti apparait linéaire sur la surface. 2. La capside se désassemble plus ou moins selon la température libérant l'ADN encore compacté.

Dans le deuxième cas, l'ADN est libéré durant le chauffage tel qu'il était dans la capside, compacté selon sa structure secondaire. La disparition des filaments compacts pour des températures supérieures à 80°C peut s'expliquer par la dénaturation des structures secondaires de l'ADN à des températures aussi élevées, les liaisons hydrogènes qui maintiennent le double brin hybridé étant rompues à ces températures.

5. Discussion.

Dans ce paragraphe, nous nous sommes intéressés aux propriétés physiques de la capside AAV8, contenant un génome d'ADN simple brin de 3700 bases.

En mettant en place des outils d'analyses statistiques morphologiques, nous avons pu mesurer les effets du microenvironnement sur la morphologie de la capside (en présence d'ions divalents Mg^{2+} ou monovalents par exemple Na^{+} et Cl^{-}).

Nous avons montré qu'une grande concentration d'ions monovalents ne changeait pas fortement la hauteur moyenne mesurée. Les interactions électrostatiques ont un effet faible sur la hauteur mesurée. Dans le cas des ions divalents, plus la concentration augmente plus la particule est en interaction avec la surface et plus elle s'aplatit. Ce comportement serait donc à relier à la capacité des capsides à se déformer.

Nous avons donc proposé de sonder les propriétés mécaniques des capsides AAV8 en mesurant leur constante de raideur moyenne, autour de 0,12 N/m. D'autres mesures, dans d'autres conditions expérimentales (autre surface, milieu et levier) semblent indiquer une constante de raideur équivalente. En comparaison, la constante de raideur du virus MVM, virus de structure icosaédrique de 26 nm de diamètre, a été mesurée dans du PBS par l'équipe de de Pablo, cinq fois plus grande que celle que nous mesurons sur AAV (Carrasco et al. 2008). Les différences de solutions tampons et de leviers utilisés pourraient peut-être justifier cet écart. De plus, l'étude de de Pablo s'intéresse au comportement mécanique selon l'axe de symétrie de la particule icosaédrique. En améliorant l'imagerie, il serait alors envisageable d'effectuer une étude similaire.

Finalement, nous avons mené une étude de la stabilité de la capside en prenant comme paramètre de mesure la température. Nous avons pu caractériser l'évolution en température du devenir de l'ADN encapsidé. Nous avons ainsi observé deux types de structure du génome sur la surface de mica : l'une compacte et l'autre linéaire. Cette dernière forme ne se limite pas aux capsides contenant un génome double brin comme le proposait l'équipe de A. Asokan (Horowitz et al. 2013). Nous sommes arrivés à considérer deux scénarios de sortie de l'ADN, soit par étape avec éjection par un trou dans la structure protéique soit par destruction totale de la capside.

Les liens entre les propriétés morphologiques, mécaniques et de stabilité des capsides AAV8, dont le génome est un ADN simple brin de 3700 bases, ne peuvent être réellement compris qu'en les confrontant avec d'autres capsides AAV. Ainsi, les outils décrits dans ce paragraphe vont être mis à contribution afin de comparer la capside AAV8 avec un autre sérotype (Chap. 4.II), dans des environnements différents (Chap. 4.III) ou encore des capsides contenant d'autres types de génomes (Chap. 4.IV).

II. Comparaison des sérotypes : AAV8 vs AAV9 simple brin

L'existence de plusieurs sérotypes d'AAV offre la possibilité de faire varier la nature de la capside des vecteurs en fonction du tissu ou du type cellulaire ciblé. En effet bien que tous les sérotypes d'AAV existants soient capables d'infecter un grand nombre de types cellulaires, ils présentent des différences en termes d'efficacité d'infection qui varient en fonctions des tissus concernés. Au-delà des spécificités liées à la nature du récepteur cellulaire qu'ils reconnaissent, il est vraisemblable que les différences d'efficacité d'infection observées proviennent aussi de la façon dont la capside résiste et s'adapte aux variations de l'environnement intracellulaire au cours de son trajet vers le noyau. Nous avons donc été amenés à nous poser la question sur l'existence de différences physiques entre les sérotypes d'AAV.

Dans cette partie, nous nous intéressons au sérotype 9 que nous comparons avec le sérotype 8 déjà étudié dans la partie précédente, selon leurs propriétés morphologiques, leurs propriétés mécaniques ainsi que leurs stabilités devant une augmentation de la température.

Les capsides d'AAV9 utilisées ont été purifiées selon le même protocole que l'AAV8 par l'équipe d'Anna Salvetti. Elles contiennent comme AAV8, un ADN simple brin composé de 3700 bases (soit 1250 nm environ).

1. Propriétés morphologiques à l'équilibre

Les images de la figure 4.10 représentent des dépôts des deux sérotypes AAV8 et AAV9, obtenus en *mode Tapping* avec une pointe DLCS, sur une surface de mica fraichement clivé. La présence de nombreux objets déposés permet de réaliser facilement une étude statistique comparée des propriétés morphologiques des deux sérotypes.

Les capsides AAV9 semblent avoir une géométrie proche d'AAV8, dont la hauteur est d'environ 17 nm et le diamètre une trentaine de nanomètres. De plus, pour le dépôt d'AAV9, la surface reste relativement propre (bien que un peu plus rugueuse que celle du dépôt d'AAV8). Cela nous offre la possibilité d'observer la présence ou non de brins d'ADN sur la surface après chauffage des capsides.

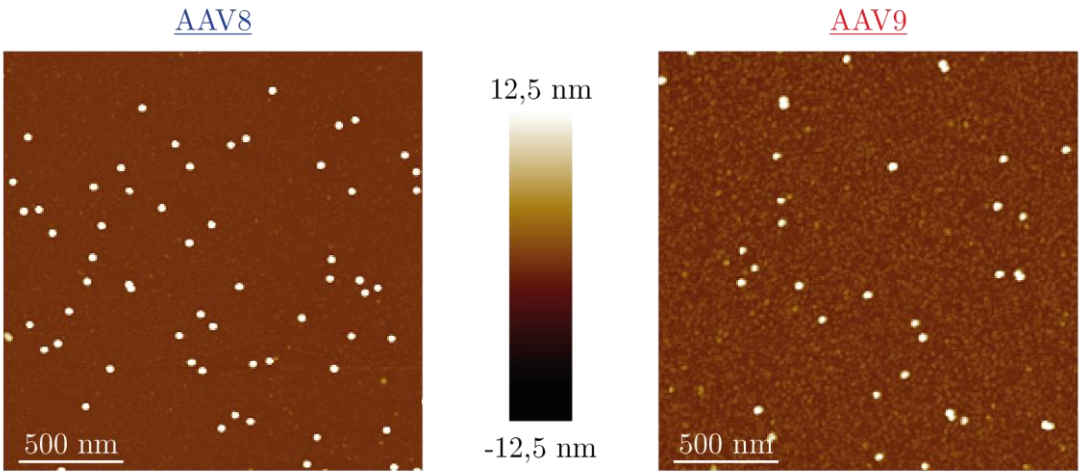


figure 4.10 - Images AFM de dépôts de AAV8 (à gauche) et de AAV9 (à droite).
Images obtenues en mode *Tapping* avec un levier DLCS. Les capsides sont déposés sur du mica fraichement clivé.

Les cartes de corrélations entre la hauteur et le diamètre et leurs densités de probabilité respectives pour les deux sérotypes se trouvent sur la figure 4.11. Les couples (diamètre ; hauteur) maximisant la corrélation sont légèrement différents : pour AAV8 (34,4 ± 2 nm ; 15,9 ± 1 nm) et pour AAV9 (35,1 ± 2 nm ; 17,9 ± 1 nm). Le diamètre, sensible à la convolution par la pointe (et donc à l'usure progressive) n'est pas le paramètre pertinent pour comparer les capsides AAV8 et AAV9 contrairement à la hauteur. La différence entre les moyennes de la hauteur est encore plus marquée : 15,9 ± 0,05 nm pour AAV8 et 17,7 ± 0,05 nm.

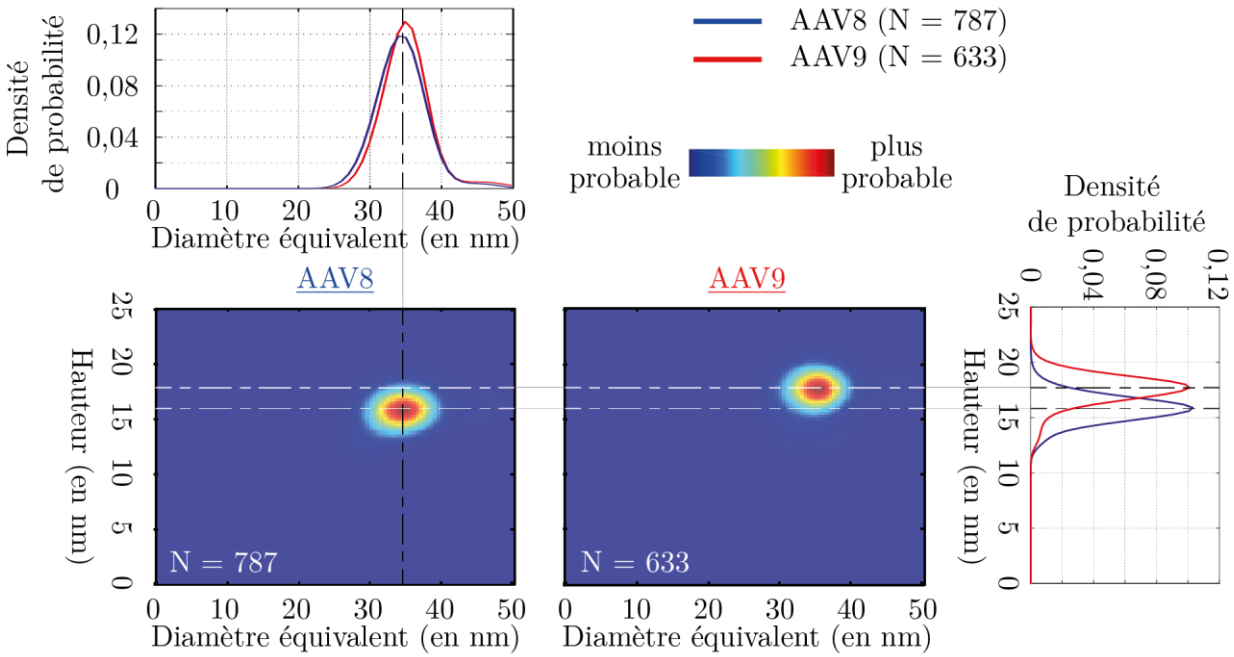


figure 4.11 - Comparaison statistique des morphologies d'AAV8 (N = 787) et d'AAV9 (N = 633) dans l'air.
Cartes de corrélation entre le diamètre équivalent et la hauteur pour AAV8 (à gauche) et AAV9 (à droite) après analyse d'images de dépôts AAV8 et AAV9 sur mica avec un levier DLCS. Les projections sur les côtés des cartes en haut et à droite sont respectivement les densités de probabilité du diamètre équivalent et de la hauteur. La hauteur moyenne de AAV8 est de 15,9 ± 0,05 nm tandis que celle de AAV9 est de 17,7 ± 0,05 nm.

Des images en milieu liquide (solution tampon TE) des capsides AAV8 et AAV9 ont également été réalisées (figure 4.12) pour comprendre si les différences observées sont sensibles à la force ionique du milieu environnant. Ainsi, sur la figure 4.12.a, on peut voir la présence de capsides sur la surface en nombre suffisant pour, après l'obtention d'une dizaine d'images, faire une étude statistique (figure 4.12.b). On peut remarquer une inversion par rapport à la mesure de hauteur dans l'air : ainsi la hauteur moyenne d'AAV8 est de 22,1 ± 0,3 nm est supérieure à celle d'AAV9 est de 18,3 ± 0,5 nm. La dispersion est plus importante pour le sérotype AAV9 avec 3,5 nm pour AAV9 soit 1,3 nm de plus que AAV8. Cette différence peut s'expliquer par l'existence de deux populations, avec une hauteur de 16,5 nm pour l'une et 21 nm pour l'autre. Ces deux valeurs pourraient avoir pour origine l'existence de particules vides dans l'échantillon d'AAV9 : celles-ci auront tendance à se déformer plus facilement sur la surface conduisant à une distribution bimodale.

Plusieurs explications peuvent être à l'origine des différences de hauteur observées entre les deux sérotypes : la première est géométrique, la capside AAV8 serait plus large que AAV9, ce qui irait à l'encontre

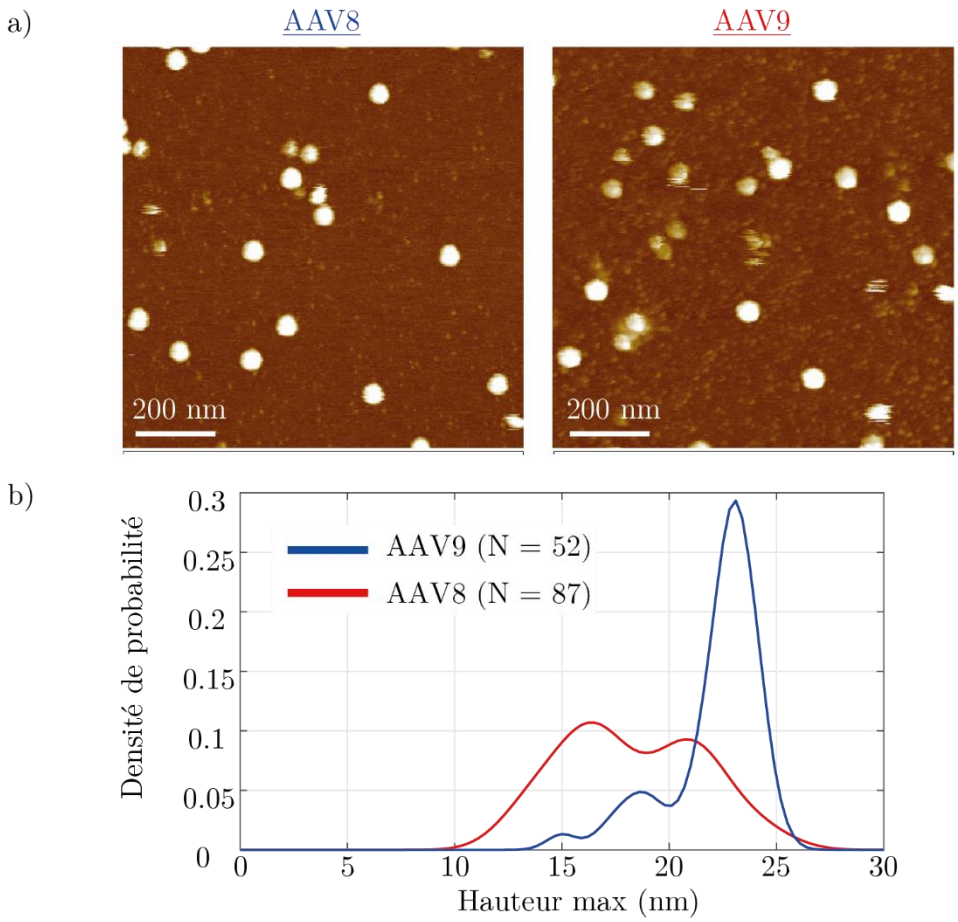


figure 4.12 - Etude morphologique de AAV8 (N = 143) et de AAV9 (N =45) en liquide (solution tampon TE).
L'imagerie a été réalisée en mode Peak Force avec un levier Scan Assyst Fluid +.

des résultats obtenus par cristallographie (Nam et al. 2007; DiMattia et al. 2012). AAV8 et AAV9 diffèrent par un nombre réduit d'acides aminés, et cela ne modifie pas le diamètre de la capside mesuré par cristallographie par rayons X (figure 1.27). La deuxième serait que la différence d'interaction (et donc de charges) entre la surface et la capside n'est pas la même entre AAV8 et AAV9. Une troisième explication est envisageable : la déformation de l'objet. L'inversion de la hiérarchie de taille lorsqu'on passe de l'air au liquide pourrait être une signature de cette origine. Nous avons donc étudié les propriétés mécaniques via les expériences de nano-indentation d'AAV9 pour comparer les constantes de raideurs des deux sérotypes.

2. Propriétés mécaniques à l'équilibre

L'étude a été faite sur des capsides AAV9 déposées sur une surface de mica (figure 4.13).

Les capsides AAV9 se modélisent par un ressort de raideur moyenne 0,034 N/m (déviation standard de 0,02) lorsqu'il est déformé par un levier de raideur 0,8 N/m.

En comparaison avec les résultats obtenus sur les capsides AAV8 (0,125 N/m), on obtient donc des valeurs clairement différentes entre les deux sérotypes, les capsides AAV9 sont plus souples que les AAV8 avec

un facteur 4 entre les deux constantes de raideur, ce qui pourrait expliquer la différence d'étalement de la capside sur la surface mais pas la différence entre les images dans l'air et dans le liquide.

La capside d'AAV8 est donc clairement plus rigide que celle d'AAV9.

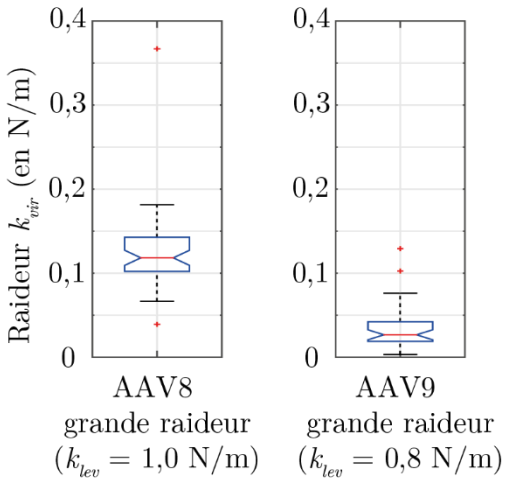


figure 4.13 - Raideur des capsides AAV8 et AAV9 pour deux types de leviers utilisés dans TNE.
Dans le cas d'un levier de grande raideur (1,0 N/m), la raideur moyenne d'AAV8 est de 0,12 N/m. (N = 51 courbes)
Dans le cas d'un levier de grande raideur (0,8 N/m), la raideur moyenne d'AAV9 est de 0,034 N/m. (N = 38 courbes)

3. Effet du chauffage des sérotypes

Pour continuer notre étude comparée des sérotypes AAV8 et AAV9, nous avons également réalisé les expériences de chauffage des capsides selon le protocole exposé dans le Chap. 2.II.4. Nous avons ensuite déposé les échantillons sur une surface de mica et réalisé des images pour observer l'état des capsides chauffées et la présence ou non d'ADN sur la surface.

Certaines de ces images sont présentées dans la figure 4.14. On remarque pour chacun des chauffages, la présence de capsides AAV9 de hauteurs correspondant à celles mesurées à température ambiante. Il y a de moins en moins de capsides lorsque la température augmente. Pour les hautes températures, les capsides AAV9 que l'on considère non modifiées par le chauffage semblent plus nombreuses que les capsides AAV8 mais présentent aussi plus d'agrégats. Il restera donc possible d'étudier statistiquement l'évolution des propriétés morphologiques d'AAV9 en fonction de la température de chauffage.

Si on s'intéresse maintenant à la surface, des filaments d'ADN simple brin apparaissent dès 37°C et sont de plus en plus nombreux lorsque la température augmente. Les deux types de filaments d'ADN sont présents : les linéaires et les compactés avec une prédominance apparente de la première forme par rapport à la seconde. La quantité d'ADN sur la surface issue des capsides d'AAV9 est moins importante que celle issu d'AAV8. Cependant, la présence de nombreux débris sur la surface nous empêche d'obtenir les distributions des longueurs des filaments linéaires (contrairement à AAV8 - figure 4.8).

La figure 4.15 renseigne sur l'évolution du diamètre à mi-hauteur et de la hauteur des capsides d'AAV8 et d'AAV9 via des cartes de corrélation. Contrairement aux capsides d'AAV8 qui voient leur hauteur

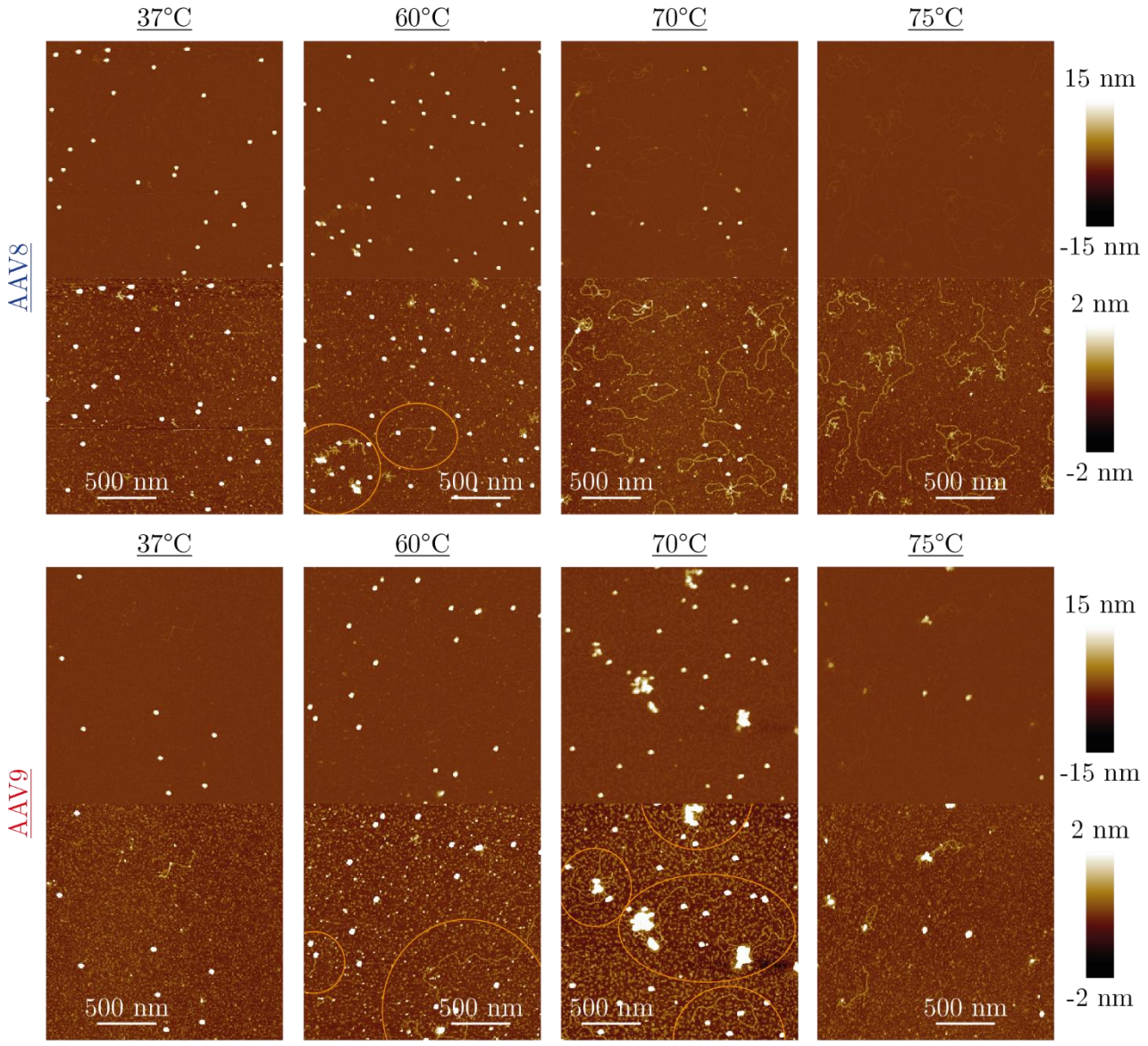


figure 4.14 - Images de dépôt d'AAV8 (en haut) et de AAV9 (en bas) après chauffage à différentes températures. On voit apparaitre de l'ADN simple brin sur la surface pour AAV9 dès 37°C cependant en très faible nombre par rapport à AAV8.

caractéristique fortement changer à 70°C, celle des AAV9 varie peu : 18,1 nm à 23°C, 18 nm à 60°C et 17,1 à 70°C (le diamètre caractéristique, sensible à la convolution, varie autour de 33 ± 3 nm mais sans changement clair). De même l'évolution de la dispersion en hauteur semble plus lente en fonction de la température : 1,3 nm à 23°C puis 2,7 nm à 60°C et finalement 2,2 nm à 70°C (à comparer avec dans l'ordre 0,6 nm, 1 nm et 3,6 nm pour l'AAV8). Il semblerait que les capsides AAV9 aient tendance à être peu déstabilisées par l'augmentation de la température ce qui est cohérent avec une éjection moins importante du génome.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons également classé les objets présents sur la surface dans différentes familles (définies dans la figure 4.7). La proportion de ces différentes familles a été mesurée pour chacune des températures de chauffage et représentée dans un histogramme (figure 4.16).

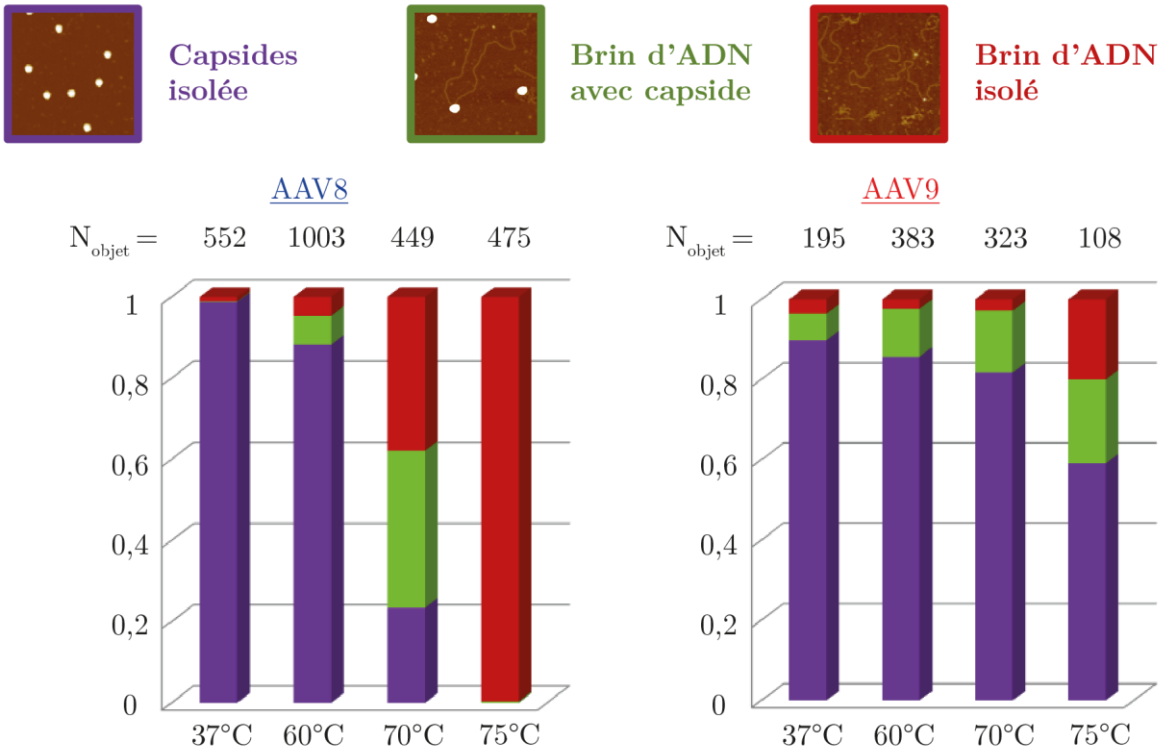


figure 4.16 - Scénario d'éjection de l'ADN pour AAV8 (à gauche) et pour AAV9 (à droite) selon les familles définies dans le Chap. 4.I.4.c et figure 4.7).

