

# Translocation d'acides nucleiques au travers d'une bicouche lipidique : du nanopore au bacteriophage

Nicolas Chiaruttini

▶ **To cite this version:**

Nicolas Chiaruttini. Translocation d'acides nucleiques au travers d'une bicouche lipidique : du nanopore au bacteriophage. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2010. Français. NNT : . pastel-00545086

**HAL Id: pastel-00545086**
**https://pastel.hal.science/pastel-00545086**

Submitted on 9 Dec 2010

**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.

université PARIS DIDEROT PARIS 7

**Ecole Doctorale Matière Condensée et Interfaces**
**ED 518**

# Translocation d'acides nucléiques au travers d'une bicouche lipidique : du nanopore au bactériophage

## THÈSE

soutenu le 18 Novembre 2010

pour l'obtention du

**Doctorat de Physique de l'UNIVERSITE PARIS. DIDEROT (Paris 7)**

**( Interface Physique Biologie)**

par

Nicolas CHIARUTTINI

**Composition du jury**

| | |
|---|---|
| *Président :* | Lucienne LETELLIER |
| *Rapporteurs :* | Rob PHILLIPS<br>Jean-François ALLEMAND |
| *Examinateurs :* | Jean-Marc DI MEGLIO<br>Paulo TAVARES |
| *Directeur de thèse :* | Ulrich BOCKELMANN |
| *Co-directeur de thèse :* | Virgile VIASNOFF |

**Laboratoire de Nanobiophysique ESPCI — UMR Gulliver 7083**

ESPCI ParisTech

# Résumé

Ce travail porte sur l'étude expérimentale de deux mécanismes de translocations d'acides nucléiques au travers d'une membrane lipidique : la translocation, forcée électrophorétiquement, d'oligomères au travers d'un pore d'alpha-hémolysine et la translocation passive d'un ADN génomique hors de la capside du bactériophage T5.

La première partie de la thèse porte sur l'ouverture de molécules d'ADN double brin à travers le nanopore d'alpha hémolysine. Les temps de passage individuels de molécules d'ADN à travers le pore sont mesurés expérimentalement en fonction de la séquence, de la longueur et de la force appliquée sur l'ADN. Les distributions obtenues sont confrontées à un modèle décrivant le passage de l'ADN par la diffusion d'une fourche d'ouverture dans un paysage énergétique unidimensionnel, déterminé par la séquence de la molécule.

La deuxième partie porte sur un système *in vitro* reconstituant les étapes initiales d'infection du bactériophage T5. L'interaction de T5 avec son récepteur membranaire FhuA purifié en détergent, génère une séquence d'événements qui conduit à l'éjection du génome viral hors de la capside : (i) fixation du récepteur ; (ii) activation conduisant à l'ouverture d'un canal d'ADN ; (iii) éjection de l'ADN. La dynamique des trois étapes est mesurée à l'aide d'expériences en population et en virus unique. La dernière étape est comparée à un modèle physique qui révèle une dynamique fortement hors d'équilibre à l'initiation de l'éjection. Enfin, FhuA est reconstitué dans des vésicules lipidiques géantes afin de suivre l'éjection par microscopie de fluorescence et par électrophysiologie à travers une membrane lipidique.

**Mots-clés** *bactériophage, virus, éjection d'ADN, infection, T5, FhuA, in vitro, relation hôte/virus, récepteur membranaire, membrane lipidique, nanopore, alpha-hémolysine, translocation d'ADN, ouverture d'ADN.*

# Summary

This work highlights two nucleic acid translocation mechanisms through a lipid membrane : first the electrophoretically driven translocation of oligomers through alpha-hemolysin nanopore, then the passive translocation of genomic DNA outside T5 bacteriophage capsid.

The first part of this thesis focuses on double-stranded DNA molecules unzipping through the alpha-hemolysin nanopore. The translocation time of single molecules through the pore are experimentally measured as a function of DNA sequence, DNA length and the applied force. Distributions obtained are compared with a model describing DNA translocation as a diffusion of an opening fork in a 1D energy landscape determined by the sequence of the molecule.

