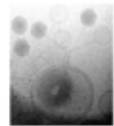




UNE APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE DE L'ASSEMBLAGE DE VIRUS BACTERIENS ET DU TRANSPORT DE LEUR GENOME



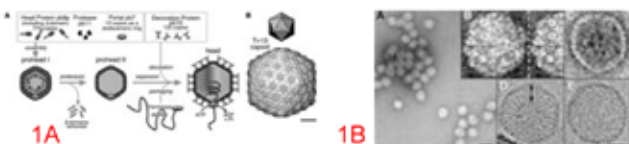
Lucienne Letellier¹, Virgile Viasnoff², Jean François Allemand³

¹ IBMCM, UMR CNRS 8619, Univ Paris Sud-11 ² ESPCI, UMR 7083, Paris ³ ENS Paris, UMR 8550, Lab. Physique Statistique

Contexte et objectifs

Les virus caudés à ADNdb représentent la classe la plus abondante de virus bactériens. Nous avons caractérisé, par des approches pluridisciplinaires, 2 étapes clés de l'infection d'*E. coli* par le syphophage T5 : l'assemblage de sa capsidie et le mécanisme de transfert de son génome chez l'hôte.

Assemblage *in vitro* de la capsidie de T5



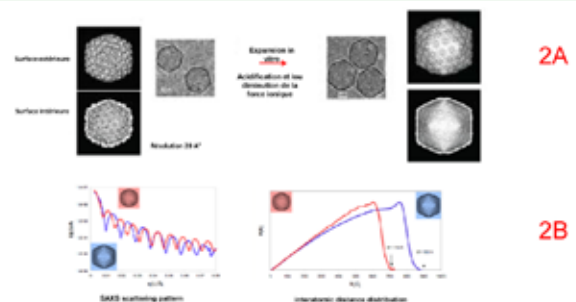
La capsidie icosaédrique du phage T5 est constituée de 775 copies de la protéine **pb8** organisées en hexamères sur les faces et en pentamères sur les angles. A l'un des vertex est localisée la **protéine portale pb7**, pore d'entrée de l'ADN. La capsidie est assemblée *in vivo* selon un processus séquentiel (1A) : la procapsidie I est formée à partir d'un précurseur de pb8 (**pb8p**) incluant une extension N-terminale jouant le rôle d'échafaudage; elle est maturée en procapsidie II par clivage du domaine d'échafaudage par la **protéase pb11** puis subit une expansion lors de l'entrée de l'ADN. Enfin la capsidie est décorée par fixation de **pb10** sur les hexamères.

Assemblage *in vitro* de procapsides I à partir de pb8p¹

L'expression chez *E.coli* de pb8p conduit à la formation d'hexamères et pentamères qui, purifiés certaines conditions ioniques, s'auto-associent pour former une procapsidie de même symétrie (T=13) que celle des capsides formées *in vivo* (1B) (Fig A et B). Le domaine d'échafaudage de pb8 est visible en cryo-EM (Fig. D). Il est clivé *in vitro* par la protéase pb11. La détermination de la structure de cet assemblage par cryo-EM est en cours (A. Huet et al; en préparation)

Expansion des procapsides II *in vitro*²

Des procapsides II ont été isolées à partir d'un mutant d'assemblage de T5. Les conditions de leur expansion ont été mises au point *in vitro*. Leurs structures avant et après expansion ont été résolues par cryo-EM (2A). Les 2 états ainsi que la cinétique d'expansion ont été caractérisés par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) (2B).

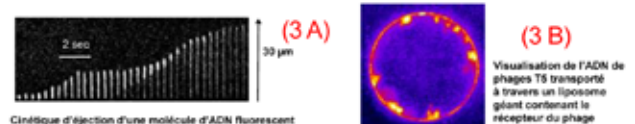


Caractérisation de la protéine de décoration pb10³

pb10 purifiée ne se fixe que sur les hexamères de pb8 des capsides expansées. La coopérativité de cette fixation suggère que pb8 change de conformation. La modélisation de la structure de pb10 obtenue par SAXS montre qu'elle est de forme allongée et organisée en 2 domaines distincts. La détermination des structures cristallines de pb8 et pb10 devrait permettre de comprendre leur rôle dans l'assemblage et l'expansion.

Transfert de l'ADN du phage T5 chez l'hôte

L'interaction du phage T5 avec son récepteur membranaire FhuA provoque l'éjection de l'ADN (121 kpb) hors de la capsidie puis son transport à travers les membranes de l'hôte. L'éjection a été suivie en temps réel par imagerie de fluorescence de molécules individuelles d'ADN (3A). Elle est discontinue avec des pauses et sa vitesse est variable. La non monotonie du processus pourrait être due à la structuration particulière de l'ADN condensé dans la capsidie⁴. L'étape de transport de l'ADN à travers des membranes a été visualisée par microscopie confocale sur des vésicules géantes (GUV) reconstituées avec FhuA (3B).



Impact, publications

- 1: A. Huet, J. Conway, L. Letellier, P. Boulanger, *J. Virol.* 2010, 84, 9350-9358
 - 2 et 3: O. Preux et al. en préparation
 - 4: N. Chiaruttini, M. de Frutos, E. Augarde, P. Boulanger, L. Letellier, V. Viasnoff. *Biophys. J.*, 2010, 99, 447-455
- Les travaux ont donné lieu à 3 stages de master 2, un diplôme CNAM et 3 thèses. Un post doctorant (A. Huet) a été financé pendant 3 ans sur ce projet.