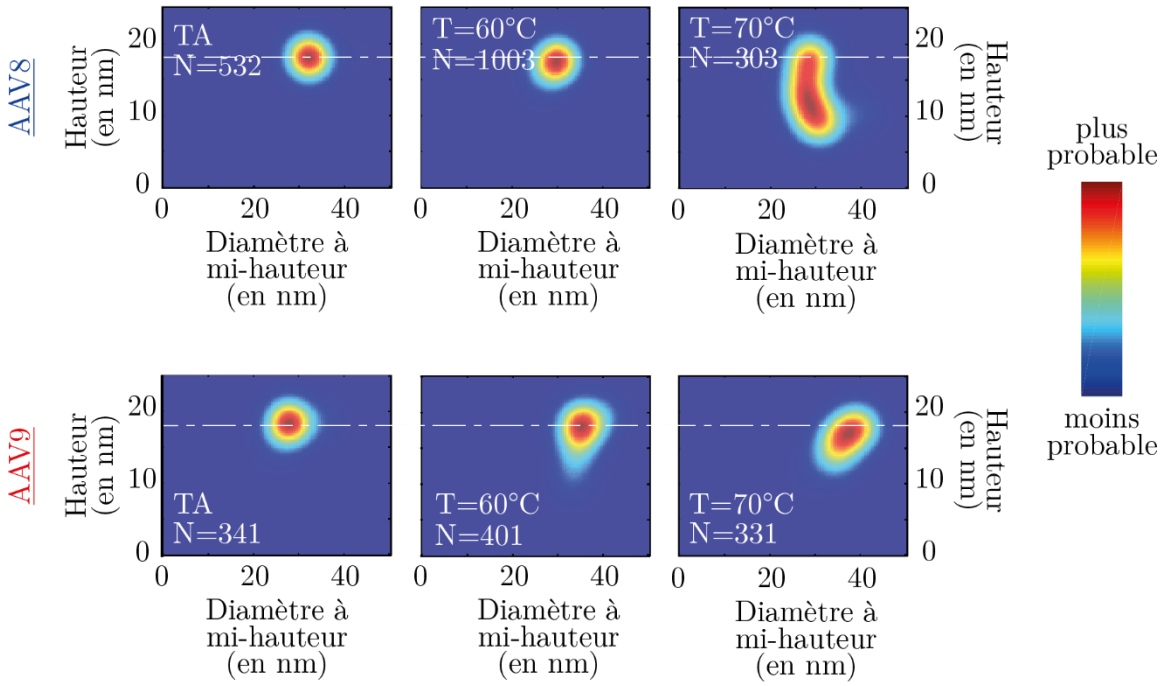


figure 4.15 - Morphologie comparée des capsides AAV8 et d'AAV9 après chauffage.
Carte de corrélation du diamètre à mi-hauteur et de la hauteur pour les capsides AAV8 (en haut) et pour les capsides AAV9 (en bas) pour différentes températures de chauffage pendant 15 minutes.
TA représente la température ambiante, 23°C.

Bien qu'à 37°C certaines particules AAV9 ont déjà éjecté une partie ou la totalité du génome qu'elles contiennent, la déstabilisation de la population totale des capsides nécessite une température beaucoup plus importante que pour AAV8. Statistiquement, la capside AAV9 semble donc être plus résistante aux fortes températures que la capside AAV8 malgré un début d'éjection plus précoce.

Ces expériences reposent sur de l'imagerie AFM. Nous avons voulu confirmer les résultats en utilisant une approche biochimique, le *Dot Blot*. L'expérience consiste à déposer sur une membrane de nitrocellulose et dans des conditions non dénaturantes des échantillons de capsides AAV obtenus après chauffage. Les capsides partiellement détruites ou intactes vont se fixer sur la membrane qui est ensuite incubées avec un anticorps spécifiques reconnaissant les protéines de capsides isolées (anticorps B1). La fixation de l'anticorps à la membrane est révélée grâce à un deuxième anticorps couplé à un substrat capable d'émettre de la lumière. Il est ainsi possible de savoir si la capside est intacte ou non, en détectant le signal lumineux émis ou pas par les capsides déposées sur la membrane par autoradiographie. Le protocole se trouve dans l'Annexe B.

Sur la figure 4.17, le signal de décapsidation apparait pour des températures plus hautes pour AAV9 que pour AAV8 donc que les capsides AAV9 nécessitent une agitation thermique plus importante qu'AAV8 pour être détruites ce qui confirme la plus grande stabilité thermique d'AAV9 par rapport à AAV8 devant les températures élevées.

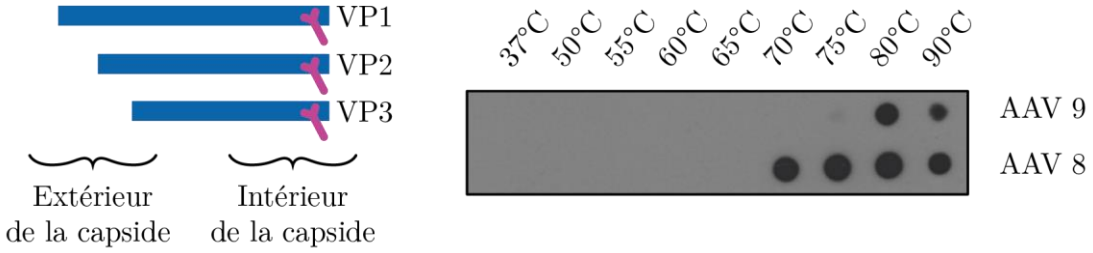


figure 4.17 - *Dot Blot* de reconnaissance des capsides détruites pour différentes conditions de chauffage pour les deux sérotypes 8 et 9.
Les particules sont incubées pendant 15 minutes dans le PBS$^+$ puis chauffées 15 minutes. Elles sont ensuite déposées sur gel puis mises en présence d'une sonde reconnaissant la partie interne des trois protéines VP.
Travail réalisé avec Axel Rossi (Equipe d'Anna Salvetti, CIRI).

4. Discussion.

Les expériences de cette partie ont été motivées par les différences de propriétés biologiques entre les sérotypes des capsides AAV : il sort de cette étude que les propriétés physiques semblent également différentes.

Dans un premier temps, nous avons établis les différences morphologiques apparentes sur les images AFM réalisée dans l'air. Il s'en dégage que la hauteur de la capside AAV9 est plus grande que celle de la capside AAV8 mais que son diamètre reste équivalent (dans la limite de résolution de l'AFM limitée par la convolution). En milieu liquide, l'ajout d'ions Mg^{2+} renverse la tendance : la hauteur moyenne d'AAV8 est supérieure à celle d'AAV9. Ce phénomène pourrait alors se justifier par la plus grande difficulté à se déformer

d'AAV8. En effet, les ions divalents ont tendance à augmenter les interactions entre la surface et l'objet, aplatissant plus facilement les capsides molles.

Les expériences de nano-indentation montrent que la raideur moyenne des capsides AAV8 est nettement plus élevée que celle d'AAV9. Ce résultat est donc consistant avec les hauteurs moyennes mesurées en liquide.

A l'équilibre, les propriétés physiques, morphologiques et surtout mécaniques, des deux sérotypes sont donc différentes.

Dans un deuxième temps nous nous sommes donc intéressés, à la stabilité des particules d'AAV en utilisant comme paramètre de mesure la température dans une gamme allant de l'ambiante à 80°C. Les capsides AAV9 conservent leur morphologie aux différentes températures sondées. En chauffant les particules, l'ADN sorti des capsides semblent être préférentiellement étendu et non compacté. Si on se réfère aux deux scenarios évoqués lors de l'étude de la déstabilisation des capsides AAV8 (Chap. 4.I.4), cela sous-entend qu'AAV9 serait plus à même à libérer son génome par un trou dans sa structure plutôt que par un désassemblage total de la capside.

L'éjection précoce d'ADN d'AAV9 pourrait peut-être se justifier par un mauvais assemblage de certaines particules ou être liée à sa plus grande souplesse, par rapport à AAV8, permettant à l'ADN de sortir par le pore de la capside pour des températures plus basses.

Ce comportement peut se justifier en se rappelant que la capside AAV9 est plus souple que celle d'AAV8. La structure de coque protéique pourrait alors s'accommoder plus facilement de déformations liées à d'éventuels changements de conformation des protéines de la capside sans se désassembler. Au contraire, une structure plus rigide comme celle d'AAV8 serait plus facilement déstabilisée par l'agitation thermique des protéines de capsides entrainant une rupture à température plus basse que pour l'AAV9.

Les propriétés, autant physiques que biologiques, semblent donc différer entre ces deux sérotypes, AAV8 et AAV9, démontrant une plus grande instabilité de l'AAV8 par rapport à l'AAV9 sous l'effet d'un apport d'énergie (augmentation de la température) meilleure pour AAV8 qu'AAV9. Il reste à déterminer si ces deux modes de libération du génome viral (par éjection via un pore ou destruction de la capside) existent *in cellulo* et, si c'est le cas, quel est le plus efficace du point de vue biologique.

III. Effet du pH sur les capsides AAV8 : pH = 7,2 vs pH = 5,4

Le cycle viral du virus AAV présente de nombreuses étapes à travers le cytoplasme de la cellule infectée. L'une d'entre-elles consiste en un transport de la particule à l'intérieur d'un endosome et son déplacement de la membrane vers le noyau en suivant les câbles de microtubules (Nonnenmacher & Weber 2012 et Chap. 1.IV.4).

Au cours de ce transport, le pH de l'environnement dans lequel se trouve le virus s'acidifie passant de 7 à environ 5 (Geisow & Evans 1984) : l'endosome est alors appelé tardif. En parallèle, l'acidification du milieu endosomal s'accompagne d'une augmentation de l'activité des protéases cellulaires contenues dans ces vésicules. Le virus va donc être en contact avec différents milieux, le premier neutre, le deuxième acide. L'acidification des endosomes provoque un changement de la structure de la capside et en particulier l'externalisation de la partie N-terminale de VP1 (Venkatakrishnan et al. 2013). Il a également été montré qu'un milieu acide induisait une activité auto-protéolytique de la capside (Salganik et al. 2012), en plus des protéases déjà présentes dans l'endosome.

L'effet du pH sur la structure et les propriétés biologiques de la capside AAV peut-il être relié à une modification des propriétés physiques ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé l'AFM pour comparer la morphologie, la mécanique et la stabilité thermique d'AAV lorsque le microenvironnement est soit neutre soit acide.

Pour cela, nous nous sommes focalisés sur le sérotype AAV8 dans deux solutions tampons (solutions d'acide citrique et de phosphate de sodium monobasique) l'un à pH = 7,2 et l'autre à pH = 5,4 (voir Chap. 2.II.2).

1. Propriétés morphologiques à l'équilibre

a. Imagerie dans l'air

Les capsides AAV8, après une étape d'incubation dans la solution tampon (à pH = 7,2 ou 5,4) pendant 15 minutes environ, sont déposées sur la surface de mica fraichement clivé. Les étapes de rinçage à l'eau et de séchage sont réalisées, pour enlever la solution tampon de la surface de mica. Les surfaces sont ensuite observées en *mode Peak Force*, avec un levier *ScanAssyst HR* (figure 4.18).

De nombreux objets sont présents sur la surface, permettant de réaliser une étude statistique robuste de la morphologie des capsides virales après l'obtention d'une dizaine d'images de chaque échantillon. Les surfaces sont également relativement propres. Elles permettront d'observer la présence ou non de filaments sur la surface si les particules sont déstabilisées. Cependant, dans le cas des dépôts à pH = 5,4, le bruit important empêche l'utilisation du programme de mesure de la longueur des filaments.

La figure 4.19 résume les propriétés morphologiques des capsides AAV8 obtenue dans l'air selon le pH, neutre ou acide. Le nombre de capsides est supérieur à 700 dans les deux cas, ce qui renforce les résultats sur les grandeurs statistiques obtenues.

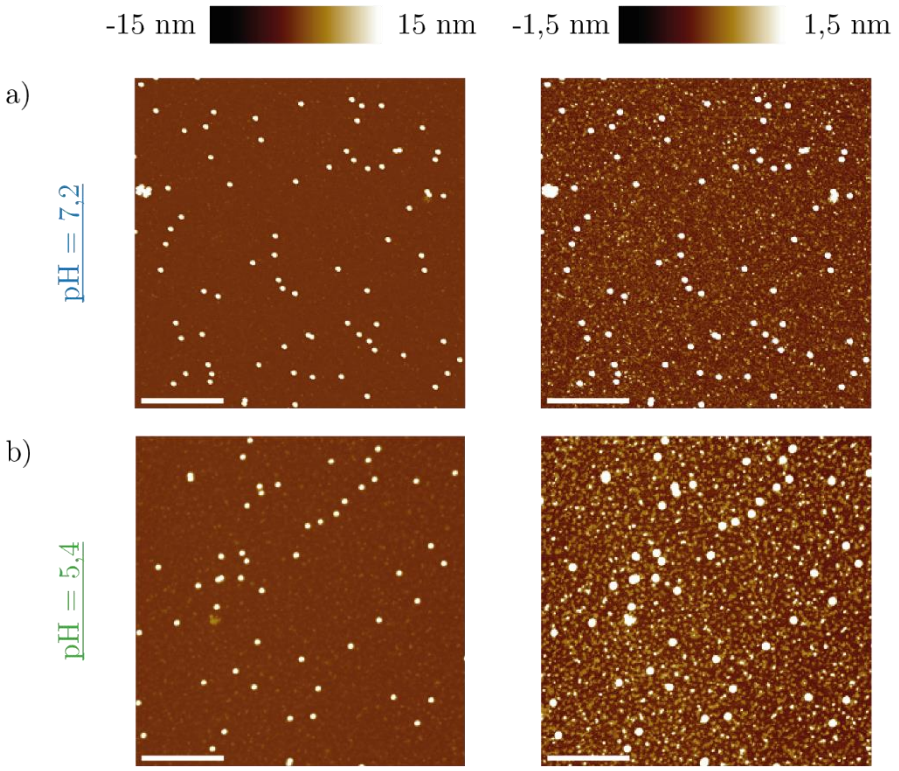


figure 4.18 - Images de dépôt de capsides AAV8 ayant été incubées 15 minutes dans une solution tampon à a) pH = 5,4 et b) pH = 7,2.

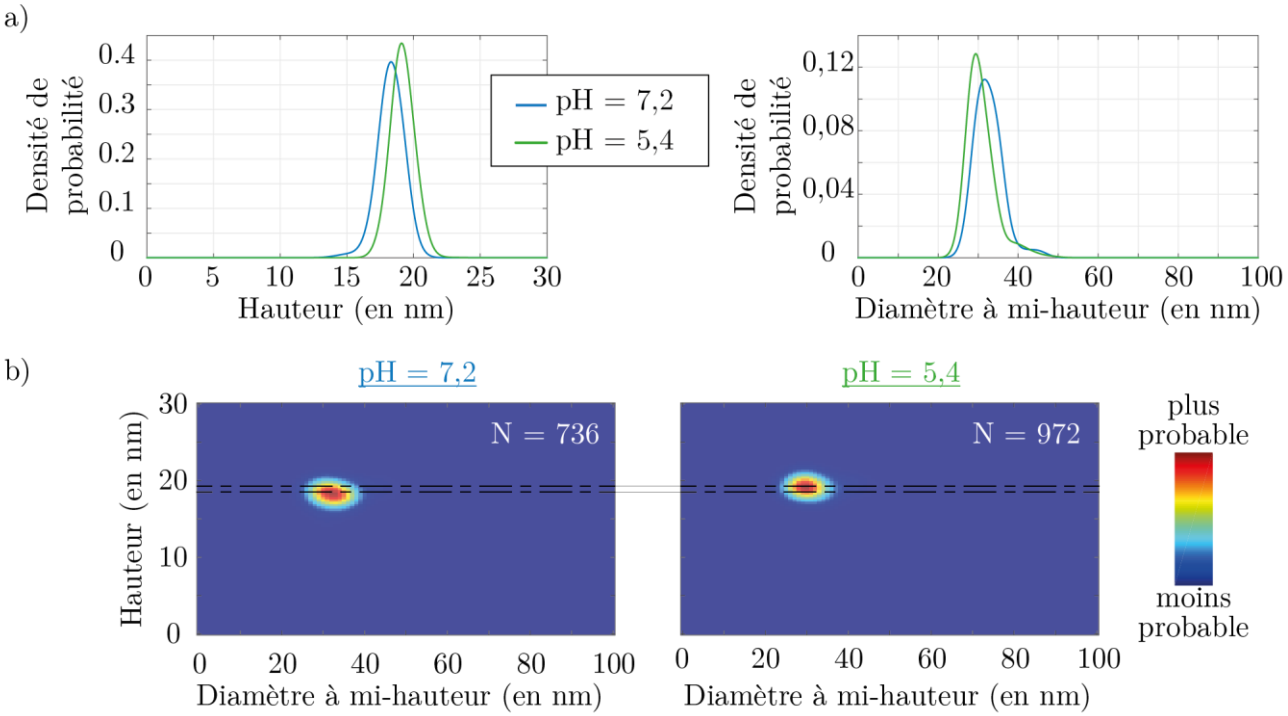


figure 4.19 - Propriétés morphologique de capsides AAV8 après incubation de 15 minutes dans un tampon à pH = 7,2 (N = 736) et à pH = 5,4 (N = 972).

a) Densité de probabilité de la hauteur (à gauche) et du diamètre équivalent à mi-hauteur (à droite). La moyenne de la hauteur à pH = 7,2 est de 18,3 ± 0,1 nm et à pH = 5,4 est de 19,2 ± 0,1 nm.
La moyenne du diamètre à pH = 7,2 est de 32,6 ± 0,2 nm et à pH = 5,4 est de 30,7 ± 0,2 nm.
b) Carte de correlation du diamètre à mi-hauteur en fonction de la hauteur pour des capsides AAV8 incubées à pH = 7,2 (à gauche) et à pH = 5,4 (à droite).

La hauteur moyenne des particules AAV8 est de 18,3 ± 0,1 nm à pH = 7,2 et de 19,2 ± 0,1 nm à pH = 5,4. Les capsides ayant été incubées à pH acide apparaissent donc légèrement plus hautes que les celles incubées à pH neutre.

La hauteur des capsides ayant été incubée dans le PBS$^+$ à pH = 7,2, mesurée dans l'air présente une valeur inférieure (voir Chap. 4.I.1). Cette faible différence peut être expliquée par la présence des ions Mg^{2+} qui comme on l'a vu, a tendance à aplatir les capsides sur la surface.

Le diamètre quant à lui est très proche dans les deux solutions, 32,6 ± 0,2 nm à pH = 7,2 et 30,7 ± 0,2 nm à pH = 5,4. La convolution seule par la pointe peut expliquer cette différence.

b. Imagerie en liquide

Les objets sont observés dans les deux solutions Tampon* à pH neutre et à pH acide (figure 4.20.a). Un grand nombre de capsides restent sur la surface, permettant d'obtenir les densités de probabilité de la hauteur et du diamètre (figure 4.20.b).

La hauteur moyenne des capsides AAV8 est plus grande dans une solution à pH = 7,2 avec 21,5 ± 0,05 nm que dans une solution à pH = 5,4 avec 20,5 ± 0,03 nm. La dispersion est très proche, à pH = 7,2 elle est de 1,5 nm et à pH = 5,4 elle est de 1,6 nm. On a donc une tendance opposée lorsqu'on réalise les images dans l'air ou en liquide.

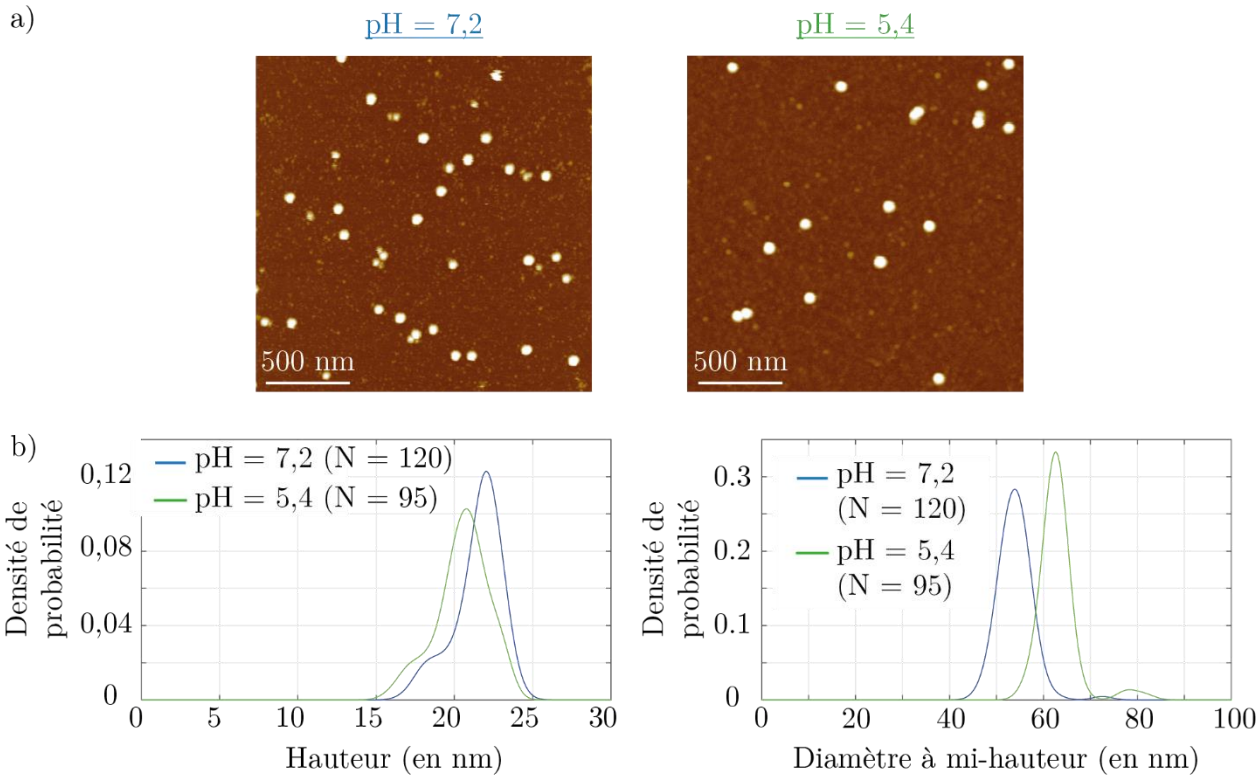


figure 4.20 - Imagerie en milieu liquide dans le Tampon*

a) Images en liquide, dans le Tampon* à pH = 5,4 (à gauche) et dans le Tampon* à pH = 7,2 (à droite). Les images ont été réalisées en *mode Peak Force* avec un levier SNL.

b) Densité de probabilité de la hauteur (à gauche) et du diamètre équivalent à mi-hauteur (à droite) après analyse des images obtenues en liquide à pH=5,4 (N = 95) et à pH = 7,2 (N = 120). La moyenne de la hauteur à pH = 7,2 est de 21,5 ± 0,2 nm et à pH = 5,4 est de 20,5 ± 0,2 nm. La moyenne du diamètre à pH = 7,2 est de 53,0 ± 0.33 nm et à pH = 5,4 est de 63,0 ± 0,5 nm.

La moyenne du diamètre à mi-hauteur des capsides à pH = 7,2 est 10 nm inférieure qu'à celle obtenue à pH = 5,4. La convolution pourrait justifier un tel écart.

2. Propriétés mécaniques à l'équilibre

Les observations des capsides AAV8 en liquide dans des solutions tampons à différents pH nous laissent penser, comme cela a été le cas avec la comparaison entre AAV8 et AAV9, à des propriétés mécaniques différentes. Les expériences de nano-indentation ont été réalisées sur 24 capsides AAV8 dans la solution tampon à pH = 7,2 et sur 14 à pH = 5,4.

Il apparait que la capside AAV8 présente une raideur médiane de 0,037 N/m à pH = 7,2, avec un écart interquartile de 0,020 N/m, et est supérieure à celle de la capside AAV8 à pH = 5,4, de raideur médiane 0,024 N/m soit un facteur d'environ 2.

En outre, il est étrange d'observer que la raideur des capsides AAV8 dans la solution Tampon* à pH = 7,2 est trois fois plus faible que celle dans la solution TNE, de pH équivalent. La présence de Tris augmenterait la dureté des capsides ce qui est peu envisageable. Alternativement, le ligand EDTA complexerait les ions Mg^{2+} présents naturellement sur les capsides AAV, diminuant leur rigidité ce qui mènerait à une constante de raideur plus faible dans le TNE, ce qui n'est pas ce que l'on observe. Finalement, la différence de raideur des leviers utilisés pourrait justifier cet écart entre le TNE et le Tampon* à pH = 7,2.

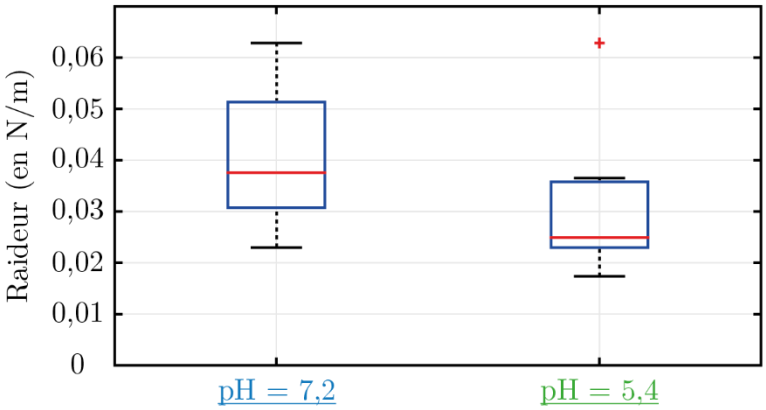


figure 4.21 – Constantes de raideur des capsides AAV8 dans le Tampon*, à pH = 7,2 (N = 24 - en bleu) et à pH = 5,4 (N = 14 - en vert).
Les expériences ont été réalisées avec un levier NPS de faible raideur 0,11 ± 0,03 N/m

3. Effet du chauffage

Le troisième critère de comparaison entre les capsides dans deux milieux, à pH = 5,4 et à pH = 7,2, est la stabilité thermique. Pour cela, nous avons réalisé le protocole de chauffage des capsides, présenté Chap. 2.II.4, pour différentes températures. Le pH stable des deux Tampons* à pH = 5,4 et à pH = 7,2 augmente respectivement d'environ 0,3 et 0,6 lorsque la température passe de 23°C à 60°C, conservant un caractère relativement acide et neutre des solutions.