The second part deals with an *in vitro* system reconstituting the initial steps of bacteriophage T5 infection. The interaction of T5 with its detergent purified membrane receptor FhuA generates a sequence of events leading to the release of the viral genome out of the capsid : (i) receptor binding, (ii) activation leading to the opening of a DNA channel, (iii) DNA release. The dynamics of the three steps is measured using both bulk and single virus assays. The DNA release step is compared to a physical model which exhibits a largely out of equilibrium dynamics. Finally, FhuA is reconstituted into giant lipid vesicles to monitor the ejection through a lipid membrane using fluorescence microscopy and electrophysiology.

**Keywords** *bacteriophage, virus, DNA ejection, infection, T5, FhuA, in vitro, host/virus relation, membrane receptor, lipidic membrane, nanopore, alpha-hemolysin, DNA translocation, DNA unzipping*.

# Remerciements

Le thésard en doute parfois, mais la thèse a bien une fin ! Comme le veut la tradition, le premier paragraphe de la thèse est aussi le dernier à être rédigé. Avant de “refermer le rideau“, voici venu le temps de remercier l'ensemble des gens qui m'ont aidé tout au long de ce travail de trois années.

Une thèse est un travail de longue haleine, remplie de nombreux (demi-)succès et d'échecs, qui sont autant de tâtonnements nécessaires avant de trouver la voie, ou plutôt une voie, vers ce sommet extatique qu'est l'obtention du titre de docteur... Je commence par les institutions en remerciant celles qui m'ont permis de “préparer l'expédition“ : le ministère de la recherche, via une allocation ministérielle qui a permis de remplir mon sac à dos, l'agence nationale de la recherche qui a permis l'achat de l'équipement nécessaire à cette aventure, et notre fameux bureau national des guides (le CNRS), dont sont issus mes directeurs de thèse, Ulrich Bockelmann et Virgile Viasnoff.

Je tiens à les remercier de m'avoir confié ce sujet de thèse et de m'avoir laissé une très grande liberté favorisant la prise d'initiative. Ils ont par ailleurs toujours été là quand j'avais besoin de leur aide.

J'ai énormément apprécié de travailler avec Virgile, plein d'allant et de ressources, celui dont le chant traverse les montagnes (ou au moins les cloisons des bureaux) pour propager la bonne humeur. C'est un guide aux talents multiples ; digne successeur d'Angus McGyver, les poches de son sac à dos (les tiroirs de son bureau) contiennent toujours le petit bout de schtroumpf qui manque à la manip. Tout ? Vraiment ? Non, car les 50 derniers points de la courbe, ceux que je dois acquérir avant de publier, résistent encore et toujours aux manips...

La thèse n'est pas tout à fait une course de montagne. Tout au long de celle-ci, les gens sont là pour donner un coup de main dans les passages délicats.

Merci aux cordées voisines, mes camarades de l'équipe NBP : Pierre, qui m'a devancé, et qui est parti exercer ses talents de cuistot (entre autres) à Amsterdam ; Ismaïl et Antoine qui devraient arriver à bon port d'ici peu. Courage pour l'assaut final "La route est droite, mais la pente est forte" ! Je me rappellerai de ces petites courses de l'inutile (ou pas) avec Antoine, parmi lesquelles se trouve le mont Nanoravioli ou le pic ABCD conseillé par Aurélie (pic qui se grimpe en moins de temps qu'il n'en faut pour taper l'alphabet, c'est-à-dire moins de 1s63). Merci Ismaïl, mon co-bureau préféré, caché derrière son paravent d'écrans et adepte comme moi des compétitions de cynisme ; Julien, co-nanoporiste exilé à Dublin, Elise, ma seule et unique stagiaire, Chen-Yu, Debjani et Carlotta la vétérante.