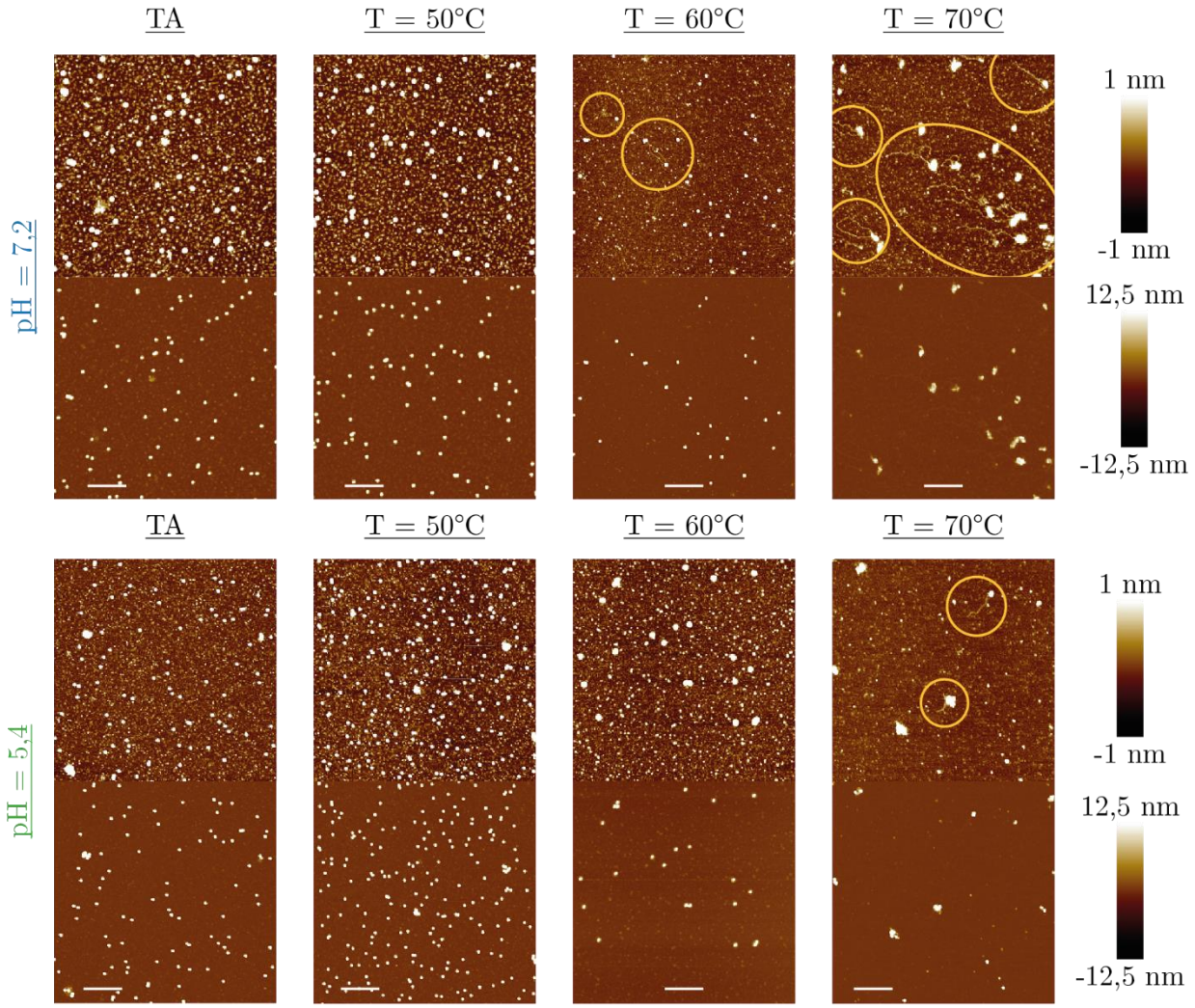


figure 4.22 - Images de dépôts de capsides AAV8 incubé dans les deux tampons* pH=5,4 (en haut) et pH=7,2 (en bas) après chauffage à différentes températures pendant 15 minutes.
On peut voir un retard à l'éjection de l'ADN pour les capsides AAV8 incubées dans une solution à pH=5,4 comparée à celle à pH = 7,2.

Les images des dépôts sont réalisées dans l'air en *mode Peak Force*, avec un levier *ScanAssyst HR* (figure 4.22). A petite échelle, le bruit, dû à la présence de débris, est de moins en moins important lorsque la température augmente, surement du fait d'un phénomène d'agrégation. Ce phénomène nous permet de mieux apprécier la sortie du génome de la capside AAV8. Ainsi, il apparait que certaines capsides AAV8 ont éjecté leurs ADN lorsqu'elles sont chauffées 15 minutes à 60°C dans la solution Tampon* à pH = 7,2 alors qu'à pH = 5,4 une température plus élevée, de 70°C, est nécessaire. A grande échelle, les capsides AAV8 dans le Tampon* pH = 7,2 semblent être désassemblées à 70°C alors qu'il reste des particules intactes dans le Tampon* pH = 5,4. Quel que soit la température, une quantité importante d'objets se trouvent sur la surface de mica, permettant l'étude statistique des propriétés morphologiques pour confirmer cette observation.

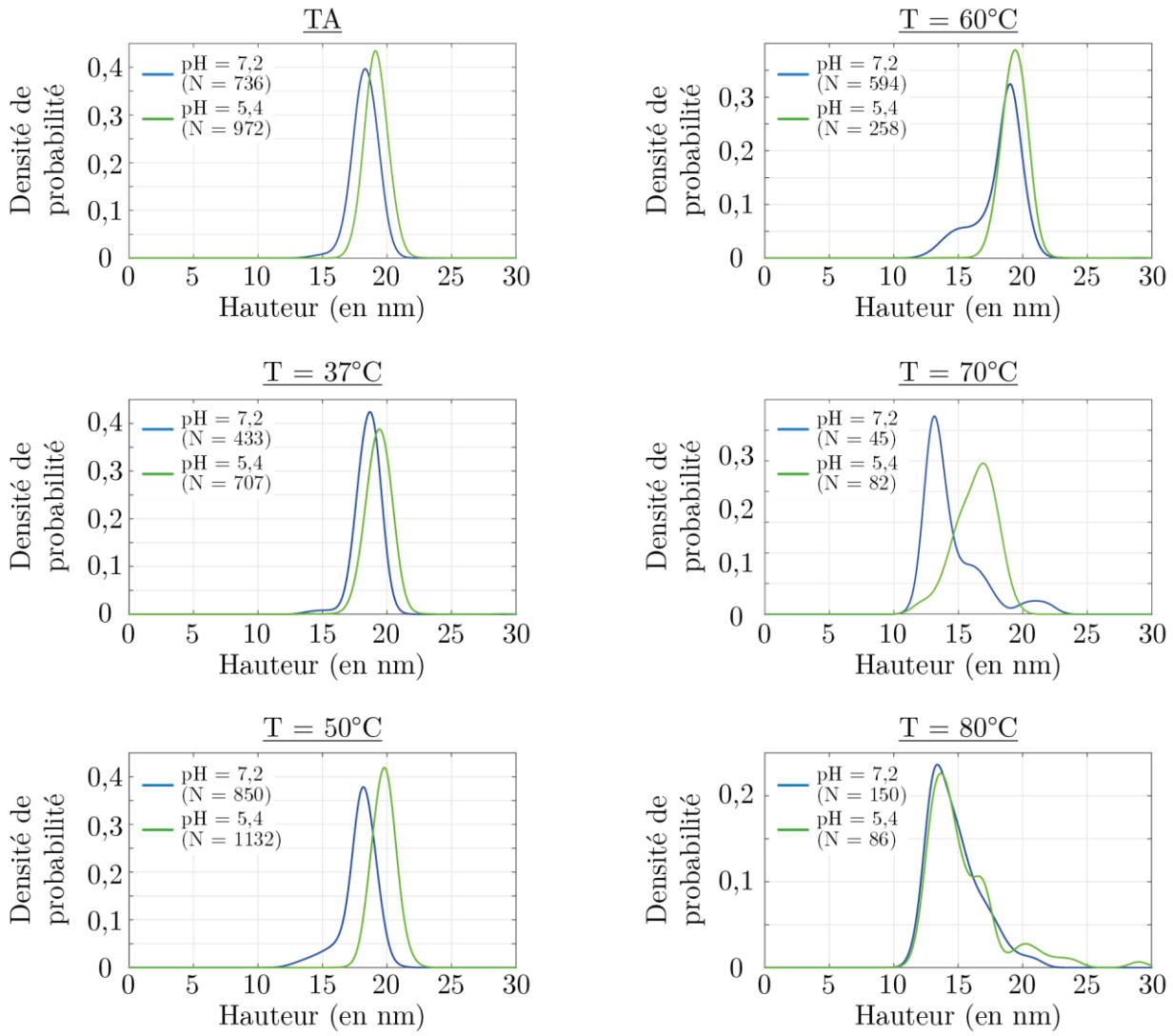


figure 4.23 - Evolution de la densité de probabilité de la hauteur des particules en fonction de paramètres d'incubation.
Les capsides AAV8 ont été incubées pendant 15 minutes dans les solutions Tampon* à pH = 5 (en vert) et à pH = 7 (en bleu) puis chauffées dans ce même tampon pendant 15 minutes à différentes températures.

Température	Hauteur caractéristique	
	pH = 5,4	pH = 7,2
TA	19,1 ± 1 nm	18,3 ± 1 nm
37°C	19,4 ± 1 nm	18,6 ± 1 nm
50°C	19,8 ± 1 nm	18,2 ± 1 nm
60°C	19,1 ± 1 nm	19,0 ± 1 nm
70°C	16,9 ± 1 nm	13,1,0 ± 1 nm
80°C	13,6 ± 1nm	13,3 ± 1 nm

Tableau 4.2 - Hauteurs caractéristiques de AAV8 en fonction de la température de chauffage et du pH de la solution Tampon*.

Différents problèmes d'imagerie ont obligé à changer de pointe entre les différents dépôts. L'étude statistique du diamètre à mi-hauteur des particules n'est donc pas exploitée, puisque la convolution par la pointe n'est pas constante tout au long des expériences d'imagerie. Par contre, la figure 4.23 représente l'évolution de la densité de probabilité de la hauteur. Dès 50°C, certaines capsides ayant été incubées dans la solution Tampon* à pH = 7,2 présentent une hauteur autour de 15 nm. Toujours dans cet environnement neutre, la population de particules ayant une hauteur nettement inférieure à la hauteur moyenne à TA (18,3 ± 0,1 nm) est de plus en plus importante au fur et à mesure que la température augmente avec une diminution maximale à 70°C. Pour les capsides incubées dans une solution à pH = 5,4, cette diminution n'apparait qu'à partir de 70°C et est très importante pour une température de chauffage de 80°C. On peut supposer que la diminution de la hauteur indiquerait la rupture de certaines capsides. Sur le tableau 4.1 sont indiquées les différentes hauteurs caractéristiques des particules qui suivent le scenario décrit ci-dessus.

Pour confirmer ces observations par une autre méthode expérimentale, nous avons réalisé un *Dot Blot*. On observe sur la figure 4.24 un signal dès 75°C pour les capsides chauffées dans la solution Tampon* à pH = 7,2 alors que le premier signal dans le cas du pH = 5,4 n'arrive qu'à 90°C. L'anticorps, qui est le même que celui utilisé pour la comparaison des sérotypes (Chap. 4.II.3 et figure 4.17), reconnait une région protéique interne dans la capside assemblée. La présence d'un signal indique donc que les capsides détruites. A nouveau, les capsides à pH acide semblent donc moins résistantes à des températures élevées que lorsqu'elles sont à pH neutre.

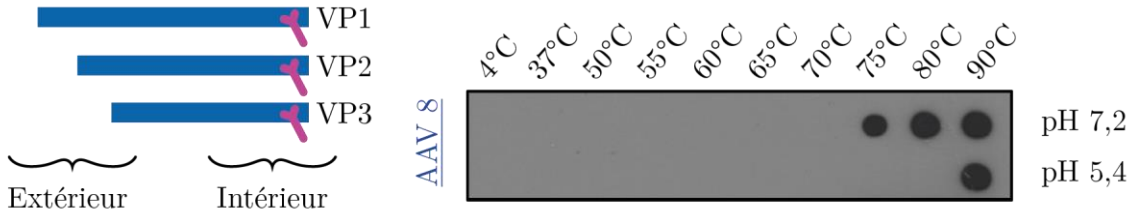


figure 4.24 – *Dot Blot* de reconnaissance des capsides AAV8 détruites pour différentes conditions de chauffage dans différents milieux de chauffage.
Les particules sont incubées pendant 15 minutes dans une solution Tampon* à pH = 7,2 (en haut) et à pH = 5,4 (en bas) puis chauffées 15 minutes. Elles sont ensuite déposées sur gel puis mises en présence d'une sonde anti-corps reconnaissant la partie interne des trois protéines VP.
Travail réalisé avec Axel Rossi (équipe d'Anna Salvetti, CIRI).

4. Discussion.

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet du pH du microenvironnement sur les capsides AAV8.

Nous avons montré que la capside AAV8 présente des propriétés morphologique, mécanique et de stabilité différentes selon le pH du milieu dans lequel elle se trouve. Ainsi, incubée dans un milieu à un pH acide (de 5,4), sa hauteur sera statistiquement supérieure à celle dans un milieu neutre (pH = 7,2) lorsqu'elle est imagée dans l'air. Ce résultat doit cependant être discuté. En effet, nous ne mesurons pas la hauteur réelle de la capside mais une hauteur effective, dépendant de la différence d'interaction entre l'objet biologique et la pointe d'un côté et la surface et la pointe de l'autre. Or, comme indiqué dans le Chap. 2.II.3.a, le mica présente

un pKa de 6,8. Lors du dépôt, sa charge de surface change si on est à pH = 5,4 ou à pH = 7,2 : ce qui peut expliquer par exemple la différence d'affinité des particules sur la surface. Cependant, le rinçage, avec une eau à pH neutre, et l'imagerie dans l'air minimisent ce phénomène en redonnant au mica sa forme à pH neutre. Cette différence de hauteur ne serait alors principalement pas dû à la charge de la surface de mica et donc aux variations d'interactions entre la surface de mica et la pointe mais plutôt à celles entre les capsides d'AAV et la pointe (voir figure 1.28).

La tendance est inversée lorsque les images sont faites en milieu liquide dans les solutions Tampon*. Les interactions entre la pointe, l'objet et la surface peuvent justifier cette différence et ce pour deux raisons. La première est que la surface de mica est électriquement neutre à pH = 5,4 et est négative à pH = 7,2, les différences d'interaction entre la surface et la pointe d'une part et entre l'objet biologique et la pointe d'une autre sont distinctes selon la nature de la solution tampon du fait du changement de la charge du mica. La seconde justification s'appuie sur les propriétés mécaniques. Cet écart pourrait être dû au fait que, à l'instar d'AAV9 qui plus souple présente en liquide une hauteur plus basse qu'AAV8, AAV8 dans un milieu acide plus facilement se déforme que dans un milieu neutre.

Si on sonde également les propriétés mécaniques, on remarque une différence de comportement : une capside dans un milieu acide peut être modélisée par un ressort de raideur plus faible que lorsque la capside se trouve dans un environnement à pH = 7,2.

Et finalement, en chauffant les particules AAV8 dans leurs milieux respectifs, la température d'éjection du génome vue par AFM est déplacée vers les hautes températures lorsque le pH est à 5,4, ce qui est confirmé avec les expériences de biochimie par *Dot Blot*. Les travaux d'Horowitz sur la capside AAV2 (Horowitz et al. 2013) montre également par fluorométrie une tendance similaire.

Le pH acide semble donc rendre la capside plus souple, la rendant résistante à l'agitation thermique et donc l'éjection de l'ADN nécessite une température plus élevée. Cette modification de la rigidité pourrait s'expliquer par l'activité auto-protéolytique de la capside à pH acide (Salganik et al. 2012) qui réduirait la rigidité de la structure et rendrait la structure plus souple.

Finalement, il semblerait qu'AAV8 dans un milieu dont le pH est acide se comporte comme AAV9 dans un milieu neutre que cela soit pour la morphologie, pour les propriétés mécaniques et pour la stabilité thermique.

Si on revient au cycle viral, il semblerait paradoxal que la capside devienne de plus en plus stable lorsque le pH diminue à l'intérieur de l'endosome, sauf si l'on considère que les capsides ne doivent pas libérer leur génome avant d'arriver au noyau. La sortie hors de l'endosome dans le cytoplasme et à proximité de la membrane nucléaire s'accompagne d'une réaugmentation du pH, le cytoplasme à ce niveau de la cellule étant un environnement neutre, ce qui pourrait induire à un retour à la situation initiale, rendant ainsi la capside plus fragile et donc plus à même à relâcher son ADN. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse par des mesures de stabilité mais également de nanoindentation sur des particules ayant été incubées à pH acide puis remises dans un milieu neutre pour mimer la sortie hors de l'endosome.

IV. Effet de la nature et de la longueur du génome du vecteur

Dans les parties précédentes, nous avons comparé deux structures de capsides en considérant deux sérotypes (AAV8 et AAV9) et nous avons modifié l'environnement direct de ces capsides en changeant le pH : ces expériences consistaient à modifier l'enveloppe protéique, de manière directe en comparant les sérotypes ou indirecte en modifiant le pH du microenvironnement. Dans cette quatrième partie, nous étudions l'effet l'effet de la nature et de la longueur du génome présent à l'intérieur de la capside.

Dans les capsides AAV utilisées en transfert de gènes, le génome est amené à être modifié. Deux paramètres peuvent être amenés à varier. Tout d'abord la longueur du simple brin d'ADN : il a été montré que lors de l'étape d'encapsidation, la longueur de l'ADN incorporé dans la capside était fortement limitée au-delà de 5000 bases (Wu et al. 2010). Deuxièmement, la nature de l'ADN, qui peut être simple ou double brin : l'efficacité de transcription du gène du vecteur dans la cellule hôte est augmenté lorsque l'ADN est sous la forme double brin (*self complementary DNA*) (McCarty et al. 2001). Il apparait donc important de connaitre l'effet du génome sur les propriétés physiques de la capside et dans notre cas plus précisément, sur la stabilité des capsides.

En utilisant le protocole de chauffage utilisé dans les expériences précédentes, nous testons la stabilité thermique des capsides AAV9 possédant soit un ADN simple brin de 3700 bases (noté ssADN) (voir Chap. 4.II.) soit un ADN double brin de 2300 paires de bases (noté scADN). Le premier type de capside sera appelé ssAAV9 et le second scAAV9. Nous comparons également des capsides AAV8 possédant soit un ADN simple brin de 3700 bases (notée ssADN) (voir Chap. 4.I.) soit un ADN simple brin de 4700 bases (noté sslADN). Le premier type de capside sera appelé ssAAV8 et le second sslAAV8. Le génome de 4700 bases est de la même taille que celui du virus sauvage. Ainsi, les comparaisons se feront entre capsides identiques (même protéines de structure) mais contenant des ADNs différents.

Les capsides contenant les deux types de génome ont été produites et purifiées dans le laboratoire d'Anna Salvetti, à l'ENS de Lyon.

1. Effet de la nature du génome : ssAAV9 vs scAAV9

Nous avons réalisé les expériences de chauffage pour étudier la déstabilisation des capsides par l'éjection de l'ADN encapsidé ou leur désassemblage. Les échantillons ont alors été déposés sur des surfaces de mica, comme décrit précédemment (Chap. 2.II.4).

a. Imagerie dans l'air

Les images de la figure 4.25.a représentent les dépôts de capsides non chauffés sur une surface de mica fraichement clivée. On peut voir un nombre important de particules sur la surface, permettant une comparaison statistique de la morphologie des objets (figure 4.25.b).

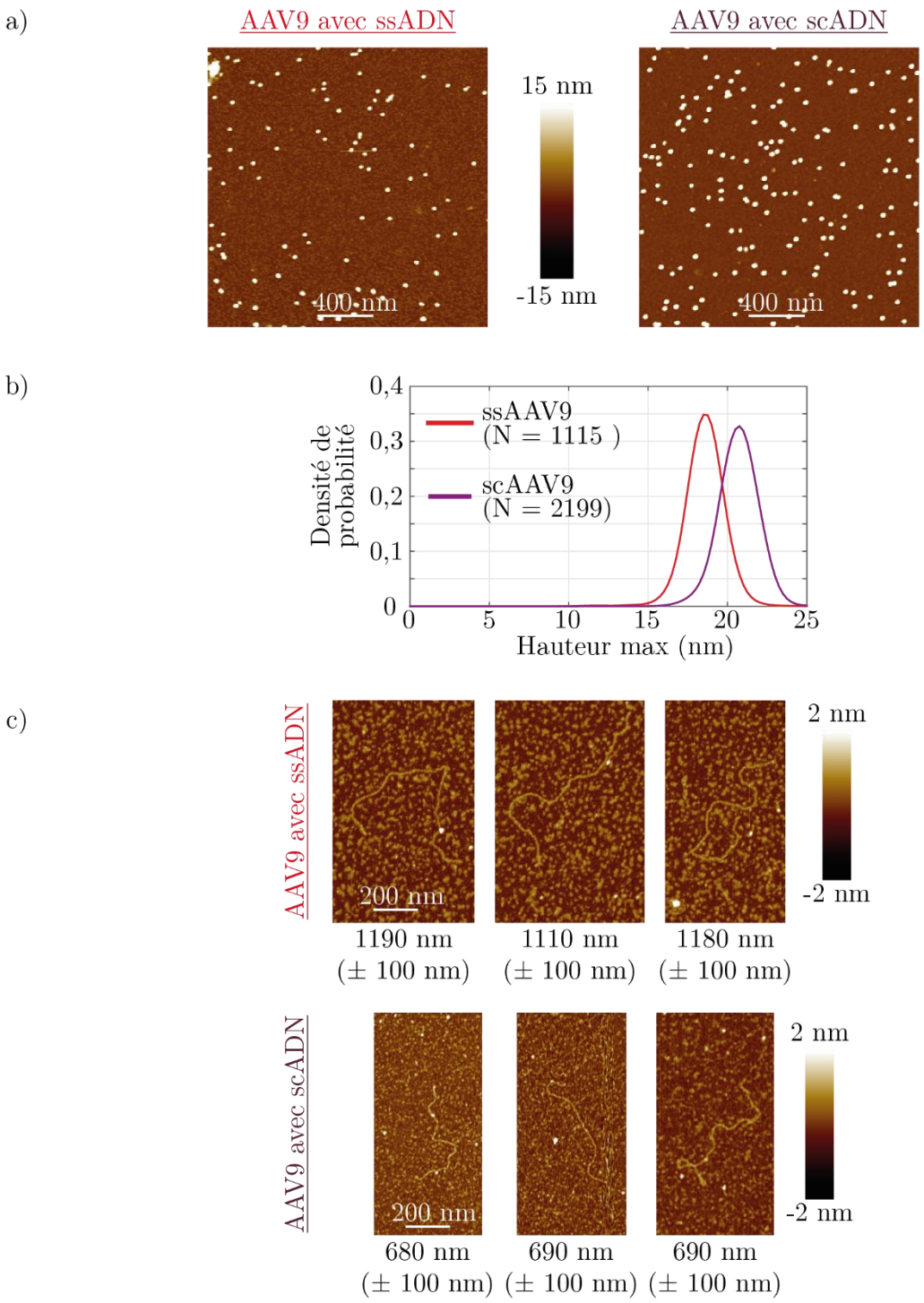


figure 4.25 - Capsides AAV9 contenant un ADN simple brin (1150 nm - ssADN) ou double brin (750 nm - scADN).
a) Image par AFM dans l'air (en *mode Peak Force*) avec un levier Scan Assyst HR de capsides ssAAV9 (à gauche) et scAAV9 (à droite).
b) Comparaison des densité de probabilité de la hauteur de capsides ayant comme génome de l'ADN simple brin (3700 bases – en rouge, N = 2199) et de l'ADN double brin (2500 bases – en violet, N = 1115).
c) Image de dépôts de capsides après chauffage à plus de 80°C des capsides. Les brins peuvent être isolés sur la surface. On peut différencier les deux types de brins par leurs longueurs indiquées en dessous des images.

Les capsides ssAAV9 ont une hauteur moyenne de 18,61 ± 0,05 nm alors que celle des capsides scAAV9 est de 20,73 ± 0,04 nm. Les capsides contenant de l'ADN simple brin seraient donc moins hautes que celles contenant du double brin.

Pour vérifier la longueur des brins et leur nature, nous avons chauffé les particules à très haute température (80°C) pour être certain d'avoir éjecté totalement de l'ADN des capsides. Nous avons ainsi pu obtenir des images de brins isolés (figure 4.25.c). Le bruit associé à la surface n'est pas négligeable (grande quantité de débris), nous ne pouvons donc ni comparer les hauteurs, ni utiliser le programme de mesure automatique. Nous avons quand même évalué la longueur des filaments d'ADN, « à la main ». On observe une longueur inférieure pour le scADN par rapport au ssADN, d'environ 300 nm, ce qui est suffisant pour les

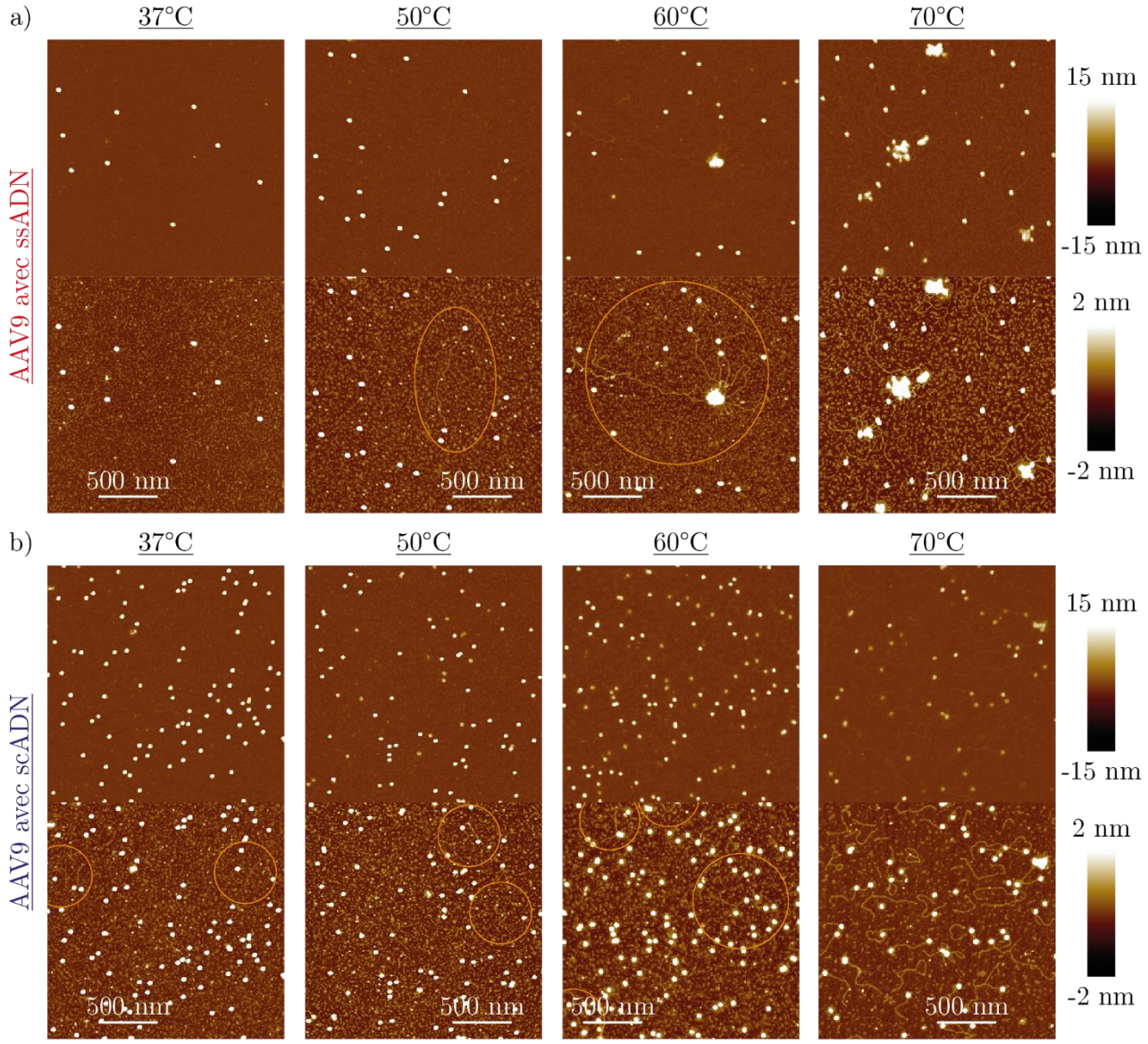


figure 4.26 - Images des dépôts de capsides a) ssAAV9 et b) de scAAV9 après chauffage pendant 15 minutes à différentes températures.
La solution tampon d'incubation lors du chauffage est le PBS⁺.
Les images sont obtenues dans l'air en mode *Peak Force* (levier ScanAssyst HR).
On remarque un retard d'éjection de l'ADN simple brin (ssAAV9), à partir de 50°C, par rapport à l'ADN double brin (scAAV9), à partir de 37°C.

distinguer. La différence entre la valeur attendue théorique (825 nm) et celle mesurée (environ 700 nm) peut être due à la forme particulière des extrémités du scADN non prises en compte (voir Chap. 1.IV.2) et non visible sur les images AFM.

b. Expérience de déstabilisation

La figure 4.26 rassemble des images des dépôts obtenus après les expériences de chauffage des capsides ssAAV9 et scAAV9. Pour le premier type, jusqu'à 70°C (et voir plus), on observe des capsides AAV9 qui semblent encore intactes et en nombre important. Pour le deuxième type, jusqu'à 50°C, des capsides complètes sont visibles sur le dépôt. Par contre, à partir de 60°C, on voit apparaitre un certain nombre d'objets beaucoup plus bas (autour de 15 nm) que précédemment. Ce phénomène s'accroit pour des températures encore plus élevées (ici, 70°C). L'éjection des brins d'ADN des scAAV9 augmente également avec la température.

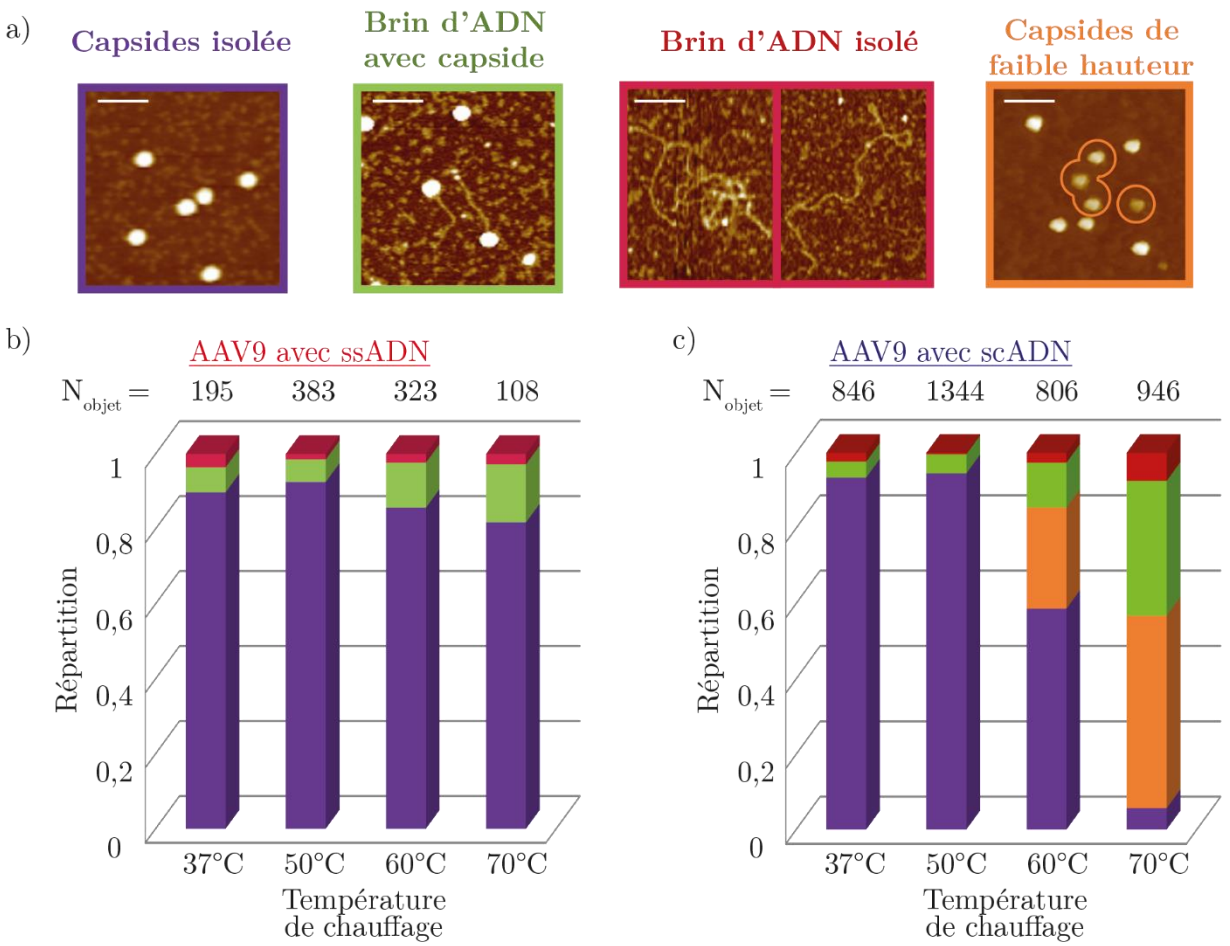


figure 4.27 - Comparaison des scénarii d'éjection de l'ADN pour les deux capsides ssAAV9 et scAAV9.
a) Quatre familles ont été sélectionnées : les trois déjà utilisées, les capsides intactes (en violet), les systèmes mixtes {capside + ADN} (en vert), les brins d'ADN isolés (en fushia) et une quatrième famille correspondant aux particules de basses hauteurs (en orange) inférieures à 15 nm.
La barre d'échelle sur les images AFM représente environ 100 nm.
Evolution des populations en fonction de la température (pour une incubation de 15 min) pour b) ssAAV9 et c) scAAV9.

Si l'on s'intéresse à ce qui se trouve à faible distance de la surface, certains brins d'ADN sont éjectés dès 37°C pour les deux types de virus. Pour mieux quantifier la déstabilisation, nous avons de nouveau réparti « à l'œil», pour chaque chauffage réalisé, les différents objets sur la surface en quatre familles : les capsides intactes, les capsides connectées à un brin d'ADN, les brins d'ADN isolés et finalement les capsides de hauteur inférieure à 15 nm (figure 4.27). Le désassemblage des capsides scAAV9 commence dès 60°C avec l'apparition des objets de taille inférieure à 15 nm et l'augmentation des structures {capside + ADN} et s'amplifie à 70°C. Alors que la déstabilisation est faiblement progressive pour les virus ssAAV9, elle est plus rapide pour scAAV9 avec une température caractéristique de déstabilisation autour de 60°C.

Etant donné le nombre important de capsides présentes sur la surface, nous avons utilisé pour chacune de ces températures le programme d'analyse morphologique. La figure 4.28 représente les cartes de corrélations diamètre équivalent à mi-hauteur en fonction de la hauteur associées à ssAAV9 et à scAAV9 pour différentes températures. En ce qui concerne le scAAV9, dès 50°C, une partie de la population des objets voit sa taille réduite autour de 13 nm, chose qui nous a échappé sur le relevé « à l'œil ». A 60°C, les capsides ont une hauteur moyenne de 12,21 ± 0,02 nm. A 70°C, la tendance s'accroit avec une hauteur moyenne de 9,98 ± 0,02 nm. Cette tendance n'est pas observée si on regarde les cartes de corrélation associées à ssAAV9 (voir Chap. 4.II.3, figures 4.15 et 4.28).

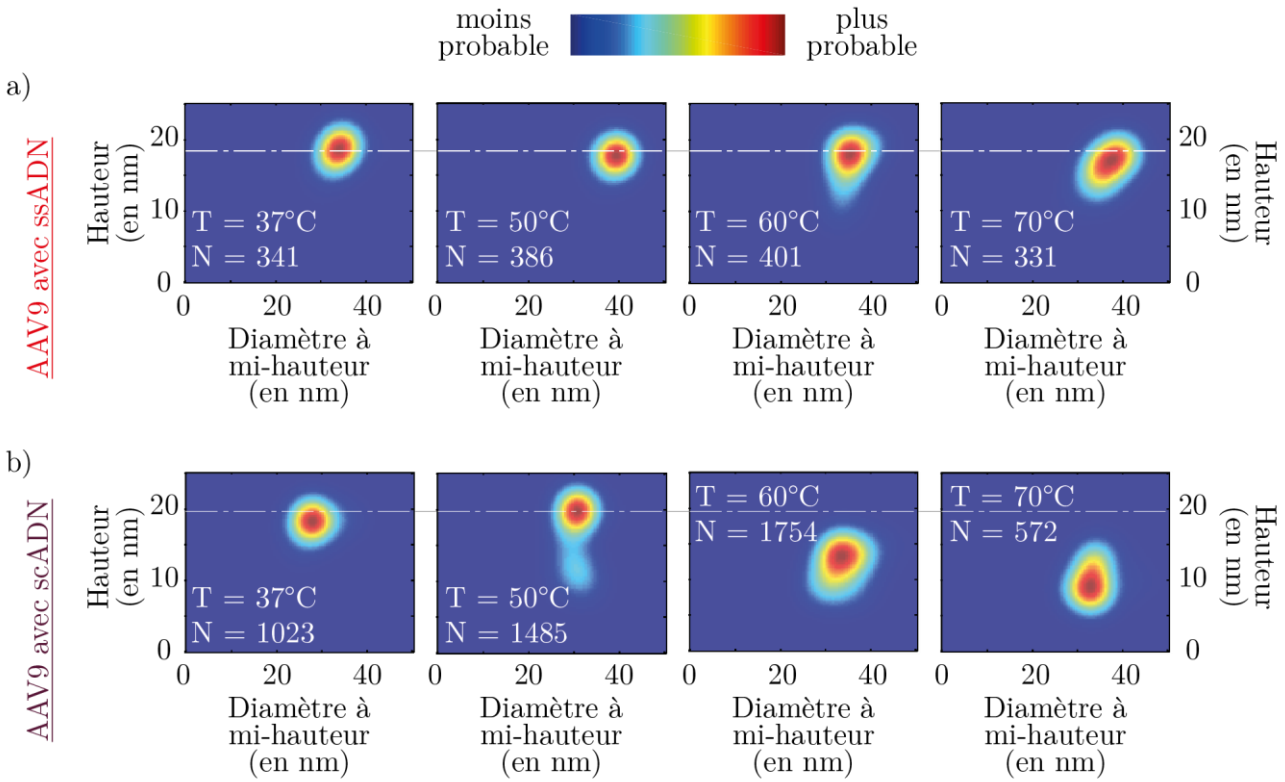


figure 4.28 - Evolution de la morphologie des capsides AAV9 en fonction de la nature du génome.
Carte de corrélation hauteur-diamètre à mi-hauteur pour
a) ssAAV9 (ssADN de 3700 bases).
b) scAAV9 (scADN de 2300 paires de bases).

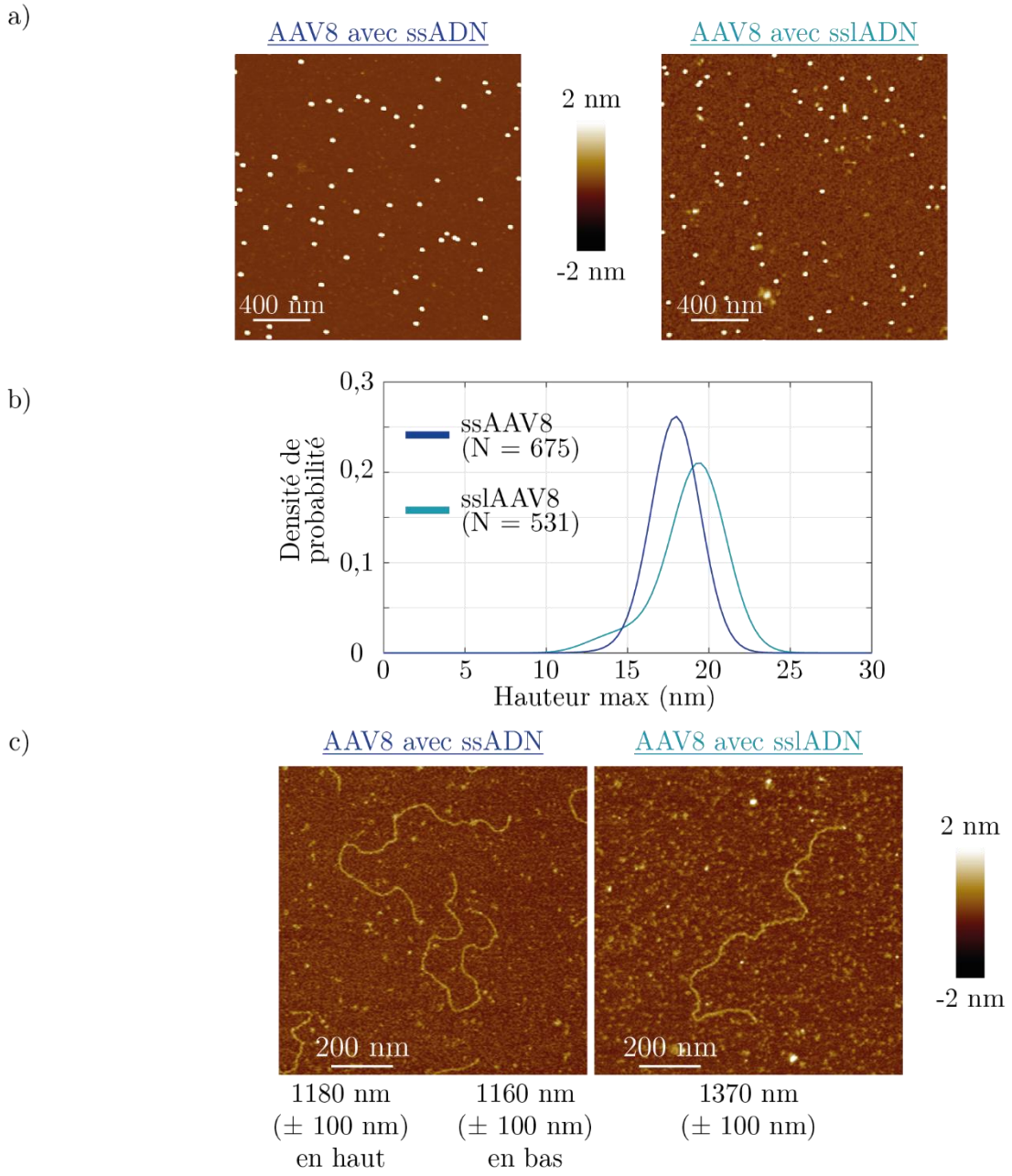


figure 4.29 - Capsides AAV8 contenant un ADN simple brin court (1250 nm - ssADN) ou simple brin long (1600 nm - sslADN).
a) Image par AFM dans l'air (en *mode Peak Force*) avec un levier Scan Assyst HR de capsides ssAAV8 (à gauche) et sslAAV8 (à droite).
b) Comparaison des densité de probabilité de la hauteur des particules ssAAV8 (en bleu nuit - N = 675) et sslAAV8 (en bleu canard - N = 531).
c) Image de dépôts de capsides après chauffage à plus de 80°C des capsides. Les brins d'ADN peuvent être isolés sur la surface. On peut différencier les deux types de brins par leurs longueurs indiquées en dessous des images.

Il semblerait donc que les capsides scAAV9 contenant un ADN de type *self-complementary* libèrent plus facilement leurs génomes que les capsides ssAAV9 contenant un ADN simple brin.

2. Effet de la longueur du génome : ssAAV8 vs sslAAV8

Nous nous sommes intéressés par la suite à l'effet de la longueur du génome en comparant les capsides AAV8 contenant soit de l'ADN simple brin de 3700 bases soit de l'ADN simple brin de 4700 bases.

La figure 4.29.a représente un dépôt de ssAAV8 et de sslAAV8 sur la surface de mica. On observe un nombre important d'objets. Par contre la surface de sslAAV8 est extrêmement bruitée par la présence de débris. L'utilisation du programme de mesure automatique des longueurs est donc peu efficace.

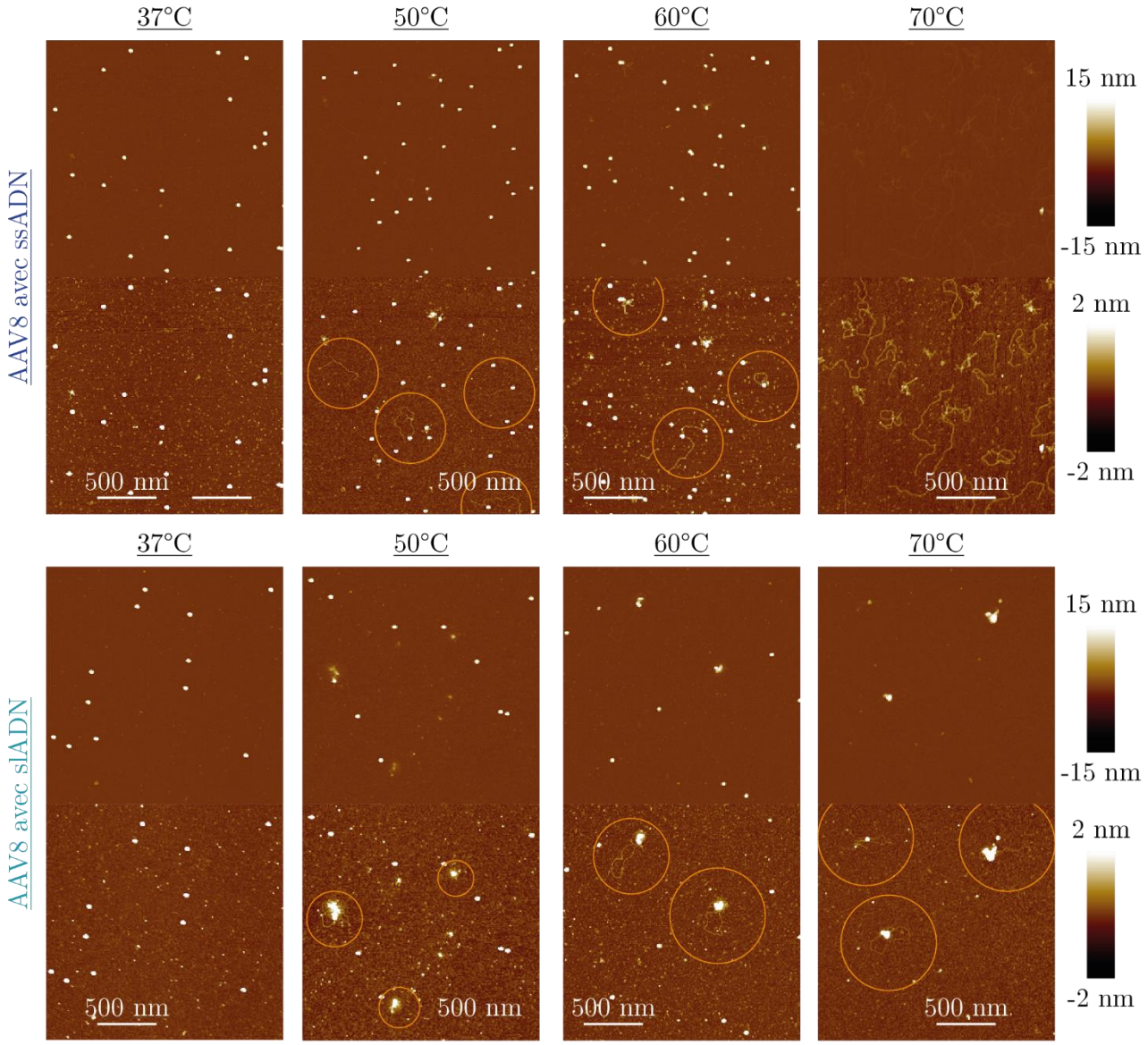


figure 4.30 - Images des dépôts de capsides ssAAV8 (en haut) et de sslAAV8 (en bas) après chauffage pendant 15 minutes à différentes températures.
La solution tampon d'incubation lors du chauffage est le PBS$^+$.
Les images sont obtenues dans l'air en mode *Peak Force* (levier ScanAssyst HR).
L'éjection de l'ADN intervient à partir de la même température mais semble mener plus facilement à des agrégats dans le cas de sslAAV8.

Après avoir chauffé à 80°C, on observe sur le dépôt réalisé, le génome initialement contenu à l'intérieur de la capside. Les mesures « à la main » de la longueur moyenne des simples brins donnent un bon ordre de grandeur pour les deux types d'ADN. A l'instar de scAAV9 par rapport à ssAAV9, la hauteur de sslAAV8 (h_{moy} = 18,91 ± 0,03 nm) est statistiquement supérieure à celle de ssAAV8 (h_{moy} = 17,91 ± 0,03 nm), suggérant qu'une augmentation du volume de la capside lorsque la quantité d'ADN encapsidé, comme on l'avait observé pour scAAV9 en comparaison à ssAAV9.

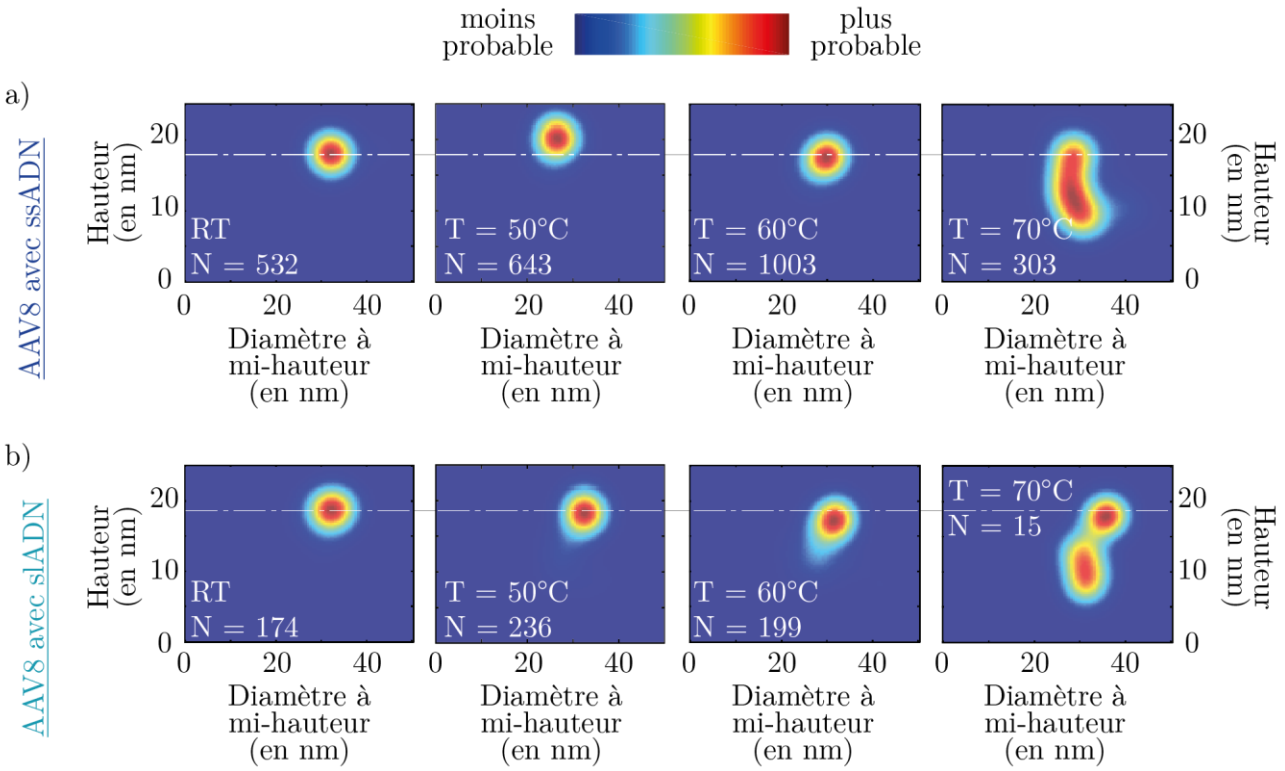


figure 4.31 - Evolution de la morphologie des capsides ssAAV8 (en haut) et sslAAV8 (en bas) en fonction de la température de chauffage.
Carte de corrélation entre le diamètre à mi-hauteur et la hauteur des capsides.
La température ambiante est de 23°C.
Après 70°C, deux types de populations, pour ssAAV8 et sslAAV8, apparaissent avec des hauteurs autour de 18 nm (population présente pour les températures inférieures) et une autour de 12 nm.

Une mesure de la stabilité thermique entre les deux types de capsides a également été faite. Les résultats sont résumés sur la figure 4.30 qui regroupe des images des différents dépôts. Bien que certaines capsides commencent à éjecter de l'ADN à partir de 50°C dans les deux cas, les capsides sslAAV8 semblent rapidement s'agréger pour de plus hautes températures. Peu d'ADN est libéré entièrement mais de nombreuses structures mixtes {capsides agrégées + ADN} sont visibles. En comparaison avec les capsides ssAAV8, une moins importante quantité d'ADN libre est déposée sur la surface.

Devant cette agrégation importante, il est difficile de réaliser une répartition des différents objets selon les trois ou quatre familles proposée dans les paragraphes précédents (Chap. 4.I.4 et Chap. 4.IV.1). Nous avons cependant réalisé une analyse statistique de la morphologie des objets sur la surface. Dans le cas des

températures les plus élevées (supérieures à 60°C), les agrégats n'ont pas été sélectionnés (puisque leur aire sur la surface est beaucoup trop grande pour passer le filtre d'aire).