Je n'oublie pas les gens situés sur l'altiplano, les compañeros de chez MMN et de PCT, mes fréquentes visites posant le dilemme du choix entre les cafés en boîte high tech de MMN ou le café écolo-roots des hippies de chez PCT. Pour les moments partagés ensemble, les discussions scientifiques (ou pas), et le concert de Popa Chubby, merci à Serge, Falko, Claire, Philippe, Boris, Annick, Avin, et les autres membres de ces grandes équipes qui j'espère ne m'en voudront pas de ne pas tous les citer. Merci aussi à Elie, grand chef de l'UMR Gulliver, pour son attention bienveillante, à Gabriele et Khadija, les gardiennes de l'enfer administratif,

et enfin Fabrice, disponible et efficace quand il le fallait ("Tu veux pas me sauver la vie ?").

Si l'étage du dessus est l'altiplano, mes collègues de l'IBBMC sont en pleine forêt amazonienne. Merci aux wonderwomen d'Orsay : les fidèles des phages, Lucienne et Pascale, ainsi que Marta, physicienne passée du côté obscur. C'est bien sûr grâce à elles et à la collaboration initiée par Virgile que j'ai pu travailler sur les phages, ce qui a été un vrai plaisir. Quelques regrets toutefois, d'une part l'impression de ne pas avoir eu le temps d'apprendre en biologie autant de choses que je l'aurais souhaité, d'autre part le sentiment de mettre arrêté à quelques mètres du (d'un) sommet... Pourvu que nous retrouvions une occasion d'aller planter le drapeau !

Merci aux nanoporistes que j'ai pu côtoyer : Juan, Benjamin, Zahra, Jérémy et Guillaume. Je garde un excellent souvenir des conférences sur l'île de Berder, et je remercie particulièrement Loïc Auvray et Jérôme Mathé pour la bourse qui m'a été accordée lors de la dernière édition.

J'ai rencontré au cours de ces trois années, et même avant, plusieurs membres de l'institut Curie. Parmi ceux là, je voudrais remercier ceux que je considère comme mes "hardis pionniers" : Pierre Nassoy et Damien Cuvelier, qui m'ont laissé un excellent souvenir de mon premier contact avec la recherche, ce qui m'a incité à continuer dans la grande aventure de la biophysique. Plus récemment Gil Toombes et Sophie Aimon m'ont aidé en fournissant un peu de matériel (j'évite de faire la liste, de peur d'avoir à payer la note) et quelques idées fructueuses. En "équivalent escalade", ils m'ont indiqué la prise qui a transformé un 7b en 6c : la voie passe de l'impossible au "possible après travail" (pour moi)...

Merci aux autres personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler ou d'échanger ponctuellement avec plaisir : François Nédélec, Dorothée Jary, Bruno Le Pioufle, Damien Baigl, Frédéric Pincet, Nicolas Rodriguez, Sophie Cribier, Mariela Subileau, Pierre Jacquot, Alexis Huet et mes futurs collaborateurs Genevois : Aurélien Roux, Sandrine, Saleem et Sylvain.

J'ai aussi pu prendre le rôle du guide, lors de mon monitorat effectué à Paris 7, dans les TDs de mécanique première année. Nous avons fait notre possible avec Joël, Jean-Louis et le reste de l'équipe d'enseignants, mais la tâche n'était pas facile. Au passage, je ne remercie pas la ligne de bus 27, dont la ponctualité m'a obligé à courir prendre le taxi (l'équivalent d'un remonte-pente) de trop nombreuses fois.

Je tiens à remercier les sept sages responsables de l'"homologation" de la course, pour avoir consciencieusement relu et apporté des commentaires sur ce "compte-rendu" que vous tenez entre les mains (ou lisez sur votre écran) : Jean-François Allemand et Rob Phillips qui ont accepté d'être rapporteur ainsi que Jean-Marc Di Meglio et Paulo Tavares qui ont participé à mon jury de thèse.