Les cartes de corrélation du diamètre à mi-hauteur en fonction de la hauteur des capsides sont représentées sur la figure 4.31. Hormis une légère variation de la hauteur caractéristique pour ssAAV8 et sslAAV8 entre 37°C et 60°C, les propriétés morphologiques ne semblent pas être modifiées de manière importante. Il est cependant intéressant de noter qu'une légère dispersion apparait à 60°C pour sslAAV8 vers les faibles hauteurs et diamètres. Cette tendance est confirmée à 70°C avec l'apparition de deux populations de capsides sslAAV8 : l'une autour de 37 nm de diamètre et 18 nm de hauteur et l'autre autour de 33 nm et 10 nm respectivement. Ce décalage en diamètre n'est pas visible sur la carte de corrélation à 70°C associée aux capsides ssAAV8. Cependant, devant le très faible nombre de particules prises en compte pour sslAAV8, ce décalage n'est peut-être pas significatif.

Ainsi, ces expériences préliminaires de déstabilisation ne nous permettent pas de distinguer un comportement significativement différent des deux types de capsides, ssAAV8 et sslAAV8 face à une augmentation de la température en partie à cause de l'agrégation des capsides sslAAV8 chauffées, non observées pour ssAAV8.

3. Discussion

Les expériences présentées s'attachent à analyser l'effet de la nature et de la longueur du génome ADN dans les capsides AAV sur leurs morphologies et leurs stabilités thermiques.

Nous avons ainsi montré que les capsides possédant de l'ADN double brin présentaient une hauteur effective (dans l'air) plus importante que les capsides à ADN simple brin. Cette augmentation de la hauteur moyenne se retrouve pour sslAAV (4700 bases) par rapport à ssAAV (3700 bases). Cette augmentation ne peut se justifier par une modification de la nature des interactions pointe échantillon puis que la surface de la capside est inchangée lorsqu'on compare ssAAV9 avec scAAV9, de même pour ssAAV8 avec sslAAV9. Elle pourrait peut-être s'interpréter comme un effet de la quantité d'ADN présente à l'intérieur de la capside entrainant un gonflement de la structure protéique sous l'effet d'une pression interne plus importante. Il serait intéressant de tester d'un point de vue mécanique la réponse de la capside à une déformation et la mesure de la rigidité avec la constante de raideur.

Quant à la stabilité thermique, si elle ne semble pas être affectée par une plus grande longueur d'ADN simple brin, elle semble moins importante pour les scAAV que pour les ssAAV. Ce dernier résultat est en opposition avec les travaux de déstabilisation thermique mesurée par fluorescence de l'équipe de A. Asokan montrant que la libération du génome nécessite des températures plus élevées dans le cas d'un ADN *self complementary* que d'un simple brin (Horowitz et al. 2013). Alors que nous proposons une étude par molécule unique, les expériences proposées dans cette équipe sont de la fluorométrie, donc une mesure moyenne. Ces deux types d'approche peuvent peut-être justifier la différence observée.

Une justification possible à ces écarts morphologiques et ces mesures de la stabilité thermique pourrait être l'importante pression interne pouvant exister au sein d'une capside scAAV, plus faible que celles au sein de ssAAV ou de sslAAV qui seraient très proches.

En effet, pour un ADN simple brin de 3700 bases, la longueur de persistance l_p du simple brin étant d'environ de 2 nm (Chen et al. 2012), on aurait une fraction volumique de 18 % pour un rayon de giration de 22 nm soit une sphère d'un volume 8 fois plus grande que le volume accessible à l'intérieur de la capside (voir Chap. 1.IV.3). Dans le cas d'un ADN simple brin de 4700 bases, la fraction volumique est de 23 % pour un rayon de giration de 24 nm ce qui représente une sphère d'ADN de volume 11 fois plus grande que la capside.

Si le génome est un ADN double brin de 2300 paires de bases, il occuperait en suspension dans une solution tampon un volume beaucoup plus important à cause de la rigidité accrue d'un ADN double brin ($l_p \simeq 50$ nm) par rapport à un ADN simple brin. Son rayon de giration est en effet d'environ 81 nm (voir Chap. 1.IV.2 et Chap. 1.IV.3), soit huit fois plus grand que la capside AAV, ce qui représente en volume un facteur supérieur à 400. Cette dimension doit être en plus sous-estimée si on considère en plus la répulsion interne du fait de la charge négative tout le long du polymère occasionnant une forte répulsion.

Alors que le volume de giration est sensiblement inchangé lorsqu'on augmente la longueur du génome simple brin de 1000 bases, il est multiplié par 40 lorsqu'on considère un ADN double brin. Ainsi la pression interne qui en résulte pourrait être une justification de la moins grande stabilité des capsides possédant un ADN double brin face aux capsides contenant un ADN simple brin. Avoir accès à une mesure de la pression interne aiderait à la compréhension du désassemblage de la particule.

V. Pressurisation dans la capside AAV : le sérotype AAV2

Lors de l'assemblage d'un virus, l'encapsidation du génome peut se faire selon deux scénarios :

- Soit les protéines formant la capside protéique s'assemblent autour du génome. C'est ainsi le cas du VIH-1 (voir Chap. 1.III).
- Soit la capside protéique s'auto-assemble vide, et le génome est ensuite inséré à l'intérieur. Ce scénario est celui suivi par l'AAV (Timpe et al. 2005) : Les protéines Rep reconnaissent les parties ITR du génome et grâce à leur activité ATPase et hélicase, elles seraient capables de forcer l'incorporation de l'ADN simple brin dans la capside à travers le pore présent au niveau de l'axe de symétrie 5. La puissance développée par ce moteur moléculaire permettrait de contrer la pression interne ayant tendance à s'opposer à la compaction de l'ADN à l'intérieur de la capside, en particulier s'il se trouve sous sa forme double brin.

Dans le cas de l'ADN *self complementary*, le mécanisme d'incorporation n'a pas été encore étudié.

L'encapsidation du génome AAV n'a cependant jamais été étudiée par des méthodes physiques en comparaison à d'autres virus comme les bactériophages (voir Chap. 1.II.). L'équipe de W. Gelbart a mis au point une expérience pour mesurer la pression interne dans ces virus de bactérie via le contrôle de la pression osmotique en jouant sur la concentration en longs polymères dans l'environnement des bactériophages (Evilevitch et al. 2003). Cette expérience a ensuite été adaptée à des virus humains comme HSV (*herpès simplex virus*) par l'équipe d'Alex Evilevitch (Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Etats Unis) en utilisant des approches optique mais aussi biochimique (Bauer et al. 2013).

Une collaboration a été initiée entre notre équipe et celle d'Alex Evilevitch, lors d'un séjour de trois mois à Pittsburgh, pour adapter les protocoles, mis en place lors des mesures sur HSV, à l'étude de la pression interne dans les capsides AAV.

Dans cette partie, nous exposerons les différentes expériences que j'ai réalisées dans le but de déterminer la pression interne dans les capsides AAV. L'étude a concerné les capsides scAAV2 contenant un génome double brin *self complementary* de 2300 paires de bases (Voir Chap. 1.IV). En effet, après les estimations faites sur AAV9 (voir Chap. 4.IV) et la compaction de l'ADN à l'intérieur, nous nous attendions à mesurer une pression interne importante. Se reposant uniquement sur des concepts physiques, le fait d'utiliser le sérotype 2 au lieu du 9 ne devrait pas être un problème puisque les dimensions du génome et de la capside sont les mêmes.

1. Température d'éjection de l'ADN : une étude par AFM

L'expérience de mesure de la pression interne nécessite l'éjection contrôlée du génome tout en conservant la structure globale de la capside intacte. Nous avons vu que la température était l'un des moyens possibles. Cependant, comme expliqué dans la première partie (Chap. 4.I.4.), l'ADN semble sortir de la capside soit par un pore (scénario qui nous intéresse ici) soit par le désassemblage de la capside (scénario parasite). Nous avons ainsi privilégié dans un premier temps une approche biochimique en s'inspirant des expériences sur HSV (Bauer et al. 2013). La trypsine, une protéase, est capable d'enlever le *portail protéique* de la capside

d'HSV (position du moteur permettant l'incorporation du génome viral lors de la formation de la particule), créant un trou dans la structure où l'ADN peut sortir (Newcomb et al. 2007) sans destruction de la capside. Cependant cette protéase agit sur les capsides AAV à différents endroits (Van Vliet et al. 2006) menant au désassemblage complet de la structure (c'est ce que nous avons observé par AFM pour des capsides AAV traités par la trypsine – données non montrées). La température a donc été le paramètre choisi pour initier l'éjection de l'ADN.

S'agissant d'un nouveau sérotype (scAAV2), il fallait déterminer la température de début de sortie de l'ADN. Nous avons, pour cela, réalisé un nouveau protocole de chauffage adapté au matériel présent à Pittsburgh et aux expériences futures (figure 4.32). Comme nous l'avons souligné précédemment (Chap. 4.I.2), les ions Mg^{2+} créent des ponts entre différentes parties de la chaine ADN, menant à une compaction importante du polymère. Pour voir l'effet des ions divalent sur l'ADN et donc sur la pression interne, nous avons utilisé, pour l'échantillon de contrôle, un tampon de type TE, contenant 1 mM d'EDTA. Ce ligand chélate fortement les ions Mg^{2+} supprimant la concentration d'ions divalents libres dans la solution.

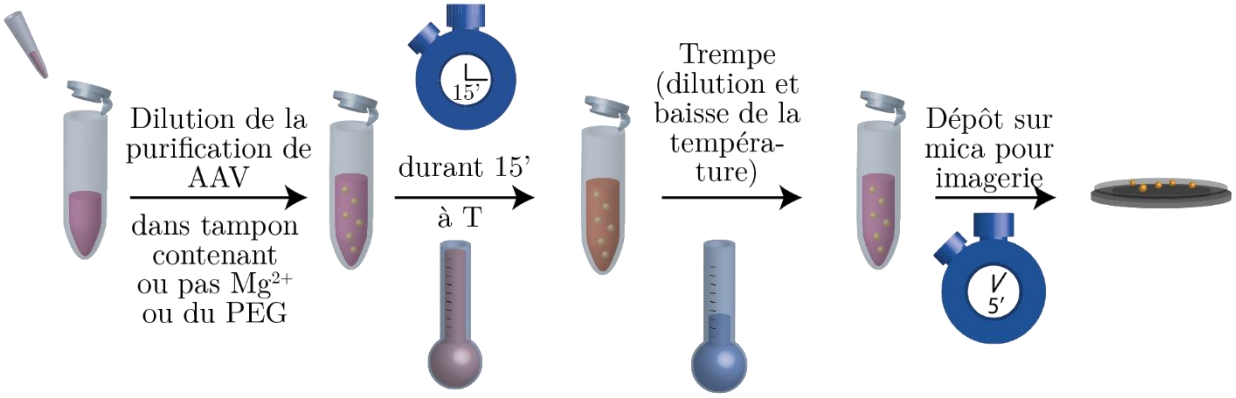


figure 4.32 - Protocole de destabilisation de scAAV2 pour l'étude de l'éjection de l'ADN et de la pression interne.
La dilution dans la solution tampon TE (dans certaines expériences, en présence de Mg^{2+} ou de polymère PEG) est ensuite suivie du chauffage à une température T des capsides puis d'une trempe.
L'échantillon obtenu est ensuite utilisé pour des expériences d'AFM, de diffusion de lumière ou d'électrophorèse.

La détermination de la température d'initiation de l'éjection d'ADN s'est faite grâce à différentes images obtenues par AFM. Après le dépôt de 5 minutes sur une surface de mica selon le protocole habituel (voir Chap. 2.II.3), les échantillons sont observés par AFM, en *mode Tapping* avec des leviers MPP11100.

Les images de la figure 4.33 résument les résultats du chauffage des capsides pour différentes températures. Il apparait qu'une partie des capsides éjectent leur génome dès 45°C comme l'indique la présence de filaments sur la surface de mica. Le chauffage semble également conduire à la formation d'agrégats de capsides pour des températures supérieures à 50°C. Jusqu'à 60°C, la présence de capsides présentant des hauteurs supérieures à 15 nm, considérées comme intactes, sont encore observées. A cette température, le pH de la solution TE passe de 7,7 à 7,2 laissant le milieu neutre.

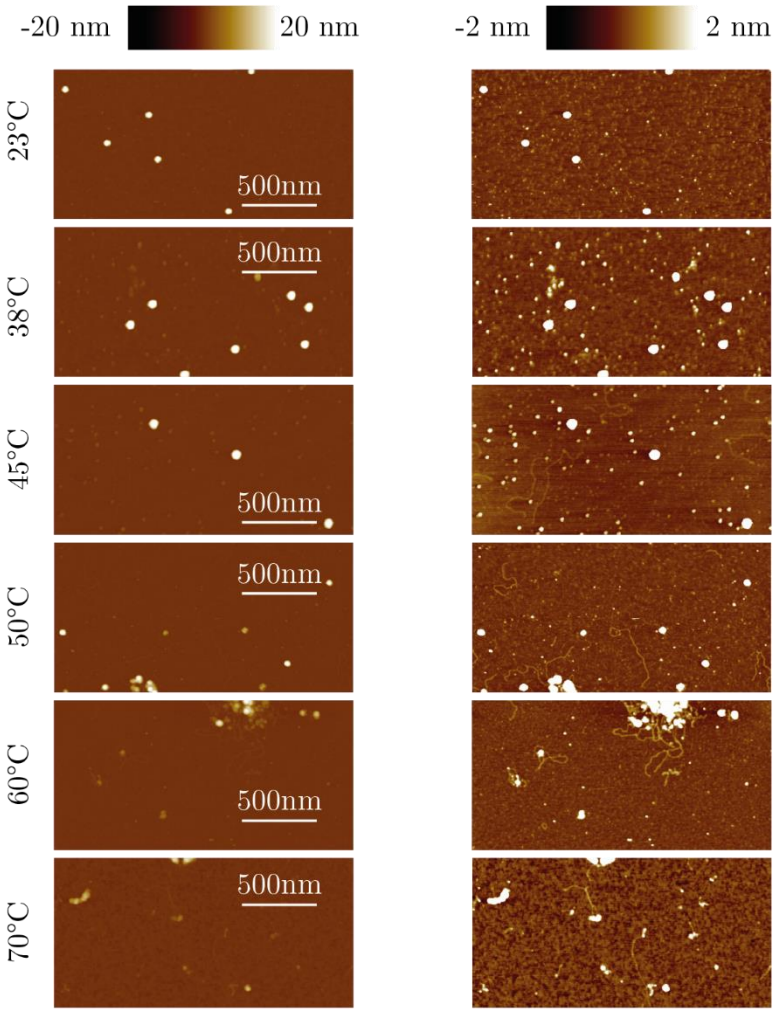


figure 4.33 - Images des dépôts de capsides scAAV2 après chauffage pendant 15 minutes à différentes températures.
La solution tampon d'incubation lors du chauffage est le TE. Les images sont obtenues dans l'air en mode *Tapping* (levier MPP11100). L'éjection de l'ADN a lieu dès 45°C.

2. Influence de la concentration en magnésium : une étude par SLS

Sous l'incidence d'un faisceau laser, les particules vont diffuser la lumière selon différentes directions. L'intensité de la lumière diffusée dépend donc de l'angle d'observation mais également de la dimension des particules diffusantes. On parlera alors de différents régimes : celui de Rayleigh lorsque les particules sont de dimensions très inférieures à la longueur d'onde de la lumière incidente (dans le visible la plupart du temps, quelques centaines de nanomètres), de Mie (ou de Tyndall selon la géométrie) lorsque elles sont de l'ordre de grandeur ou plus grandes que λ. Ces différents modèles coïncident dans leurs cas limites.

Le système de mesure de la diffusion utilisé est le Zetasizer Nano (Malvern Instruments). L'échantillon est placé dans une cellule rectangulaire en verre de 10mm de côté (*Starna Cells*). Le laser incident, de longueur d'onde 542 nm (vert), fait un angle de 175° par rapport au capteur. On parle de mesure de rétrodiffusion.

L'expérience a consisté à suivre l'intensité totale diffusée par les particules selon une direction précise au court du temps, la température du milieu augmentant par palier de 1°C toutes les 15 minutes.

Après dilution de capsides scAAV2 dans une solution tampon TE, nous avons placé la solution dans la cuve transparente de côté 1 cm se trouvant sur le chemin d'un faisceau laser. La température initiale est de 30°C. L'intensité de la lumière diffusée est mesurée par un capteur photoélectrique (figure 34) placé selon un

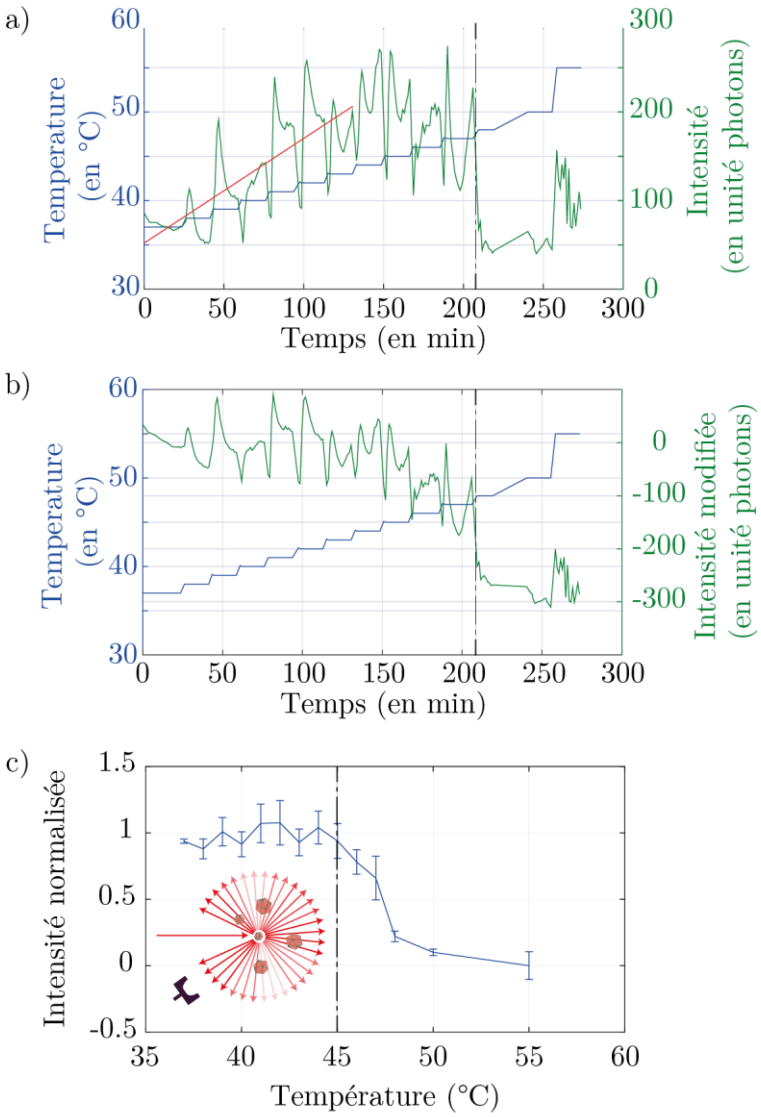


figure 34 - Diffusion de la lumière sur des capsides scAAV2.
Les capsides scAAV2 sont diluées dans du TE puis placées sur la direction d'un laser (λ = 542 nm). Le milieu est ensuite chauffé par palier de 15 minutes. Pendant cet intervalle de temps, l'intensité diffusée est mesurée pour un angle de 175° par rapport à la direction initiale du laser.
a) Intensité diffusée à 175° (en vert) et température du milieu (en bleu) en fonction du temps de l'expérience. L'augmentation de la température s'accompagne d'une augmentation linéaire naturelle de l'intensité diffusée.
b) La soustraction de la tendance croissante (ajustement rouge sur la courbe figure 34.a) mène à cette courbe. On voit une forte diminution à partir de 200 minutes. Cette baisse est initiée à partir de 150 minutes.
c) Intensité normalisée en fonction de la température du milieu. La normalisation se fait en considérant les paliers minimum et maximum de l'intensité modifiée. La diminution intervient pour 45°C. Le milieu ne diffuse plus autant la lumière dans la direction à 175° sous l'effet de diffusions multiples (mélange brins ADN et capsides) et/ou de modification importante des centres diffusifs (agrégation des particules par exemple).

angle de 175° par rapport au faisceau incident, pour chacune des températures pendant les 15 minutes du chauffage. Au début de l'expérience, l'intensité moyenne diffusée augmente progressivement en fonction de la température. Cette augmentation est un biais apporté par le chauffage de la solution. Après 200 minutes, elle chute fortement, ce qui correspond à une température de 48°C.

Nous retrouvons ainsi la température de début d'éjection de l'ADN observée par AFM. Cette diminution de l'intensité peut s'expliquer par le changement du milieu : en effet, la solution est toujours une solution tampon de virus en suspension mais avec en plus de l'ADN double brin (éjectée de certaines particules) et des agrégats de virus (occasionnés par le chauffage). La diffusion n'est plus la même qu'à l'instant initial ce qui mène à une décroissance de l'intensité lumineuse captée selon la direction fixée par le capteur.

Pour mieux observer la baisse de l'intensité, on soustrait de la courbe la tendance croissante (droite rouge sur la figure 34.a) puis on trace l'intensité normalisée en fonction de la température de chauffage (figures 34.b et 34.c). La diminution de l'intensité débute vers 150 minutes, ce qui correspond à une température de 45°C. La mesure par SLS est donc en adéquation avec les expériences de chauffage par AFM.

Ce dispositif nous permet de changer facilement l'environnement. Nous avons ainsi réalisé l'expérience d'éjection en ajoutant des ions divalents Mg^{2+} à différentes concentrations (figure 4.35.a). L'ajout de Mg^{2+} pour atteindre une concentration de 2 mM n'amène pas de changement significatif de la température

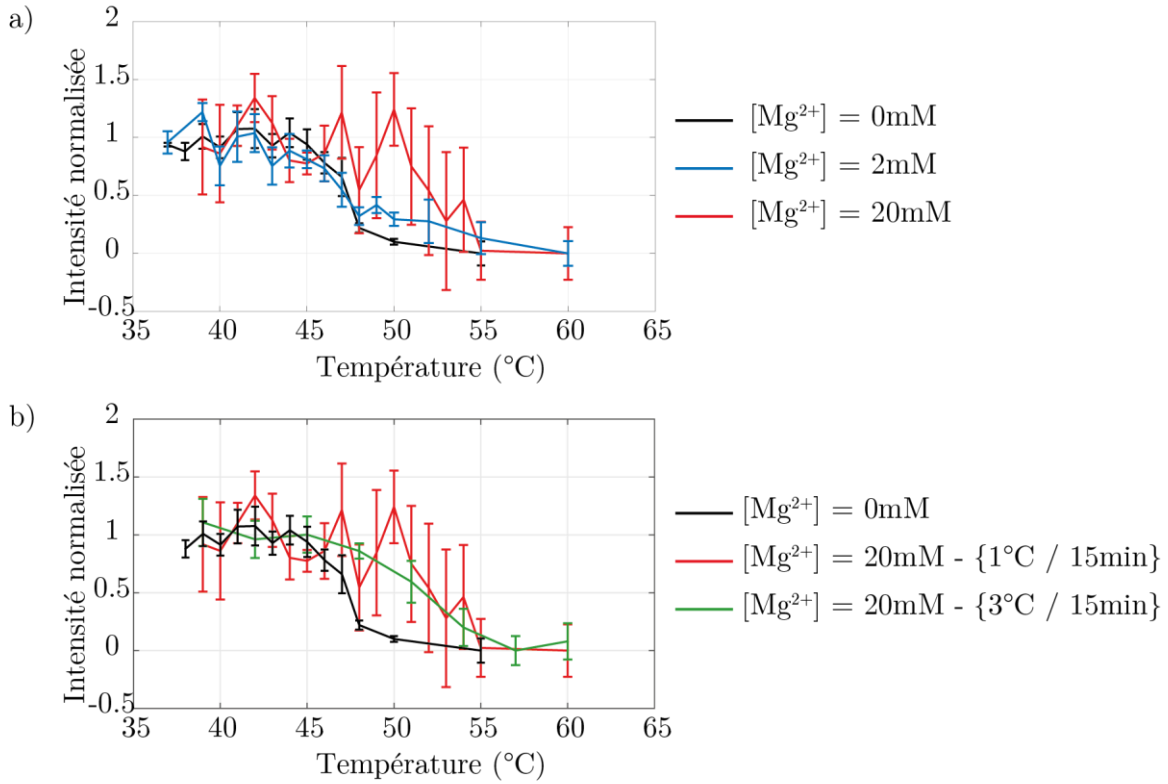


figure 4.35 - Effet du magnésium lors du chauffage des particules scAAV2.
a) Intensité normalisée diffusée en fonction de la température de capsides scAAV2, diluées dans différents tampons : TE (en noir), TE avec Mg^{2+} (2 mM) (en bleu) et TE avec Mg^{2+} (20 mM) (en rouge). Une grande concentration en magnésium décale la décroissance rapide vers de plus hautes températures.
b) Intensité normalisée diffusée en fonction de la température de capsides scAAV2, diluées dans le tampon avec Mg^{2+} pour deux cinétiques : 1°C toutes les 15 minutes (en rouge) et 3°C toutes les 15 minutes. La cinétique ne semble pas modifier la tendance observée plus haut.

d'éjection. Par contre lorsque [Mg^{2+}] = 20 mM, l'éjection du génome nécessite d'atteindre des températures plus importantes, autour de 50°C pour le début et 55°C pour atteindre un nouveau plateau. La cinétique de chauffage (1°C toutes les 15 minutes ou 3°C toutes les 15 minutes) ne semble pas modifier cette observation (figure 4.35.b).

Plusieurs phénomènes pourraient expliquer nos résultats. Le premier est qu'à cause de la présence d'ions divalents Mg^{2+}, la formation d'agrégats serait accélérée sous l'effet de la température. Les édifices formés seraient alors plus stables face à une élévation de la température. Le deuxième est que le magnésium en solution modifie l'interaction entre l'ADN et l'intérieur de la capside la rendant plus stable. La dernière hypothèse est une réduction de la pression interne sous l'effet d'une plus grande compaction de l'ADN double brin. Les ions Mg^{2+} créent entre différentes parties du brin chargé négativement sur toute sa longueur des ponts les rapprochant les uns des autres. Pour tester cette hypothèse, nous avons donc mis en place l'expérience de mesure de la pression interne.

3. Mesure de la pressurisation dans la capside AAV

L'expérience consiste à détecter l'ADN protégé par la capside, après éjection partielle du génome lors d'une déstabilisation. Cette mesure est impossible par l'imagerie AFM qui ne permet d'observer que la surface de l'échantillon. L'expérience repose alors sur une méthode biochimique. Nous avons tout d'abord mis en place le protocole s'appuyant sur des électrophorèses qui est décrit dans la figure 4.36.a et nous l'avons confronté aux résultats obtenus précédemment (Chap. 4.V.1 et Chap. 4.V.2).

Les virus scAAV2 produits sont diluées vingt fois dans une solution TE avec ou non présence d'ions Mg^{2+} à 20 mM puis mis à chauffer pendant 15 minutes à différentes températures.

Après une trempe thermique à 4°C, un traitement à la benzonase est ensuite réalisé avec ajout de magnésium (concentration finale 5 mM). Cette protéine digère l'ADN accessible, qu'il soit simple brin ou double brin (Nony et al. 2003). Il reste ainsi les capsides et la partie de leur génome protégé à l'intérieur de la capside.

Le mélange, dont l'ADN précédemment protégé dans la capside, est ensuite récupéré et placé dans un puits se trouvant sur un gel d'agarose. L'application d'une différence de potentiel occasionne une migration de l'ADN. La vitesse de migration dépend de sa longueur totale. Au bout d'un temps t fixé, la position sur le gel de l'ADN est obtenue en utilisant un intercalant fluorescent (comme le *SybrGold*). Préalablement, l'un des puits non utilisé est rempli par une solution contenant une échelle d'ADN de longueurs étalonnées (ou *ladder*). Après ce temps t, les brins ayant migré plus ou moins vite selon leurs tailles sont visibles sous la forme d'une bande fluorescente dont la détection permet de remonter facilement à la longueur du génome resté à l'intérieur de la capside, non digéré.

La figure 4.36.b présente l'un des gels réalisés pour tester l'effet des ions divalents Mg^{2+}. Trois expériences ont été réalisées : La première est le chauffage des capsides, suspendues dans la solution TE, à 60°C pendant 15 minutes. Le deuxième échantillon n'a pas été chauffé. La troisième expérience a consisté au chauffage des capsides diluées dans une solution de TE avec des ions Mg^{2+} à 20 mM, à 60°C pendant 15 minutes.

Dans le premier cas, l'absence de signal signifie qu'à cette température dans le TE toutes les capsides ont libéré leurs génomes. La benzonase a digéré tout l'ADN accessible. Dans le deuxième cas, il s'agit d'un contrôle. La présence d'un signal fluorescent signifie que la benzonase n'a pas digéré d'ADN dans les capsides non endommagées. Sa position est à 2300 paires de bases, représentant la longueur du génome scAAV2. Dans le troisième cas, en présence des ions Mg^{2+}, la présence d'un signal d'intensité plus faible que le contrôle à la position 2,3 kpb signifie que toutes les capsides n'ont pas libéré leurs génomes à 60°C. Par contre, il n'y a pas eu d'éjection partielle du génome sinon il y aurait un signal pour des longueurs d'ADN inférieures (sur la droite de la bande à 2,3 kpb).

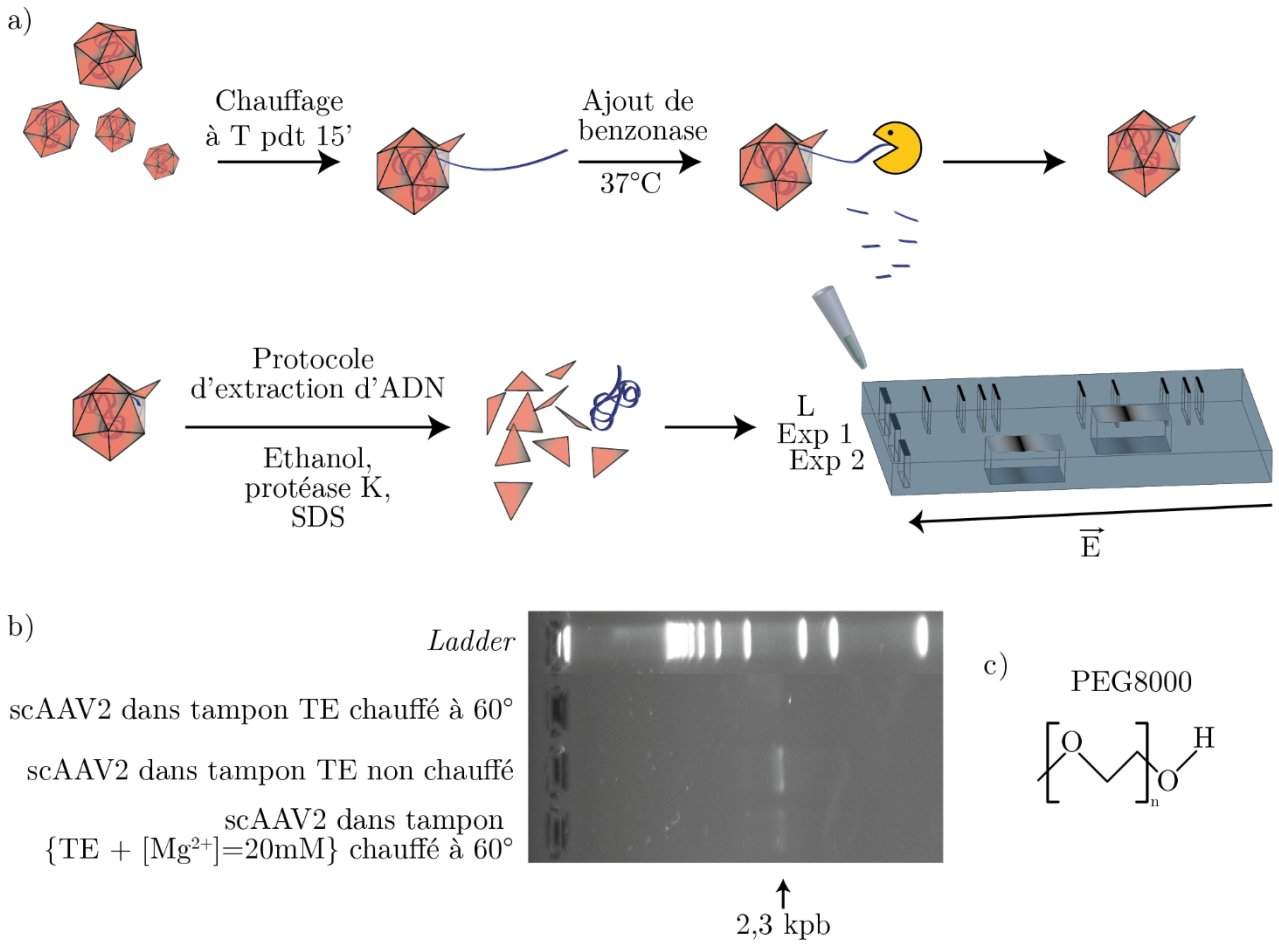


figure 4.36 - Protocole de l'expérience de déstabilisation étudiée par électrophorèse.
a) Principe simplifié de l'expérience. Sous l'effet d'une élévation de la température, une partie plus ou moins importante du génome sort de la capside. L'ajout de benzonase (une enzyme digérant l'ADN simple ou double brin) et son activation par un chauffage à 37°C détruit la partie extérieure du brin d'ADN. Les capsides sont ensuite soumises à un protocole d'extraction du génome protégé dans la capside. L'ADN est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose ce qui permet de mesurer la longueur des brins d'ADN libres et rendus fluorescents grâce à une molécule (*SybrGold®* ou *SybrGreen®*) intercalante.
b) Expérience typique d'électrophorèse. L'échelle (ou *ladder*) est un mélange de brins d'ADN de différentes longueurs calibrées permettant de mesurer la longueur de l'ADN correspondant à une bande détectée. Un signal est observé seulement pour les expériences de scAAV2 dans un tampon TE non chauffé et dans un un tampon TE en présence d'ions Mg^{2+} chauffé à 60°C.
c) Formule chimique du PEG8000 ($n \simeq 160$)

En présence de polymères neutres dans la solution, une pression, appelée osmotique, dont l'origine est la différence de concentration des longues chaines entre le milieu extérieur et l'intérieur de la capside, s'exerce sur la paroi externe de la capside. Opposée à la pression interne, elle empêche partiellement ou totalement la sortie spontanée du génome de la capside ouverte : plus la concentration extérieure en polymère croit, plus la pression osmotique augmente jusqu'à équilibrer la pression interne.
Le polyéthylène glycol est un polymère neutre de masse moléculaire 8000. Sa taille doit être suffisamment grande pour ne pas entrer dans la capside. De plus, l'absence de charge du polymère est une nécessité expérimentale pour que seule la pression osmotique intervienne. La relation empirique reliant la concentration en PEG w dans la solution, exprimée en pourcentage massique, à une pression osmotique Π s'exerçant sur la capside est (Evilevitch et al. 2003) :

$$\Pi(atm) = -1{,}29G^2T + 140G^2 + 4G \tag{4.1}$$

où $G = \frac{w}{100-w}$ et T est la température (en °C)

Les vecteurs scAAV2 sont maintenant dilués dans une solution TE contenant une certaine concentration w de PEG. Le chauffage des capsides à une certaine température initie l'éjection d'une partie de l'ADN à l'extérieur de la capside jusqu'à ce que la pression interne s'égalise avec la pression osmotique maitrisée par la concentration en PEG8000 si présent.

L'utilisation de PEG dans le milieu rend difficile l'observation du signal d'ADN du fait de la viscosité de la solution et de la faible quantité d'ADN. Pour améliorer la précision de la mesure et l'intensité du signal, plusieurs modifications au protocole ont été apportées. Tout d'abord, seul l'ADN protégé lors du chauffage est déposé dans le puits. Une suite de lavages permet de séparer l'ADN des protéines de capsides, PEG et débris. Ensuite, les brins d'ADN ayant migré dans le gel sont transférés sur une membrane de nylon qui est hybridée avec une sonde ADN spécifique du génome AAV et couplée à la Digoxigenine (DIG). La fixation de la sonde à la membrane est révélée par incubation avec un anticorps anti-DIG couplé à un substrat luminescent. La luminescence est révélée par autoradiographie. Cette méthode, appelée *Southern Blot*, améliore grandement la sensibilité de détection du signal.

La figure 4.37.a, représente le résultat obtenu après chauffage à 4°C, 55°C, 60°C et 65°C des capsides suspendues dans du TE en l'absence ou en présence de PEG8000 à différentes concentrations, c'est-à-dire exerçants différentes pressions osmotiques.

Les expériences à 4°C nous permettent d'observer la position du génome, à 2300 paires de bases. A cause de la plus grande sensibilité, un autre signal, étendu, est observé pour des longueurs inférieures à la longueur totale. Il correspondrait à un signal d'ADN simple brin. On peut alors penser que les capsides scAAV2 lors de leurs assemblages seraient également capables d'incorporer de l'ADN sous forme simple brin (seule la moitié du génome *self complementary* serait parfois encapsidée). Il est également possible qu'une partie du génome palindromique a été éjectée et digérée par la benzonase, ce qui reste ne peut s'hybrider et reste donc sous forme simple brin. L'observation par AFM, ne permet pas de conclure s'il y a de l'ADN simple brin, ayant une longueur exotique (d'origine cellulaire), qui se trouvent sur la surface. Par contre, nous observons des filaments d'environ 700 nm, correspondant à celle du génome scADN en double brin figure 4.33.

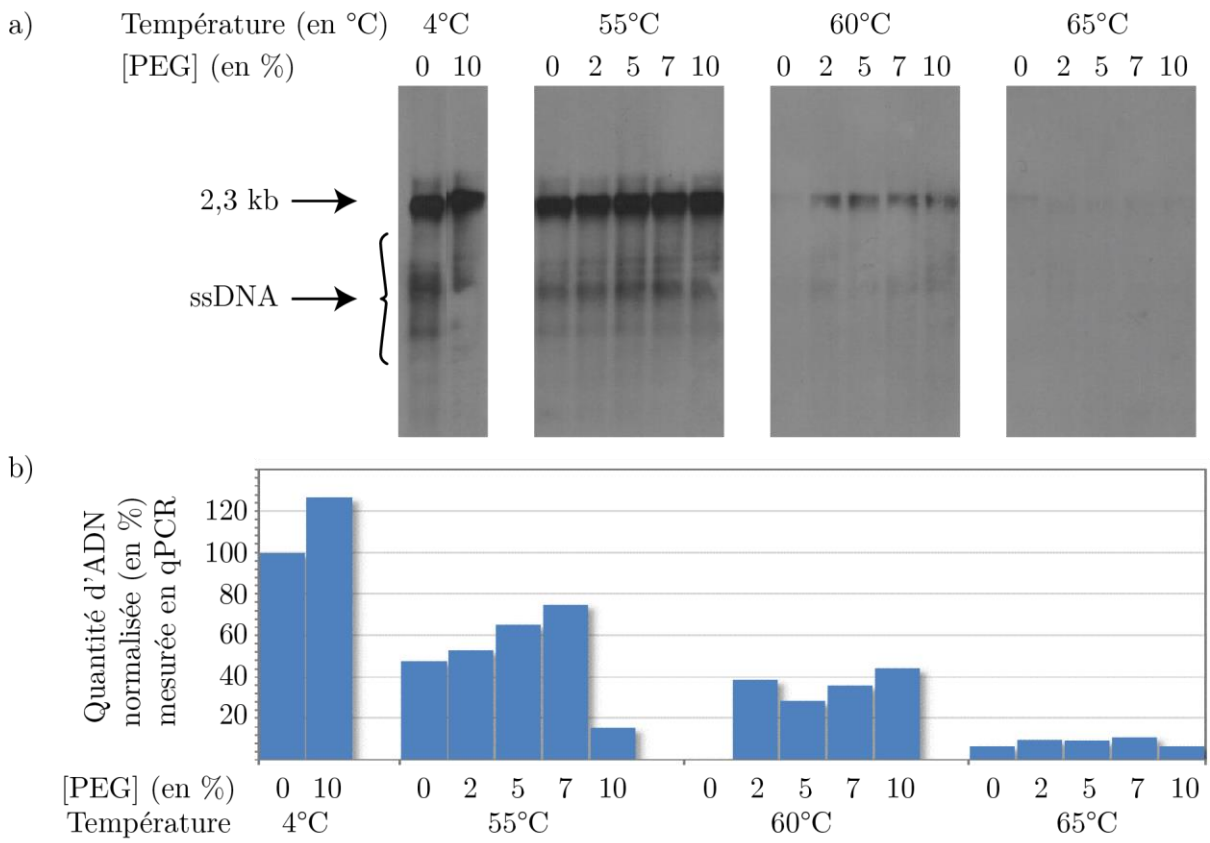


figure 4.37 - Expérience de destabilisation en présence de PEG.
a) Expérience de *Southern Blot* suite au protocole de déstabilisation présenté figure 4.36. L'extraction de l'ADN est légèrement plus complexe pour permettre d'isoler complètement l'ADN des capsides plus ou moins détruites. Un transfert sur membrane est réalisé pour maximiser la sensibilité à l'ADN.
La solution tampon initiale est le TE. Du PEG 8000 a été rajouté en différentes concentrations. Les capsides sont toutes diluées 20x puis chauffées selon le protocole de la figure 4.36.
Pour une température de 55°C, le signal à 2,3 kpb est présent quelque soit la concentration en PEG. Un *smear* est présent pour des longueurs inférieures à 2,3 kpb.
A 60°, le signal à 2,3 kpb est présent dès qu'il y a présence de PEG.
Le signal à 2,3 kpb disparait pour des températures supérieures à 65°C, quelque soit la concentration en PEG.
b) Une qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) permet de mesurer la quantité d'ADN extrait, réalisée par A. Salvetti (CIRI de l'ENS de Lyon).

A 55°C, quelle que soit la concentration en PEG, un signal est observé à 2 300 paires de bases. A 60°C, dès 2% de PEG, le signal à 2300 paire de bases est présent. Par contre, pour 65°C, le signal a quasiment disparu. Seule l'intensité du signal varie selon les conditions expérimentales : il n'y a pas de déplacement des signaux suggérant que seule la bande correspondant à l'ADN double brin intact est visible.

Pour quantifier cette observation, Anna Salvetti a réalisé une qPCR (ou *quantitative Polymerase Chain Reaction*). Cette méthode, reposant sur l'amplification des brins d'ADN par des cycles successifs de duplication à partir d'une partie de l'ADN étudié, permet de mesurer la quantité d'un brin d'ADN précis présent dans un échantillon.

L'histogramme présenté sur la figure 4.37.b représente la quantité d'ADN mesurée pour chaque expérience rapportée à celle obtenue pour la première expérience à 4°C (les capsides sont suspendues dans du TE et ne sont pas chauffées par contre elles sont traitées à la benzonase). Le second pic à 120% suggère qu'en

l'absence de PEG une partie des capsides est détériorée lors du traitement à la benzonase qui nécessite une température de 37°C : le PEG aurait donc un effet protecteur sur la capside lors du chauffage, comme les ions divalents Mg^{2+}.

A 55°C, plus la concentration en PEG augmente, plus la quantité d'ADN conservée intacte dans la capside est importante (sauf pour 10% de PEG). A 60°C, en l'absence de PEG, aucun ADN n'est présent suggérant que tout a été éjecté. Par contre, en présence de PEG, la quantité d'ADN est non nulle, à l'instar des résultats obtenus sur la membrane (figure 4.37.a). A 65°C, on observe une très faible quantité d'ADN. Lorsqu'il n'y a pas de PEG, on peut supposer que le signal mesuré ne représente qu'un bruit de fond.

4. Discussion.

La mesure de la pression interne a été réalisée pour comprendre par les différences observées lors de l'éjection de l'ADN hors des capsides de ssAAV9 et de scAAV9. Pour des raisons techniques, nous avons étudié le sérotype scAAV2.

La présence de PEG dans le microenvironnement semble stabiliser les capsides scAAV2 lors du chauffage, à l'instar du magnésium, comme le confirme les deux premiers pics de la qPCR et l'augmentation des pics observée à 55°C.

A 60°C, il suffit de 2% de PEG pour observer un signal ce qui correspondrait alors à une pression interne ne dépassant pas les 0,1 atm. Cette valeur semble être extrêmement faible si on compare la pression interne dans HSV par exemple qui avoisine les 18 atm et 20 atm dans les bactériophages **λ**.

Plusieurs hypothèses pourraient justifier cette différence de valeur de pression :

Tout d'abord, la structure de la capside après chauffage. Nous avons vu que l'ADN pouvait être éjecté de la capside par un trou. La taille de ce pore doit être inférieure à celle de la benzonase pour qu'elle ne puisse pas pénétrer dans la capside et digérer l'ADN qui se trouve à l'intérieur. Cependant, la présence d'ADN pour des concentrations élevées de PEG et la taille de la protéine (de quelques nanomètres de diamètre – 30 kDa) suggère que cela n'est peut-être pas le cas.

La nature de l'ADN à l'intérieur. Le génome scADN a été considéré comme étant sous forme double brin à l'intérieur de la capside. Cependant, cette idée est fortement critiquable. En effet, la capside renfermerait un polymère de 825 nm dont la longueur de persistance (environ 50 nm) est supérieure à deux fois le diamètre intérieur (23 nm). De plus, comme nous l'avons noté dans le Chap.1.IV (Timpe et al. 2005), dans le cas des AAV contenant un génome simple brin, le mécanisme d'encapsidation repose en partie sur les protéines Repqui permet de séparer les brins (+) et (–) à partir d'un monomère double brin formé lors de la réplication du génome AAV (King et al. 2001). Par similarité, on peut penser que le double brin *self-complementary* est ouvert par l'helicase et laisse entrer le génome sous forme simple brin. Cependant, des filaments dont la longueur correspond à celle du double brin sont observés lorsque la température de chauffage est élevée. Ceci peut s'expliquer par une réhybridation très rapide la molécule de scDNA lorsqu'elle se trouve à l'extérieur de la capside. Il est donc probable que l'ADN du vecteur scAAV se trouve dans un état de simple brin à l'intérieur de la capside ce qui expliquerait la faible pression interne mesurée.

L'éjection de l'ADN ne serait alors peut-être pas seulement causée par la pression interne. En effet, on peut penser que la libération du génome dans la solution aide à la formation du double brin et faciliterait grandement son extraction de la capside. La sortie de l'ADN ne pourrait donc se faire de manière partielle en présence de PEG : il y aurait une éjection de type tout ou rien contrairement au cas de l'éjection du génome simple brin dans les ssAAV qui semble se faire par palier (voir Chap. 4.I.4). Plus la concentration de PEG augmente, moins la capside laisse sortir le génome. Mais s'il y a un début d'éjection de l'ADN d'un AAV, alors tout est extrait. Ceci pourrait expliquer l'absence de signal intermédiaire dans nos résultats de *Southern Blot*. La différence de scénario observée lors de la comparaison entre ssAAV9 et scAAV9 peut alors se justifier ainsi : Elle ne serait peut-être pas due essentiellement à la stabilité de la capside elle-même mais pourrait se comprendre en s'intéressant au mécanisme de sortie de l'ADN. Le vecteur scAAV9 serait plus à même d'éjecter totalement son ADN pour des températures relativement plus faibles que ssAAV9.

Cependant d'autres expériences devront être réalisées pour valider cette hypothèse. On peut imaginer, pour compléter ces résultats, le même protocole de chauffage en présence de PEG à la différence que l'étude des brins d'ADN protégé se fasse par imagerie AFM combinée à l'utilisation du programme *Matlab*© de mesure de la longueur. Une autre possibilité serait d'étudier directement par imagerie AFM des dépôts issus de la déstabilisation des capsides en présence de PEG.

D'autres expériences de biochimie pourraient être faites pour savoir par exemple quelle partie de l'ADN sort en premier de la capside lors de son chauffage.

L'étude des propriétés mécaniques via la nanoindentation serait également intéressante pour quantifier la pression exercée par l'ADN sur la capside pour comprendre la contribution du génome lors de l'étape d'éjection. Pour cela, il pourrait être proposé une comparaison mécanique des particules vides et pleines de ssADN ou de scADN plus ou moins long.

Conclusion

Les expériences menées sur AAV ont été conduites pendant les trois années de ma thèse. Grandement aidé par Lara Gardette en 2013 puis par Anny Fis en 2014, ces travaux ont été réalisés en étroite collaboration avec l'équipe d'Anna Salvetti (CIRI, ENS de Lyon), et en particulier avec Axel Rossi et Ludovic Aillot, pour les expériences de biochimie et de purification. L'étude sur la pression interne a été initiée lors de la mise en place d'une collaboration et d'un séjour de quelques mois à Pittsburgh, Etats Unis, dans l'équipe d'Alex Evilevitch dans le Département de Physique de l'Université Carnegie Mellon.

Un certain nombre de résultats ont ainsi été obtenus :

Tout d'abord, l'étude de AAV8 comme sérotype de référence a permis de mettre en place les moyens d'analyse des informations obtenues et de déterminer les paramètres pertinents pour les comparaisons ultérieures, en particulier pour ce qui concerne leurs propriétés morphologiques. L'étude de la morphologie dans l'air d'AAV8 a montré une forte monodispersité de taille, avec une forme isotrope dans le plan. L'étude de la morphologie en liquide, a montré une décroissance de la hauteur lorsque la concentration en ions divalents croit. Par ailleurs, nous avons proposé une expérience de déstabilisation des capsides par la température s'appuyant sur la capacité de l'AFM à détecter l'ADN sur une surface. Nous montrons que dans un tampon de type PBS^+, un chauffage à 65°C pendant 15 minutes entraine l'éjection du génome à l'extérieur de la capside AAV8, soit par un trou dans la structure ou par le désassemblage de la capside.

Si nous avons montré que la concentration en Mg^{2+} avait bel et bien une incidence sur la morphologie des vecteurs, il serait intéressant de voir l'effet ces ions divalents sur les propriétés mécaniques et sur la stabilité thermique. Cette étude nécessiterait alors une caractérisation de la capside en l'absence de génome à l'intérieur pour mieux comprendre, par différence avec la capside pleine, l'effet du génome sur les parois de la capside et de son comportement en présence de Mg^{2+}. On pourrait à ce moment-là utiliser comme technique la calorimétrie différentielle à balayage pour déterminer la température de déstabilisation des capsides vides.

Pour comprendre alors les différences de comportement biologique entre différents sérotypes d'AAV, nous avons choisi comme stratégie de comparer le sérotype ssAAV8 avec d'autres sérotypes, contenant le même génome, dans différents microenvironnements.

Nous avons ainsi dans un premier temps différencié les capsides AAV8 et AAV9 en reliant leurs différences de propriétés physiques à leurs stabilités distinctes devant une augmentation de la température. Le sérotype AAV9 présente une raideur plus faible qu'AAV8, ce qui le rendrait plus résistant aux fluctuations thermiques, son désassemblage nécessitant alors une température plus élevée. Il privilégierait plus l'éjection de l'ADN par un trou dans sa structure par rapport à AAV8 qui a une capside plus rigide mais donc plus fragile, susceptible de se désassembler (et ainsi libérer le génome). La réalisation de nouvelles expériences d'indentation en fonction de la température permettrait de renforcer cette interprétation.

Le microenvironnement de la capside varie fortement lors du cycle viral. Dans une troisième partie, nous avons montré les différences de propriétés morphologiques, mécaniques et de stabilité, de la capside AAV8 lorsque le milieu passe d'un pH neutre à un pH acide mimant grossièrement *in vitro* les changements

qui surviennent dans l'endosome tardif. La capside serait moins rigide à pH acide et deviendrait alors plus stable devant la déstabilisation thermique. Ce comportement est identique à celui d'AAV9 à pH neutre et renforce donc notre interprétation sur le lien entre propriétés mécaniques et stabilité thermiques) résistante aux fluctuations thermiques permise par une faible rigidité de la capside dans un milieu acide ce qui suggère une augmentation de la résistance lors du transport dans l'endosome de la membrane cytoplasmique vers le noyau.

Mais si nous voulons imiter avec plus de précision le transport endosomal de l'AAV lors de son transport dans le cytoplasme, le passage de l'endosome au milieu cytoplasmique proche du noyau s'accompagne d'un nouveau changement de pH, d'acide à neutre. Une étude complète nécessiterait alors des expériences sur des particules ayant fait d'abord une étape d'incubation en milieu acide à température élevée (autour de 60°C pour aider à la maturation de la particule avec l'externalisation de la partie N-terminal de VP1 comme le propose les travaux de l'équipe de J. A. Kleinschmidt (Kronenberg et al. 2005)) puis, après retour dans un milieu neutre, des mesures de morphologie, d'indentation ou de stabilité en chauffant comme habituellement.

Finalement, nous avons montré un effet de la nature du génome sur capside. La comparaison de la stabilité thermique entre les capsides ssAAV9 et scAAV9 a montré une température d'éjection de l'ADN plus faible pour scAAV9 que pour ssAAV9. Pensant dans un premier temps à un effet de la pression interne, nous avons réalisé des expériences, sur scAAV2, reposant sur des expériences de biochimie et de diffusion de la lumière pour mesurer cette pression. Les résultats n'ont pas montré la présence d'une pression interne ce qui était en contradiction avec nos hypothèses sur la structure double brin de l'ADN à l'intérieur de la capside. Nous avons alors proposé une autre justification s'appuyant plus sur l'ADN que sur la stabilité de la capside. En effet, les différentes conclusions de nos expériences nous laissent penser que le génome *self-complementary* est sous la forme simple brin dans la capside. Dans cette configuration, la longueur de persistance serait de quelques nanomètres (et non de plusieurs dizaines de nanomètres), soit inférieure aux dimensions de la partie interne du virion. La pression interne serait alors beaucoup plus faible voir non mesurable. L'absence de pression interne dans les particules de scAAV comme, probablement, dans celles de ssAAV sous-entend que l'éjection du génome viral requerrait une modification progressive de la capside virale en plusieurs étapes. Cette absence de pression sous-entend également que ce processus serait efficace.