La métaphore "montagne" de ces remerciements est faite en souvenir de mon père et pour ma famille. J'ai quelques antécédents familiaux de ce côté là et du côté scientifique, mon frère François essayant de m'y initier dès mon plus jeune âge, et sans qui je ne serais sûrement resté qu'un stupide animal sottement occupé à m'adonner aux vains plaisirs de l'amour dans les folles prairies de l'insouciance. [1] Un grand merci à ma mère Lucienne, garde-handicapé et relectrice correctrice en chef, qui, je le sais, sera encore désolée de trouver une bonne dizaine de fautes d'orthographe ici et là. Enfin merci à mon frère Vincent, à Aurélie, ainsi qu'à la famille d'Eléonore, mes piliers et indéfectibles soutiens de la vie parisienne, et ce depuis la prépa ! Eléonore, la rudesse montagnarde me retient d'épancher mes sentiments en place publique. Je t'avouerai juste que j'aurais dû penser plus tôt à tremper ton passeport pour que l'on puisse passer plus de temps ensemble.

Enfin, pour toutes les activités annexes qui ont contribué à rendre ces trois années encore plus enrichissantes, je tiens à remercier (dans un ordre tout à fait aléatoire) : ManuX, Ricou,

1. cf Pierre Desproges "...alors que la Science, et la Science seule, a pu, patiemment, au fil des siècles, (nous) apporter l'horloge pointeuse et le parcmètre automatique sans lesquels il n'est pas de bonheur terrestre possible."

Ferdi, Frérot, Guillaume, Antoine, David, Maxime, la bande du M2 IPB, dont mes voisins immédiats Julien et Laurent, le Poil O'Brass Band, Bastien, Foxy, Alexis, Kyu, Pierre, Lila, Clotilde, Luc, Lina, Stéphane, Aude.

Merci à ceux que j'ai côtoyés agréablement pendant ces années à quelque titre que ce soit et ceux qui ne m'en veulent pas de les avoir oubliés...

# Table des matières

**Table des matières** xiii

**Liste des notations** 1

**1 Introduction** 2

**I Translocation d'acides nucléiques au travers d'un nanopore d'alpha hémolysine** 4

**2 Présentation des expériences de nanopore** 8
2.1 Les nanopores, des compteurs Coulter à l'échelle moléculaire . . . 8
2.2 Structure et propriétés de l'alpha hémolysine . . . 10
2.3 Ordres de grandeurs du courant et des forces appliquées . . . 10
2.4 En pratique . . . 11

**3 Expériences antérieures et modèles d'ouverture de l'ADN à travers un nanopore** 14
3.1 Expériences antérieures de dézippage d'ADN à travers le nanopore d'alpha hémolysine . . . 14
3.1.1 Les courts hairpins (3 à 8 pb), sans poignée simple brin, s'ouvrent en une étape correspondant à un saut d'énergie égal à l'enthalpie libre d'appariement de l'ADN en solution . . . 14
3.1.2 La présence d'une poignée simple brin sur les hairpins permet d'exercer une force électrophorétique qui facilite le dézippage de la molécule . . . 15
3.2 Ouverture de courts duplex d'ADN : modèle de Kramers . . . 15
3.3 Ouverture de longs duplex d'ADN . . . 17
3.3.1 Un modèle d'ouverture séquentielle de l'ADN à travers un nanopore . . . 17
3.3.2 Une ouverture séquentielle des longues molécules d'ADN ? Conception de l'expérience. . . . 19

**4 Expériences et résultats** 20
4.1 Article : Probing DNA base pairing energy profiles using a nanopore (Eur. Biophys. J., 2008) . . . 20
4.2 Discussion . . . 31
4.2.1 La distribution des temps de translocation est pluriexponentielle . . . 31
4.2.2 Le modèle présente une dépendance en voltage beaucoup trop rapide par rapport aux expériences . . . 31
4.2.3 Une force fluctuante ? . . . 32

4.3 Influence d'autres paramètres tel que l'élasticité de la molécule d'ADN et les interactions pore/ADN . . . 32
4.4 Article : Force fluctuations assist nanopore unzipping of DNA (J. Phys. Condens. Matter, 2010) . . . 33

**5 Conclusion** **45**

**II Etudes *in vitro* de l'infection du bactériophage T5** **47**

**6 Introduction aux bactériophages** **51**
6.1 La virosphère . . . 51
6.2 Les bactériophages . . . 53
6.2.1 La découverte . . . 53
6.3 Evolution et écologie . . . 53
6.4 Classification, morphologie et structure . . . 54
6.4.1 Les *Caudovirales* . . . 54
6.4.2 Les familles . . . 56
6.4.3 Généralités du cycle viral des *Caudovirales* (voir figure 7.1 pour le cycle de T5) . . . 56

**7 Présentation du bactériophage T5** **59**
7.1 Un coliphage lytique (figure 7.1) . . . 59
7.2 Structure (figure 7.2) . . . 59
7.3 Génome . . . 62
7.3.1 Souches de T5 . . . 62
7.4 FhuA, protéine de la membrane externe d'*E. coli*, récepteur de T5 . . . 62
7.4.1 Fonction de FhuA chez *E. coli* . . . 62
7.4.2 FhuA, récepteur du bactériophage T5 . . . 62
7.5 Particularités de T5 . . . 63
7.5.1 Des nicks codés génétiquement le long du génome. . . . 63
7.5.2 *In vivo*, un transfert de l'ADN pendant l'infection en deux étapes . . . 63
7.6 Informations supplémentaires . . . 64

**8 Cinétique globale de l'éjection de l'ADN d'une population de phages.** **65**
8.1 Principe de la mesure . . . 65
8.2 Conditions expérimentales . . . 66
8.3 Résultats . . . 66
8.3.1 Cinétique typique . . . 66
8.3.2 Dépendance de la cinétique en fonction de la concentration en récepteur 67
8.4 Schéma réactionnel du processus d'éjection . . . 69
8.4.1 Simplifications et solution analytique du schéma réactionnel . . . 69
8.5 Ajustement des données expérimentales . . . 70
8.6 L'étape d'activation est l'étape limitante de la cinétique . . . 72
8.6.1 Dispositif expérimental . . . 72
8.6.2 Résultats . . . 72
8.6.3 Comparaison cinétique en population / cinétique en virus unique . . . 73
8.7 Limites du schéma réactionnel et interprétation . . . 74
8.7.1 T5st(0) : l'étape d'activation est multiexponentielle . . . 74
8.7.2 Etude du mutant sans nick conditionnel de T5 : T5amHA911 . . . 75

8.7.3 Comparaison T5st(0)/T5amHA911 . . . 78
8.7.4 Perspectives . . . 78

**9 Physique du confinement de l'ADN dans la capside : théorie et expériences 79**
9.1 Positionnement physique du problème . . . 80
9.2 Structure de l'ADN confiné dans la capside . . . 80
9.2.1 Capside pleine $\rho \approx 0.5$ . . . 81
9.2.2 Capside partiellement remplie $0 < \rho < 0.5$ . . . 82
9.3 Calcul de l'énergie libre de l'ADN dans les capsides . . . 83
9.3.1 Modèle semi-empirique . . . 85
9.4 Expériences antérieures, état de l'art . . . 92
9.4.1 Mesure de la force exercée par l'ADN dans les expériences d'encapsidation 92
9.4.2 Inhibition d'éjection par pression osmotique . . . 93
9.5 Conclusion . . . 97

**10 Cinétique de translocation du génome 98**
10.1 Résultats expérimentaux : une éjection d'ADN rapide, non monotone . . . 100
10.2 Effet de la valence des contre-ions . . . 100
10.3 Influence des nicks de T5 sur l'étape d'éjection . . . 103
10.3.1 Le modèle : un nick - une pause ? . . . 103
10.3.2 Cinétique comparée T5st(0) / mutant nickless T5amHA911 . . . 103
10.4 Discussion . . . 105
10.4.1 Mobilité effective de l'ADN dans la capside . . . 105
10.4.2 Interprétation de la mobilité effective . . . 107
10.4.3 Une dynamique d'éjection hors équilibre ? . . . 107
10.5 Une éjection en boucle . . . 108
10.6 Conclusion . . . 111