L'utilisation d'autres techniques d'imagerie, comme la cryo-Microscopie Electronique pourrait nous donner une idée de l'organisation de l'ADN à l'intérieur de la capside au travers des densités électroniques.

Commencé au début de ma thèse, la collaboration entre l'équipe d'Anna Salvetti et la nôtre a déjà permis d'obtenir certains résultats. Cependant, pour comprendre l'influence des paramètres physiques sur le caractère infectieux mais également sur l'efficacité du transport du génome du vecteur dans la cellule ciblé, certaines mesures physiques devront être mises en parallèle avec des expériences de mesure d'efficacité de décapsidation du génome *in vivo*.

Conclusion

Au cours de leurs cycles de réplication, les virus sont amenés à se déformer voir changer de forme, pour s'adapter aux contraintes exercées par le microenvironnement les entourant. Que cela soit pour le virus VIH-1 ou le vecteur AAV, nous avons privilégié une approche physique avec l'utilisation du microscope à force atomique pour comprendre quels paramètres physiques pouvaient jouer un rôle dans les différentes étapes qui constituent ce cycle.

En exploitant les capacités qu'offre le microscope à force atomique nous avons ainsi pu déterminer les propriétés morphologiques et mécaniques de différentes particules virales. L'extraction d'informations qualitatives et quantitatives à partir des images AFM a nécessité une adaptation de programmes d'analyse d'images. Nous avons ainsi pu réaliser des études statistiques de la morphologie des particules s'appuyant sur un grand nombre d'individus (plusieurs centaines). Les expériences de nanoindentation ont également nécessité la mise en place de programmes permettant de pouvoir obtenir la constante de raideur des virus. Les problèmes de dérives des cristaux piézoélectriques nous ont obligés à adopter une stratégie originale pour la détermination de la raideur des particules.

Nous avons ainsi pu étudier le virus VIH-1 et différentes étapes de son cycle viral.

La première étape de cette étude à consister à caractériser physiquement les VLPs p8.2, pseudo-particules ne différant des virions sauvages matures du VIH-1 que par son absence de protéines d'enveloppe et son pseudo-génome. Par un procédé biochimique, il a été possible d'extraire les cores de ces VLPs. L'imagerie par AFM a ainsi pu mettre en évidence l'existence de cores cylindriques et coniques. L'analyse statistique a apporté de nombreuses informations sur la morphologie des particules, que cela soit pour les VLPs avec leurs diamètres ou pour les cores avec leurs angles, leurs longueurs et leurs diamètres. Le croisement de ces différentes données nous ont conduits à proposer une hypothèse sur le scenario de formation des cores lors de la maturation. La forme conique ou cylindrique des cores ne dépendrait pas de la dimension des VLPs et serait définie dès le début de l'assemblage des protéines CA. L'AFM nous a également permis d'étudier les propriétés mécaniques des VLPs. Nous avons ainsi mis en évidence deux régimes de déformation en fonction de l'indentation : la première relative à la membrane cytoplasmique et la deuxième au core se trouvant à l'intérieur.

Nous avons également étudié différents variants de VLPs et de cores définir le rôle de certaines protéines dans les propriétés morphologiques et mécaniques. Nous avons ainsi pu montrer que les protéines accessoires, perturbant les mécanismes cellulaires essentielles au fonctionnement de l'hôte infecté pour optimiser la réplication virale, ne semblaient pas présenter de fonction structurante, que cela soit pour les cores ou les VLPs. Nous avons également mis en évidence une différence morphologique et mécanique entre les

VLPs matures et immatures. La présence de cavités dans la structure interne formée par les polyprotéines Gag des particules immatures (des dimensions plus grandes et plus polydisperses ainsi qu'une réponse aux déformations fortement non linéaires) pourraient en être la cause.

Utilisant ou non un plasmide pRNAψ, nous avons pu tester l'effet de la présence de l'ARN viral à l'intérieur des particules sur la morphologie des VLPs et des cores. Il est apparu que le génome viral joue un rôle structurant lors de l'assemblage des particules. A l'instar des cores, la taille et la polydispersité associée des VLPs matures sont réduites en présence de l'ARN viral. L'angle des cores coniques semble également mieux défini. Un modèle s'appuyant sur des arguments entropiques justifie ces observations : à nombre de protéines accessibles données, la formation de petites particules est entropiquement privilégiée.

Finalement, nous avons initié une étude sur le rôle de la rétrotranscription dans le désassemblage du core lors de la libération du génome viral dans le cytosol. Pour cela, nous avons caractérisé morphologiquement et mécaniquement un mutant de la souche sauvage dont seule la protéine RT, enzyme virale favorisant la cinétique de rétrotranscription, est modifiée pour être fortement inefficace. A température ambiante, nous avons montré l'absence de différence entre les deux types de particules à la fois mécanique et morphologique. Dans ces conditions, la rétrotranscription au sein des particules n'aurait pas commencé. En chauffant à 37°C, nous avons pu observer par AFM l'apparition de structures particulières signalant la déstabilisation des édifices protéiques : des filaments ressemblant à de l'ARN et de l'ADN. Toutefois ces résultats préliminaires ne nous ont pas permis d'observer un comportement différent entre la souche sauvage et son mutant.

Ces différentes expériences sur le VIH-1 ont eu pour objectif de comprendre certaines étapes du cycle viral. Bien qu'elles aient apporté un certain nombre d'éclairements, plusieurs expériences seraient judicieuses pour les compléter. Tout d'abord, une meilleure production des cores viraux et un meilleur protocole de dépôt sur les surfaces de mica nous permettraient d'étudier directement les réponses mécaniques de ces objets et de pouvoir comparer la réponse mécanique du core au sein de la VLP. Ceci offrirait la possibilité d'étudier l'évolution de la rigidité et la fragilité du core p8.2 et de son mutant Q151N avec plus de précision lorsqu'on initie la rétrotranscription. D'ailleurs, l'observation de cette déstabilisation par imagerie AFM avec l'apparition des différentes structures de filaments doit également être approfondie, en particulier pour discerner ARN et ADN, avec en outre, l'utilisation de drogues inhibant complètement la protéine RT.

Nous nous sommes également intéressés à la physique des vecteurs AAV.

Nous avons ainsi montré que des différences physiques pouvaient être observées entre les sérotypes AAV8 et AAV9, à la fois en terme de morphologie, de mécanique et de stabilité thermique. Les capsides AAV9 semblent se déstabiliser pour des températures beaucoup plus importantes qu'AAV8 ce qui peut se justifier par une souplesse apparente plus grande lui permettant de mieux s'adapter aux déformations amenées par la température. L'efficacité de transfert de gènes étant plus efficace pour AAV9 que pour AAV8 pourrait s'expliquer par la capacité d'AAV9 à traverser les différentes variations de microenvironnement jusqu'à atteindre le noyau au cours de son cycle viral du fait de sa plus grande stabilité. L'observation par imagerie AFM de l'ADN simple brin éjecté nous a amené à proposer deux scenarios d'éjection, soit la sortie du génome à travers un pore conduisant à l'éjection d'un brin d'ADN sans structure secondaire, l'autre par le désassemblage de l'édifice protéique libérant le génome compacté tel qu'il se trouve initialement à l'intérieur de la capside.

Nous avons ensuite comparé l'effet du pH sur les capsides AAV8. Il est apparu que les capsides AAV8 ayant été incubées dans une solution à pH acide autour de 5 présentaient une raideur étrangement plus faible et, comme AAV9 pour AAV8 dans un milieu neutre, une stabilité thermique plus importante que celle incubées dans une solution à pH neutre. Lors du transport dans l'endosome tardif, la capside AAV doit préserver son intégrité jusqu'à atteindre le noyau dans lequel elle pourra libérer son génome. Une diminution de sa rigidité et donc une plus grande stabilité thermique lui permettraient de transférer efficacement l'ADN qu'elle possède vers le noyau.

Nous avons finalement étudié l'effet du génome sur la capside. Dans un premier temps, nous avons étudié la stabilité thermique de capsides contenant différentes longueurs ou natures de génomes. Si l'augmentation de la taille du simple brin de 1000 bases n'a pas montré d'influence sur la stabilité thermique des deux types de vecteurs, le passage d'un génome simple brin à un génome double brin, de type *self-complementary* a fortement réduit la stabilité thermique. Dans un premier temps, nous avons pensé que la pression interne était plus importante. En adaptant les expériences d'A. Evilevitch, nous avons conclu en un faible effet de la pression. Ces résultats nous ont donc amené à supposer que le génome *self-complementary* se trouve sous la forme simple brin à l'intérieur de la capside. La déstabilisation de la capside serait alors facilitée non pas par la pression interne mais par le fait qu'une fois l'éjection commencée, l'ADN s'hybride avec lui-même sous sa forme double brin, nettement plus stable que le simple brin. Lors de la libération du génome, la pression ne jouerait donc pas un rôle important, à la différence des bactériophages par exemple, mais utiliserait d'autres mécanismes.

Notre étude sur AAV nous a amené à nous interroger sur l'efficacité de transfert des gènes en fonction de différents paramètres, comme la nature du génome ou encore le sérotype considéré, avec un point de vue de physiciens. La nano-indentation dans différents milieux contrôlés, comme un milieu en pH acide nous permettrait de mieux apprécier l'évolution de la rigidité de sa capside. En jouant sur la concentration en Mg^{2+} ou en mesurant la constante de raideur de particules vides, nous pourrons déterminer l'effet du génome sur la capside et vérifier l'absence de pression à l'intérieur de la capside.

D'un point de vue technique, il serait envisageable pour les expériences de nano-indentation de mettre en place un aménagement de l'AFM pour assurer une température constante au sein de l'enceinte où se trouve le microscope. Ceci réduirait fortement la dérive thermique des cristaux piézoélectriques et d'assurer une plus grande précision des mesures mécaniques. Cette amélioration permettrait également de contrôler en température les échantillons pour observer par exemple l'éjection *in situ* d'ADN lors du chauffage.

Cette thèse s'est focalisée sur l'étude des virus et du lien existant entre leurs propriétés physiques et biologiques pour comprendre certaines étapes du cycle viral. Elle a ouvert de nombreuses questions qui pourront peut-être un jour servir à améliorer les traitements en thérapie génique et les moyens de diminuer l'infectiosité du VIH en agissant sur des paramètres physiques.

Et allez savoir, un jour peut-être, des vecteurs AAV, dont le génome recombinant code pour une protéine d'intérêt similaire à un anticorps de Env du VIH-1, pourront offrir une solution performante et stable à la pandémie du VIH que subit l'humanité depuis déjà une trentaine d'années (Gardner et al. 2015)…

Bibliographie

Abrescia, N.G. a, Grimes, J.M., Kivelä, H.M., Assenberg, R., Sutton, G.C., Butcher, S.J., Bamford, J.K.H., Bamford, D.H. & Stuart, D.I., 2008. Insights into virus evolution and membrane biogenesis from the structure of the marine lipid-containing bacteriophage PM2. *Molecular cell*, 31(5), pp.749–761.

Adamcik, J., Klinov, D. V., Witz, G., Sekatskii, S.K. & Dietler, G., 2006. Observation of single-stranded DNA on mica and highly oriented pyrolytic graphite by atomic force microscopy. *FEBS Letters*, 580(24), pp.5671–5675.

Alessandrini, A. & Facci, P., 2005. AFM: a versatile tool in biophysics. *Measurement Science and Technology*, 16(6), pp.R65–R92.

Ambrose, Z. & Aiken, C., 2014. HIV-1 uncoating: Connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology*, 454-455(1), pp.371–379.

Ando, T., 2013. High-speed atomic force microscopy. *Microscopy (Oxford, England)*, 62(1), pp.81–93.

ANRS, 2015. Rapport d ' activité

Arhel, N., 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*, 7(1), p.96.

Arts, E.J. & Hazuda, D.J., 2012. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(4), p.a007161.

Asokan, A., Schaffer, D. V & Jude Samulski, R., 2012. The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads. *Molecular Therapy*, 20(4), pp.699–708.

Atchison, R.W., Casto, B.C. & Hammon, W.M., 1965. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science (New York, N.Y.)*, 149, pp.754–756.

Attard, P., 2007. Measurement and interpretation of elastic and viscoelastic properties with the atomic force microscope. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 19(47), p.473201.

Bacchetti, S. & Graham, F.L., 1977. Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(4), pp.1590–1594.

Baker, T.S., Olson, N.H. & Fuller, S.D., 1999. Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63(4), pp.862–922, table of contents.

Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, 35(3), pp.235–241.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*, 220(4599), pp.868–871.

Bauer, D.W., Huffman, J.B., Homa, F.L. & Evilevitch, A., 2013. Herpes virus genome, the pressure is on. *Journal of the American Chemical Society*, 135(30), pp.11216–21.

Bellon, L., 2010. Exploring nano-mechanics through thermal fluctuations. ENS de LYON.

Bernaud, J., Castelnovo, M., Muriaux, D. & Faivre-moskalenko, C., 2015. Microscopie à force atomique pour l'étude du cycle viral : L'exemple du VIH-1. *Médecine & Sciences*, 31, pp.522–528.

Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J. & Hess, H.F., 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), pp.1642–1645.

Bharat, T. a. M., Davey, N.E., Ulbrich, P., Riches, J.D., de Marco, A., Rumlova, M., Sachse, C., Ruml, T. & Briggs, J. a. G., 2012. Structure of the immature retroviral capsid at 8 Å resolution by cryo-electron microscopy. *Nature*, 487(7407), pp.385–389.

Binnig, G. & Rohrer, H., 2000. Scanning Tunneling Microscopy. *IBM J. Res. Dev.*, 44(1-2), pp.279–293.

Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E., 1982. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letters*, 49, pp.57–61.

Blacklow, N.R., Hoggan, M.D. & Rowe, W.P., 1967. Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(4), pp.1410–1415.

Bouhacina, T., Desbat, B. & Aimé, J.P., 2000. FTIR spectroscopy and nanotribological comparative studies : influence of the adsorbed water layers on the tribological behaviour. *Tribology Letters*, 9, pp.111–117.

Briggs, J. a G., Huiskonen, J.T., Fernando, K.V., Gilbert, R.J.C., Scotti, P., Butcher, S.J. & Fuller, S.D., 2005. Classification and three-dimensional reconstruction of unevenly distributed or symmetry mismatched features of icosahedral particles. *Journal of Structural Biology*, 150(3), pp.332–339.

Briggs, J. a G. & Kräusslich, H.-G., 2011. The molecular architecture of HIV. *Journal of molecular biology*, 410(4), pp.491–500.

Briggs, J. a G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.G. & Fuller, S.D., 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO Journal*, 22(7), pp.1707–1715.

Buenemann, M., 2008. Mechanical Properties and DNA Organization of Viruses and Bacteria.

Buenemann, M. & Lenz, P., 2007. Mechanical limits of viral capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), pp.9925–9930.

Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J.M., 2009. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The Journal of infectious diseases*, 199(3), pp.381–390.

Calladine, C.R., Drew, H.R., Luisi, B.F. & Travers, A.A., 2004. *Understanding DNA: The molecule and how it works*,

Callen, H.B. & Greene, R.F., 1952. On a theorem of irreversible thermodynamics. *Physical Review*, 86(reference 4), pp.702–710.

Campbell, S. & Vogt, V.M., 1995. Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 69(10), pp.6487–6497.

Cardin, H. & Messager, D., 2013. *La Révolution Sida*,

Carlson, L.A., Briggs, J. a G., Glass, B., Riches, J.D., Simon, M.N., Johnson, M.C., Müller, B., Grünewald, K. & Kräusslich, H.G., 2008. Three-Dimensional Analysis of Budding Sites and Released Virus Suggests a Revised Model for HIV-1 Morphogenesis. *Cell Host and Microbe*, 4(6), pp.592–599.

Carrasco, C., Carreira, a, Schaap, I. a T., Serena, P. a, Gómez-Herrero, J., Mateu, M.G. & de Pablo, P.J., 2006. DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), pp.13706–11.

Carrasco, C., Castellanos, M., de Pablo, P.J. & Mateu, M.G., 2008. Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), pp.4150–5.

Casjens, S.R., 2011. The DNA-packaging nanomotor of tailed bacteriophages. *Nature reviews. Microbiology*, 9(9), pp.647–657.

Caspar, D.L. & Klug, a., 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 27, pp.1–24.

Castelnovo, M., Muriaux, D. & Faivre-Moskalenko, C., 2013. Entropic control of particle sizes during viral self-assembly. *New Journal of Physics*, 15, pp.1–9.

Castón, J.R., 2013. Conventional electron microscopy, cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of viruses. *Sub-cellular biochemistry*, 68, pp.79–115.

Castón, J.R. & Carrascosa, J.L., 2013. The Basic Architecture of Viruses. *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*, 68, pp.53–75.

Cerritelli, M.E., Cheng, N., Rosenberg, A.H., McPherson, C.E., Booy, F.P. & Steven, A.C., 1997. Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. *Cell*, 91(2), pp.271–280.

Chen, H., Meisburger, S.P., Pabit, S.A., Sutton, J.L., Webb, W.W. & Pollack, L., 2012. Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA. , 109(3).

Chen, W.S., Chen, W.H., Chen, Z., Gooding, A. a., Lin, K.J. & Kiang, C.H., 2010. Direct observation of multiple pathways of single-stranded DNA stretching. *Physical Review Letters*, 105(21), pp.1–4.

Chojnacki, J. & Müller, B., 2013. Investigation of HIV-1 assembly and release using modern fluorescence imaging techniques. *Traffic*, 14(1), pp.15–24.

Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus., H.E., 1998. *Retroviruses.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Colberg-Poley, A.M., Patterson, G.H., Salka, K., Bhuvanendran, S., Yang, D. & Jaiswal, J.K., 2015. Superresolution imaging of viral protein trafficking. *Medical Microbiology and Immunology.*

Corbin, A., Grigorov, B., Roingeard, P., Darlix, J. & Muriaux, D., 2008. Une nouvelle vision de l ' assemblage du VIH-1. *Medecine/Sciences*, 24, pp.49–55.

Craigie, R. & Bushman, F.D., 2012. HIV DNA integration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), p.a006890.

Dahmane, S., Dosset, P., Adam, O., Nicolai, M. & Milhiet, P., 2014. Mimicking In fl uenza Virus Fusion Using Supported Lipid Bilayers.

Dayton, R.D., Wang, D.B. & Klein, R.L., 2012. The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(6), pp.757–766.

DiMattia, M. a., Nam, H.-J., Van Vliet, K., Mitchell, M., Bennett, a., Gurda, B.L., McKenna, R., Olson, N.H., Sinkovits, R.S., Potter, M., Byrne, B.J., Aslanidi, G., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Baker, T.S. & Agbandje-McKenna, M., 2012. Structural Insight into the Unique Properties of Adeno-Associated Virus Serotype 9. *Journal of Virology*, 86(12), pp.6947–6958.

Ding, W., Zhang, L., Yan, Z. & Engelhardt, J.F., 2005. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene therapy*, 12(11), pp.873–880.

Dobrowsky, T.M., Rabi, S.A., Nedellec, R., Daniels, B.R., Mullins, J.I., Mosier, D.E., Siliciano, R.F. & Wirtz, D., 2013. Adhesion and fusion efficiencies of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) surface proteins. *Scientific reports*, 3, p.3014.

Dong, B., Nakai, H. & Xiao, W., 2010. Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(1), pp.87–92.

Driscoll, R., Youngquist, M.G. & Baldeschwieler, J.D., 1990. Atomic scale imaging of DNA using scanning tunnelling microscopy. *Nature*, 346, pp.294–296.

Ehrhardt, D., 2003. GFP technology for live cell imaging. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(6), pp.622–628.

Eigler, D.M. & Schweizer, E.K., 1990. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature*, 344, pp.524–526.

Erdemci-Tandogan, G., Wagner, J., Van Der Schoot, P., Podgornik, R. & Zandi, R., 2014. RNA topology remolds electrostatic stabilization of viruses. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 89(3), pp.1–5.

Evilevitch, A., Gober, J.W., Phillips, M., Knobler, C.M. & Gelbart, W.M., 2005. Measurements of DNA lengths remaining in a viral capsid after osmotically suppressed partial ejection. *Biophysical journal*, 88(January), pp.751–756.

Evilevitch, A., Lavelle, L., Knobler, C.M., Raspaud, E. & Gelbart, W.M., 2003. Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), pp.9292–5.

Evilevitch, A., Roos, W.H., Ivanovska, I.L., Jeembaeva, M., Jönsson, B. & Wuite, G.J.L., 2011. Effects of salts on internal DNA pressure and mechanical properties of phage capsids. *Journal of Molecular Biology*, 405(1), pp.18–23.

Faivre-Moskalenko, C., Bernaud, J., Thomas, A., Tartour, K., Beck, Y., Iazykov, M., Danial, J., Lourdin, M., Muriaux, D. & Castelnovo, M., 2014. RNA control of HIV-1 particle size polydispersity. *PloS one*, 9(1), p.e83874.

Fokine, A., Chipman, P.R., Leiman, P.G., Mesyanzhinov, V. V, Rao, V.B. & Rossmann, M.G., 2004. Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), pp.6003–6008.

Frankel, a D. & Young, J. a, 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry*, 67, pp.1–25.

Franklin, R.E., Caspar, D.L.D. & Klug, A., 1959. the Structure of Viruses As Determined By X-Ray. *University of Wisconsin Press*, pp.447–461.

Freed, E.O., 2001. HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics*, 26(1-6), pp.13–33.

Fritschy, J.-M. & Hartig, W., 1999. Immunofluorescence. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp.1–7.

Ganser, B.K., 1999. Assembly and Analysis of Conical Models for the HIV-1 Core. *Science*, 283(5398), pp.80–83.

Ganser, B.K., Li, S., Klishko, V.Y., Finch, J.T. & Sundquist, W.I., 1999. Assembly and Analysis of Conical Models for the HIV-1 Core. *Science*, 283(5398), pp.80–83.

Geisow, M.J. & Evans, W.H., 1984. pH in the endosome. *Experimental Cell Research*, 150(1), pp.36–46.

Giocondi, M., Milhiet, P.E., Lesniewska, E. & Grimellec, C. Le, 2003. Microscopie à force atomique : de l ' imagerie cellulaire à la manipulation moléculaire. *Medecine/Sciences*, 19, pp.92–99.

Girod, A., Wobus, C.E., Zádori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J. a. & Hallek, M., 2002. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *Journal of General Virology*, 83(5), pp.973–978.

Gonçalves, M. a F. V, 2005. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology journal*, 2, p.43.

Grieger, J.C. & Samulski, R.J., 2012. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications 1st ed., Elsevier Inc.

Grove, J., 2014. Super-resolution microscopy: A virus' eye view of the cell. *Viruses*, 6(3), pp.1365–1378.

Grünewald, K. & Cyrklaff, M., 2006. Structure of complex viruses and virus-infected cells by electron cryo tomography. *Current Opinion in Microbiology*, 9(4), pp.437–442.

Gudheti, M. V., Curthoys, N.M., Gould, T.J., Kim, D., Gunewardene, M.S., Gabor, K. a., Gosse, J. a., Kim, C.H., Zimmerberg, J. & Hess, S.T., 2013. Actin mediates the nanoscale membrane organization of the clustered membrane protein influenza hemagglutinin. *Biophysical Journal*, 104(10), pp.2182–2192.

Gunzenhäuser, J., Olivier, N., Pengo, T. & Manley, S., 2012. Quantitative super-resolution imaging reveals protein stoichiometry and nanoscale morphology of assembling HIV-gag virions. *Nano Letters*, 12(9), pp.4705–4710.

Ha, M., Rachel, R., Peng, X., Garrett, R. a & Prangishvili, D., 2005. Viral Diversity in Hot Springs of Pozzuoli, Italy, and Characterization of a Unique Archaeal Virus,. , 79(15), pp.9904–9911.

Hagan, M.F., 2014. Modeling Viral Capsid Assembly Michael. *Adv. chem. Phys.*, 155, pp.1–68.

Hamon, L., Pastré, D., Dupaigne, P., Le Breton, C., Le Cam, E. & Piétrement, O., 2007. High-resolution AFM imaging of single-stranded DNA-binding (SSB) protein - DNA complexes. *Nucleic Acids Research*, 35(8), pp.1–7.

Harrison, S.C., Caspar, D.L., Camerini-Otero, R.D. & Franklin, R.M., 1971. Lipid and protein arrangement in bacteriophage PM2. *Nature New Biology*, 229(5313), pp.655–657.

Hartschuh, R.D., Wargacki, S.P., Xiong, H., Neiswinger, J., Kisliuk, a., Sihn, S., Ward, V., Vaia, R. a. & Sokolov, a. P., 2008. How rigid are viruses. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 78(2), pp.1–9.

Hecht, E., Knittel, P., Felder, E., Dietl, P., Mizaikoff, B. & Kranz, C., 2012. Combining atomic force-fluorescence microscopy with a stretching device for analyzing mechanotransduction processes in living cells. *The Analyst*, 137(22), p.5208.

Heinz, W.F. & Hoh, J.H., 1999. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends in biotechnology*, 17(4), pp.143–50.

Helfrich, W., 1973. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 28(11), pp.693–703.

Hendrix, R.W., 2005. Bacteriophage HK97: Assembly of the Capsid and Evolutionary Connections. *Advances in Virus Research*, 64(05), pp.1–14.

Hernando-Pérez, M., Pascual, E., Aznar, M., Ionel, A., Castón, J.R., Luque, A., Carrascosa, J.L., Reguera, D. & de Pablo, P.J., 2014. The interplay between mechanics and stability of viral cages. *Nanoscale*, 6(5), pp.2702–9.

Hess Girirajan T, Mason M, S., 2006. Ultra-High Resoluion Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.*, 91(11), pp.4258–4272.

Hess, S.T., Gould, T.J., Gudheti, M. V, Maas, S. a, Mills, K.D. & Zimmerberg, J., 2007. Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), pp.17370–17375.

Horowitz, E.D., Rahman, K.S., Bower, B.D., Dismuke, D.J., Falvo, M.R., Griffith, J.D., Harvey, S.C. & Asokan, A., 2013. Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release. *Journal of virology*, 87(6), pp.2994–3002.

Hu, W. & Hughes, S.H., 2012. HIV-1 Reverse Transcription.

Hulme, A.E., Perez, O. & Hope, T.J., 2011. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(24), pp.9975–9980.

Ishigami, M., Chen, J.H., Cullen, W.G., Fuhrer, M.S. & Williams, E.D., 2007. Atomic structure of graphene on SiO2. *Nano letters*, 7(6), pp.1643–1648.

Ivanovska, I., Wuite, G., Jönsson, B. & Evilevitch, A., 2007. Internal DNA pressure modifies stability of WT phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), pp.9603–8.

Iwasaki, K. & Omura, T., 2010. Electron tomography of the supramolecular structure of virus-infected cells. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(5), pp.632–639.

Jeng, T., Crowther, R. a, Stubbs, G. & Chiul, W., 1989. Visualization of Alpha-helices Mosaic Virus by Cryo-electron in Tobacco Microscopy.

Johnson, J.E., 2013. Confessions of an icosahedral virus crystallographer. *Journal of Electron Microscopy*, 62(1), pp.69–79.

Johnson, J.E. & Chiu, W., 2007. DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(2), pp.237–243.

Johnson, N.P. a S. & Mueller, J., 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bulletin of the history of medicine*, 76(1), pp.105–115.

Kalle, W. & Strappe, P., 2012. Atomic force microscopy on chromosomes, chromatin and DNA: a review. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 43(12), pp.1224–31.

Kamiyama, D. & Huang, B., 2012. Development in the STORM. *Developmental Cell*, 23(6), pp.1103–1110.

Karn, J. & Stoltzfus, C.M., 2012. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(2), p.a006916.

Katz, R. a & Skalka, a M., 1994. The retroviral enzymes. *Annual review of biochemistry*, 63, pp.133–73.

Kellmann, J.-W., Liebisch, P., Schmitz, K.-P. & Piechulla, B., 2001. Visual Representation by Atomic Force Microscopy (AFM) of Tomato Spotted Wilt Virus Ribonucleoproteins. *Biological Chemistry*, 382(November), pp.1559–1562.

King, J. a, Dubielzig, R., Grimm, D. & Kleinschmidt, J. a, 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *The EMBO journal*, 20(12), pp.3282–91.

Klug, a, 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354(1383), pp.531–535.

Knez, M., Sumser, M.P., Bittner, a. M., Wege, C., Jeske, H., Hoffmann, D.M.P., Kuhnke, K. & Kern, K., 2004. Binding the Tobacco Mosaic Virus to Inorganic Surfaces. *Langmuir*, 20(34), pp.441–447.

Kol, N., Shi, Y., Tsvitov, M., Barlam, D., Shneck, R.Z., Kay, M.S. & Rousso, I., 2007. A stiffness switch in human immunodeficiency virus. *Biophysical journal*, 92(5), pp.1777–83.

Kostyuchenko, V. a, Chipman, P.R., Leiman, P.G., Arisaka, F., Mesyanzhinov, V. V & Rossmann, M.G., 2005. The tail structure of bacteriophage T4 and its mechanism of contraction. *Nature structural & molecular biology*, 12(9), pp.810–813.

Kronenberg, S., Böttcher, B., von der Lieth, C.W., Bleker, S. & Kleinschmidt, J. a, 2005. A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini. *Journal of virology*, 79(9), pp.5296–303.

Kronenberg, S., Kleinschmidt, J. a & Böttcher, B., 2001. Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO reports*, 2(11), pp.997–1002.

Kruger, D.H., Schneck, P. & Gelderblom, H.R., 2000. Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *Lancet*, 355(9216), pp.1713–1717.

Kuznetsov, Y.G. & McPherson, A., 2011. Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75(2), pp.268–85.

Lelek, M., Di Nunzio, F., Henriques, R., Charneau, P., Arhel, N. & Zimmer, C., 2012. Superresolution imaging of HIV in infected cells with FlAsH-PALM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), pp.8564–9.

Leung, B.O. & Chou, K.C., 2011. Review of super - Resolution fluorescence microscopy for biology. *Applied Spectroscopy*, 65(9), pp.967–980.

Liang, X., Mao, G. & Ng, K.Y.S., 2004. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278(1), pp.53–62.

Liashkovich, I., Hafezi, W., Kühn, J.E., Oberleithner, H., Kramer, A. & Shahin, V., 2008. Exceptional mechanical and structural stability of HSV-1 unveiled with fluid atomic force microscopy. *Journal of cell science*, 121, pp.2287–2292.

Liu, Z., Lavis, L.D. & Betzig, E., 2015. Imaging Live-Cell Dynamics and Structure at the Single-Molecule Level. *Molecular Cell*, 58(4), pp.644–659.

Mateu, M.G., 2013. Assembly , stability and dynamics of virus capsids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531(1-2), pp.65–79.

Mateu, M.G., 2012. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virological perspective. *Virus research*, 168(1-2), pp.1–22.

McCarty, D.M., Monahan, P.E. & Samulski, R.J., 2001. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene therapy*, 8(16), pp.1248–1254.

McPherson, A. & Kuznetsov, Y.G., 2011. Atomic force microscopy investigation of viruses. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 736, pp.171–195.

Melikyan, G.B., 2014. HIV entry: A game of hide-and-fuse ? *Current Opinion in Virology*, 4(2), pp.1–7.

Miller, M., 2011. The Early Years of Retroviral Protease Crystal Structures. , 94(4), pp.521–529.

Millet, R., Rossi, A., Ploquin, A., Epstein, A.L., Greco, A. & Salvetti, A., 2013. Les vecteurs AAV pour le transfert de gène in vivo ou comment un petit virus devient grand. *Virologie*, 17(5), pp.343–353.

Mingozzi, F. & High, K. a, 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature reviews. Genetics*, 12(5), pp.341–355.

Moffitt, J.R., Chemla, Y.R., Smith, S.B. & Bustamante, C., 2008. Recent Advances in Optical Tweezers.

Montel, F., 2008. Dynamique à l'équilibre et hors d'équilibre de la chromatine visualisée par microscopie de force atomique : effet des variants d'histones et des facteurs de remodelage. ENS de Lyon.

Morgan, G.J., 2003. Historical review: Viruses, crystals and geodesic domes. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(2), pp.86–90.

Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D. & Rein, a, 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), pp.5246–5251.

Murphy, G.E. & Jensen, G.J., 2007. Tech Insight Electron Cryotomography. *BioTechniques*, 43(4).

Nam, H.-J., Lane, M.D., Padron, E., Gurda, B., McKenna, R., Kohlbrenner, E., Aslanidi, G., Byrne, B., Muzyczka, N., Zolotukhin, S. & Agbandje-McKenna, M., 2007. Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *Journal of virology*, 81(22), pp.12260–12271.

Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N.E., Popa-Wagner, R. & Kleinschmidt, J. a., 2012. Properties of the Adeno-Associated Virus Assembly-Activating Protein. *Journal of Virology*, 86(23), pp.13038–13048.

Newcomb, W.W., Booy, F.P. & Brown, J.C., 2007. Uncoating the Herpes Simplex Virus Genome. *Journal of Molecular Biology*, 370(4), pp.633–642.

Nguyen, T.T., Bruinsma, R.F. & Gelbart, W.M., 2005. Elasticity theory and shape transitions of viral shells. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 72(5), pp.1–19.

Nonnenmacher, M. & Weber, T., 2012. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Therapy*, 19(6), pp.649–658.

Nony, L., Cohen-Bouhacina, T. & Aimé, J.P., 2002. Dissipation induced by attractive interaction in dynamic force microscopy: Contribution of adsorbed water layers. *Surface Science*, 499, pp.152–160.

Nony, P., Chadeuf, G., Tessier, J., Moullier, P. & Salvetti, A., 2003. Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles. *Journal of virology*, 77(1), pp.776–81.

ONUSIDA, 2013. Le sida en chiffres.

Ortega-Esteban, a, Pérez-Berná, a J., Menéndez-Conejero, R., Flint, S.J., San Martín, C. & de Pablo, P.J., 2013. Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Scientific reports*, 3, p.1434.

De Pablo, P.J. & Mateu, M.G., 2013. *Structure and Physics of Viruses*,

Parsegian, V., Rand, R., Fuller, N. & Rau, D., 1986. Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces. *Methods in enzymology*, 127, pp.400–416.

Pleskoff, O., 2011. Les avancées de la recherche sur le sida L'Harmatta.,

Ponchon, L., Mangenot, S., Boulanger, P. & Letellier, L., 2005. Encapsidation and transfer of phage DNA into host cells: From in vivo to single particles studies. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1724(3), pp.255–261.

Prasad, B.V.V. & Schmid, M.F., 2012. Principles of virus structural organization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 726, pp.17–47.

Puchner, E.M. & Gaub, H.E., 2009. Force and function: probing proteins with AFM-based force spectroscopy. *Current opinion in structural biology*, 19(5), pp.605–14.

Purohit, P.K., Kondev, J. & Phillips, R., 2003. Mechanics of DNA packaging in viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), pp.3173–3178.

Raposo, G. & Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), pp.373–383.

Rayaprolu, V., Kruse, S., Kant, R., Venkatakrishnan, B., Movahed, N., Brooke, D., Lins, B., Bennett, A., Potter, T., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M. & Bothner, B., 2013. Comparative Analysis of Adeno Associated Virus Capsid Stability and Dynamics. *Journal of virology*, 87(24), pp.13150–13160.

Reddy, V., Natchiar, S., Stewart, P. & Nemerow, G., 2010. Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science*, 329(5995), pp.1071–1075.

Robbins, P.D. & Ghivizzani, S.C., 1998. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 80(1), pp.35–47.

Roos, W.H., Bruinsma, R. & Wuite, G.J.L., 2010. Physical virology. *Nature Physics*, 6(10), pp.733–743.

Roos, W.H., Radtke, K., Kniesmeijer, E., Geertsema, H., Sodeik, B. & Wuite, G.J.L., 2009. Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(24), pp.9673–9678.

Rossmann, M. & Rao, V., 2012. Viral molecular machines. *Saponins used in Food and Agriculture plenum press.*, pp.1–687.

Rouzina, I. & Bruinsma, R., 2014. DNA Confinement drives uncoating of the HIV Virus. *arXiv preprint arXiv:1404.2678*, pp.1–7.

Rulli, S.J., Hibbert, C.S., Mirro, J., Pederson, T., Biswal, S. & Rein, A., 2007. Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *Journal of virology*, 81(12), pp.6623–6631.

Rust, M.J., Bates, M. & Zhuang, X., 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 3(10), pp.793–795.

Sader, J.E., 1998. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics*, 84(1), pp.64–76.

Sae-Ueng, U., Li, D., Zuo, X., Huffman, J.B., Homa, F.L., Rau, D. & Evilevitch, A., 2014. Solid-to-fluid DNA transition inside HSV-1 capsid close to the temperature of infection. *Nature Chemical Biology*, 10(10), pp.861–867.

Salganik, M., Venkatakrishnan, B., Bennett, A., Lins, B., Yarbrough, J., Muzyczka, N., Agbandje-McKenna, M. & McKenna, R., 2012. Evidence for pH-dependent protease activity in the adeno-associated virus capsid. *Journal of virology*, 86(21), pp.11877–85.

Sands, M.S., 2011. AAV-Mediated Liver Directed Gene Therapy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 807(Dcm), pp.219–237.

Schrödinger, E., 1944. *What is life? The physical aspect of the living cell* E. Schrödinger, ed., Cambridge University Press.

Schur, F.K.M., Hagen, W.J.H., Rumlová, M., Ruml, T., Müller, B., Kräusslich, H.-G. & Briggs, J. a G., 2014. Structure of the immature HIV-1 capsid in intact virus particles at 8.8 Å resolution. *Nature*.

Sciara, G., Bebeacua, C., Bron, P., Tremblay, D., Ortiz-Lombardia, M., Lichière, J., van Heel, M., Campanacci, V., Moineau, S. & Cambillau, C., 2010. Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), pp.6852–6857.

La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E. & Raoult, D., 2008. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, 455(7209), pp.100–104.

Scott, R. & Traiman, S., 1980. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel:: III. Multilayer adsorption of water on the surface of silica gel. *Journal of Chromatography A*, 196, pp.193–205.

Seol, Y., Skinner, G.M., Visscher, K., Buhot, A. & Halperin, A., 2007. Stretching of homopolymeric RNA reveals single-stranded helices and base-stacking. *Physical Review Letters*, 98(15).

Shaw, G.M. & Hunter, E., 2012. HIV transmission. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11).

Sieben, C., Kappel, C., Zhu, R., Wozniak, A., Rankl, C., Hinterdorfer, P., Grubmüller, H. & Herrmann, A., 2012. Influenza virus binds its host cell using multiple dynamic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), pp.13626–31.

Smith, D.E., Tans, S.J., Smith, S.B., Grimes, S., Anderson, D.L. & Bustamante, C., 2001. The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, 413(6857), pp.748–752.

Smith, S.B., Cui, Y. & Bustamante, C., 1996. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5250), pp.795–799.

Snyder, R., Moullier, P., Weitzman, M.D. & Linden, R.M., 2011. Adeno-Associated Virus Biology R. O. Snyder & P. Moullier, eds. *Adeno-associated virus: methods and protocols*, 807(Dcm), pp.219–237.

Subramaniam, S., Bartesaghi, A., Liu, J., Bennett, A.E. & Sougrat, R., 2007. Electron tomography of viruses. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(5), pp.596–602.

Sundquist, W.I. & Krausslich, H.-G., 2012. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), pp.a015420–a015420.

Sundquist, W.I., Krausslich, H.-G. & Kräusslich, H.-G., 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), p.a006924.

Swanstrom, R. & Coffin, J., 2012. HIV-1 pathogenesis: the virus. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), p.a007443.

Tang, L. & Johnson, J.E., 2002. Current Topics Structural Biology of Viruses by the Combination of Electron Cryomicroscopy and. *October*, 41(39).

Tartour, K., Cimarelli, A., Lyon, U. De, Lyon, I. & Biosciences, U.M.S.U.S., 2015. Les IFITM , un obstacle commun à de nombreux.

Thuman-Commike, P. a. & Chiu, W., 2000. Reconstruction principles of icosahedral virus structure determination using electron cryomicroscopy. *Micron*, 31(6), pp.687–711.

Timpe, J., Bevington, J., Casper, J., Dignam, J.D. & Trempe, J.P., 2005. Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Current gene therapy*, 5(3), pp.273–284.

Tresset, G., Tatou, M., Le Cœur, C., Zeghal, M., Bailleux, V., Lecchi, A., Brach, K., Klekotko, M. & Porcar, L., 2014. Weighing Polyelectrolytes Packaged in Viruslike Particles. *Physical Review Letters*, 113(12), p.128305.

Tsien, R.Y., 1998. the Green Fluorescent. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, pp.509 – 544.

Tzlil, S., Kindt, J.T., Gelbart, W.M. & Ben-Shaul, A., 2003. Forces and pressures in DNA packaging and release from viral capsids. *Biophysical journal*, 84(3), pp.1616–1627.

Vella, D., Ajdari, A., Vaziri, A. & Boudaoud, A., 2012. Indentation of ellipsoidal and cylindrical elastic shells. *Physical Review Letters*, 109(14), pp.1–5.

Venkatakrishnan, B., Yarbrough, J., Domsic, J., Bennett, A., Bothner, B., Kozyreva, O.G., Samulski, R.J., Muzyczka, N., McKenna, R. & Agbandje-McKenna, M., 2013. Structure and dynamics of adeno-associated virus serotype 1 VP1-unique N-terminal domain and its role in capsid trafficking. *Journal of virology*, 87(9), pp.4974–84.

Verdaguer, N., Ferreroa, D. & Murthy, M.R.N., 2014. Viruses and Viral Proteins. , pp.492–504.

Verdaguer, N., Garriga, D. & Fita, I., 2013. X-Ray Crystallography of Viruses. In *Structure and Physics of Viruses*. pp. 117–144.

Van Vliet, K., Blouin, V., Agbandje-McKenna, M. & Snyder, R.O., 2006. Proteolytic Mapping of the Adeno-associated Virus Capsid. *Molecular Therapy*, 14(6), pp.809–821.

Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Li, J. & Xiao, X., 2005. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature biotechnology*, 23(3), pp.321–328.

Wastson, J.D. & Crick, F.H.C., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171, pp.737–738.

Weiss, K.K., Bambara, R. a. & Kim, B., 2002. Mechanistic role of residue Gln151 in error prone DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT). Pre-steady state kinetic study of the Q151N HIV-1 RT mutant with increased fidelity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), pp.22662–22669.

Welker, R., Hohenberg, H., Tessmer, U., Huckhagel, C. & Kräusslich, H.G., 2000. Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 74(3), pp.1168–1177.

Wilen, C.B., Tilton, J.C. & Doms, R.W., 2012. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(8).

Wilson, T. & Hastings, J.W., 1998. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 14, pp.197–230.

Woodward, C.L., Cheng, S.N. & Jensen, G.J., 2015. Electron Cryotomography Studies of Maturing HIV-1 Particles Reveal the Assembly Pathway of the Viral Core. *Journal of Virology*, 89(2), pp.1267–1277.

Wu, Z., Yang, H. & Colosi, P., 2010. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(1), pp.80–86.

Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A. & Chapman, M.S., 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), pp.10405–10.

Zaitlin, M., 1998. The Discovery of the Causal Agent of the Tobacco Mosaic Disease,

Zandi, R. & van der Schoot, P., 2009. Size regulation of ss-RNA viruses. *Biophysical journal*, 96(1), pp.9–20.

Zinn, E. & Vandenberghe, L.H., 2014. Adeno-associated virus: fit to serve. *Current opinion in virology*, 8C, pp.90–97.

Annexes

Annexe A. Modélisation simple du mode contact de l'AFM a1

Annexe B. *Dot Blots* et la reconnaissance des capsides intactes a3

Annexe A. Modélisation simple du mode contact de l'AFM

Dans le cadre de ma thèse, j'ai mis en place, avec l'aide de Philippe Capdepuy, ingénieur de recherche à *Humanrobotics* et *Generation Robots*, un algorithme permettant à partir d'une surface artificielle à remonter à l'image que donnerait un AFM en *mode contact*, sans les biais apportés par la rétroaction (phénomène de planage). Elle permet ainsi de mettre en évidence le phénomène de convolution par la pointe.

Pour cela, je définis la surface par une nappe d'équation cartésienne de type sur tout le domaine D_S :

$$z = S(x, y)$$

où x et y représentent la position du pixel considéré et z l'altitude de cette surface. En l'absence d'objet, on a simple $z = 0$, quels que soient x et y appartenant à D_S. L'objet est ensuite « déposé » numériquement sur la surface. $S(x,y)$ est alors définie comme la position du maximum sur chacun des pixels (x,y) de D_S.

Par exemple, on peut déposer un core du VIH-1 sur la surface. Pour cela, on le modélise par une structure de longueur $L = 100$ nm, constituée de trois parties : une partie centrale, conique définie par un angle $\alpha = 19°$ ou cylindrique avec $\alpha = 0°$, et deux calottes sphériques dont la plus petite présente un rayon est de 10 nm (Figure 1.a).

La pointe de forme conique, définie par une hauteur h et un demi-angle $\beta = 20°$ se terminant par une calotte sphérique de rayon R tangent au cône. Sa représentation dans l'espace est définie par une équation cartésienne définie par :

$$z = p(h, \beta, R, x_p, y_p, z_p, x, y) \tag{2.2}$$

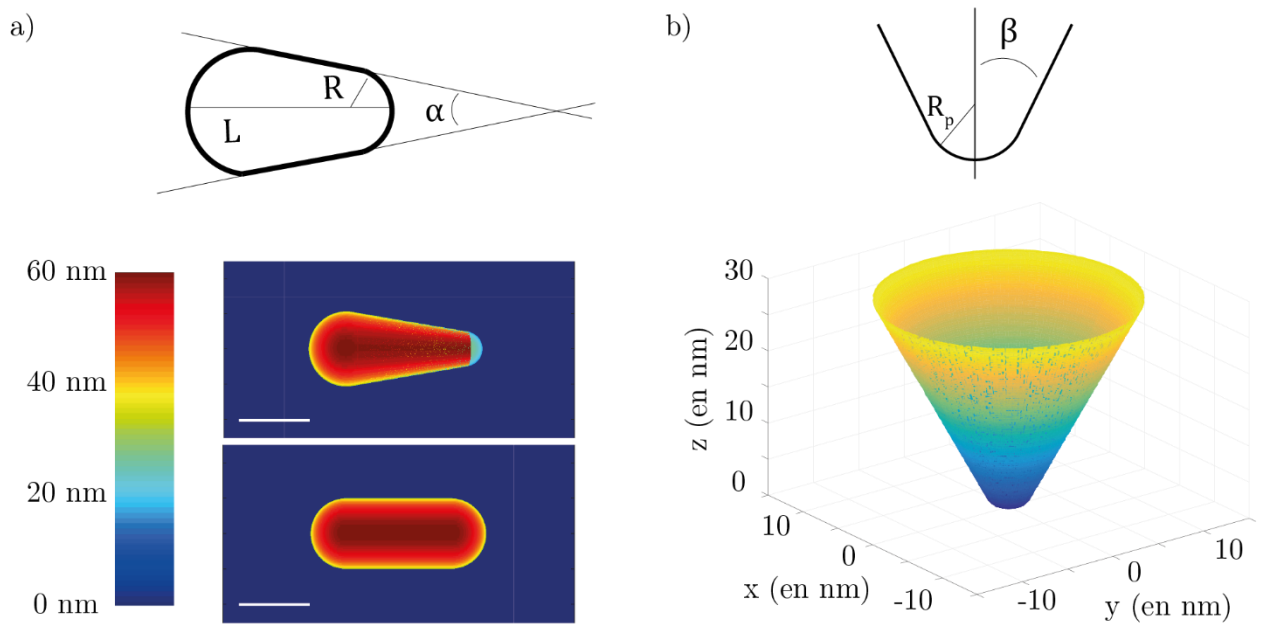


Figure 1 - Modélisation de l'AFM pour l'imagerie de cores du VIH-1.
a) Modélisation d'un core du VIH-1, de longueur L (ici 100 nm), formé d'une partie centrale conique d'angle α (ici 19° en haut et 0° en bas) et de deux calottes sphériques, seul l'un des rayons est un paramètre libre (le rayon de la petite calotte $R = 10$ nm). La barre représente 200 nm.
b) Modélisation d'une pointe AFM, avec R_p (ici 2 nm) et d'angle β (ici 20°).

x_p, y_p et z_p représentent la position du centre de la calotte sphérique. Les paramètres x et y représentent toujours la position du pixel considérée (on utilise le même repère que celui de la surface). La pointe étant de taille finie, le domaine de définition D_P de x et y est un cercle centré autour de x_p et y_p (Figure 1.b).

On place ensuite sur un premier pixel de la surface, dont la position est (x_0,y_0), la pointe de telle sorte que $x_p = x_0$, $y_p = y$ et $z_p = 0$, on compare pour tous points (x,y) du domaine D_P :

$$Im(h, \alpha, R, z_p) = p(h, \beta, R, x_p, y_p, z_p, x, y) - S(x, y) \tag{2.3}$$

Dans cette configuration, le signe de Im est positif à certains endroits et négatif à d'autres, cela signifie que la pointe « traverse » la surface. On ajoute ensuite à $z_p = 0$, la quantité minimale $h(x_0,y_0)$ pour obtenir Im uniquement positif sur tout le domaine D_P. On remonte alors à la hauteur $H_{AFM}(x_0,y_0)$ de l'image obtenue par AFM, en ce point (x_0,y_0) :

$$H_{AFM}(x_0, y_0) = h(x_0, y_0) - R \tag{2.4}$$

En répétant cette opération sur tous les pixels de la surface D_S, on peut reconstruire l'image, $H_{AFM}(x,y)$ pour tout point (x,y) de la surface D_S qu'on aurait obtenu par AFM en *mode contact.*

Dans l'exemple du core du VIH-1, on observe que l'image par AFM nous donne une structure du même type que le core modélisé avec une partie centrale plutôt conique et deux calottes sphériques aux extrémités. Cependant, l'angle du cône est nettement supérieur à celui du core original, et ceci à cause de la convolution par la pointe du core. Les valeurs utilisées pour la modélisation donnent un angle proche de celui obtenu lors de nos résultats expérimentaux sur les cores coniques des particules VIH-1 p8.2 (voir Chap. 3.I.). En outre, l'imagerie AFM semble conserver la forme conique ou cylindrique, ce qui nous autorise à discerner les structures de type cône de celles de type cylindre (Figure 2).

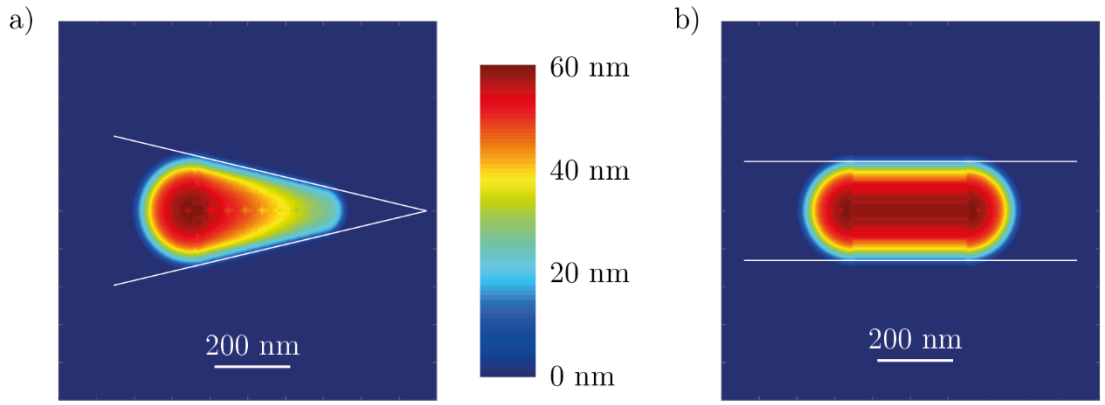


Figure 2 - Images obtenues après modélisation de l'AFM en mode contact.
a) Image obtenue à partir du core de forme conique. La forme est conservée. L'angle est de 27°.
b) Image obtenue à partir du core de forme cylindrique. La forme est conservée. L'angle est de 0°.

Annexe B. *Dot Blots* et la reconnaissance des capsides intactes

Cette expérience a pour objectif de connaitre l'évolution des capsides AAV ayant subi un chauffage et plus particulièrement si elles sont intactes ou non.

Les échantillons chauffés sont déposés dans des puits prévus à cet effet, surmontant une membrane de nitrocellulose. Par un jeu d'aspiration, les capsides sont absorbées en l'état dans la membrane. Par le jeu d'anticorps primaire (B1) se fixant sur des zones internes aux capsides et d'anticorps secondaire (Anti-souris-HRP) se fixant sur B1 et luminescent, on vérifie si les capsides sont intactes (pas de signal) ou déstabilisées (signal).

Le protocole est le suivant :

Transfert sur membrane :

- Découper la membrane de nitrocellulose (8.5cm/11.5cm) et le papier wattman (9cm/13cm).
- Montage du dispositif (humidification de la membrane et du papier wattman)
- Déposer 200µL PBS dans tous les puits et lancer l'aspiration.
- Déposer échantillon suivant le plan de la plaque choisie.
- Stopper l'aspiration quand tout le liquide a été aspiré.
- Sortir et sécher la membrane.

Révélation :

- Saturer la membrane 1h à RT dans PBS-Lait10% + IgG de lapin au 1/100 (solution de saturation)
- Incuber 1h à RT la membrane dans la solution d'anticorps primaire (dilué dans solution de saturation)
- Lavage 3x5' dans PBS
- Incuber 1h à RT la membrane dans la solution d'anticorps secondaire (dilué dans solution de saturation)
- Lavage 1x15', 2x5' dans PBS
- Révélation kit ECL, incubation 5min

Dilution des Anticorps :

Anticorps Primaire :

- B1 : dilution au 1:10^{e}

Anticorps secondaire :

- Anti-souris-HRP : dilution au 1 5000^{e}

Anticorps Saturation :

- Normal Rabbit IgG sc-2027 ; Lot# J0413 Control IgG SantaCruz Biotechnology