**11 L' "infection" à travers une membrane lipidique : vers un système *in vitro* plus réaliste 113**
11.1 Objectifs . . . 113
11.1.1 Membranes lipidiques : vocabulaire . . . 115
11.2 Premiers déboires expérimentaux . . . 115
11.3 Reconstitution de FhuA en vésicule unilamellaire géante . . . 116
11.4 Activité de FhuA dans les vésicules géantes . . . 116
11.4.1 Fixation spécifique des phages sur les vésicules géantes . . . 117
11.4.2 Insertion de l'ADN dans des vésicules géantes contenant FhuA . . . 117
11.4.3 Perte d'activité de FhuA liée à sa reconstitution en GUV . . . 117
11.5 Réalisation d'un dispositif de mesure optique et électrophysiologique à partir de vésicules unilamellaires géantes (GUVs) . . . 119
11.5.1 Mesure de la diffusion des phages sur une membrane . . . 119
11.5.2 Suivi de l'éjection . . . 121

**12 Discussion 124**
12.1 Principaux résultats . . . 124
12.2 Rôle biologique de la pression intracapside . . . 125
12.2.1 Perspectives *in vitro* . . . 126
12.3 Et *in vivo* ? . . . 127

**III Protocoles** **129**

**13 Protocoles formation de bicouches planes** **131**
13.1 Structure des bicouches lipidiques . . . 131
13.2 Lipides utilisés . . . 131
13.3 Indications générales pour la manipulation des lipides . . . 132
13.4 Fabrication de bicouches peintes (figure 13.2) . . . 132
13.4.1 Préparation des aliquots de lipides . . . 133
13.4.2 Protocole de fabrication . . . 133
13.5 Formation de membranes planes à partir de vésicules unilamellaires géantes (GUVs) . . . 135
13.5.1 Motivation . . . 135
13.5.2 Principe . . . 135
13.5.3 Choix techniques . . . 137
13.5.4 Réalisation . . . 137
13.5.5 Discussion sur la stabilité de la membrane . . . 142
13.5.6 Visualisation des fluctuations membranaires par RICM . . . 152

**14 Protocole fabrication de vésicules unilamellaires géantes (GUVs)** **154**

**15 Protocoles bactériophage T5** **156**
15.1 Mise en place d'un assay *in vitro* d'éjection de l'ADN de T5 en virus unique . . . 156
15.1.1 Principe . . . 156
15.1.2 Difficultés expérimentales . . . 161
15.1.3 Protocoles . . . 163
15.2 Etude de la cinétique d'éjection en population par fluorimétrie . . . 170
15.3 Marquage fluorescent des phages T5 . . . 177
15.3.1 Marquage de l'ADN intra capside par Yo-Pro I . . . 177
15.3.2 Marquage global des protéines de phages . . . 177
15.4 Marquage fluorescent de FhuA . . . 181
15.4.1 Protocole . . . 181
15.4.2 Activité . . . 182
15.5 Reconstitution de FhuA en vésicule lipidique . . . 183
15.5.1 Reconstitution de FhuA en petites vésicules unilamellaires (SUVs) . . . 183
15.5.2 Reconstitution de FhuA en vésicules unilamellaires géantes (GUVs) . . . 186

**16 Protocoles Nanopores** **188**
16.1 Production des molécules d'ADN . . . 188
16.1.1 Liste des oligos d'ADN . . . 188
16.1.2 Production des hairpins Hp1 à 5 . . . 188
16.1.3 Production des duplex $\lambda$-RLS et $\lambda$-SLS . . . 189
16.2 Réalisation des expériences d'ouverture en pore unique . . . 189
16.2.1 Présentation du montage (figure 16.2) . . . 189
16.2.2 Préparation des aliquots d'alpha hémolysine . . . 190
16.2.3 Formation d'une bicouche lipidique plane (BLM) . . . 190
16.2.4 Insertion d'un pore unique d'$\alpha$-hémolysine . . . 191
16.2.5 Ajout des molécules d'ADN . . . 191
16.2.6 Acquisition des données . . . 191

**Bibliographie** **193**

**A Informations sur T5** **203**
A.0.7 Protéines structurales de T5 . . . . . 203

**B Solutions** **205**
B.1 Tampon phage 1x . . . . . 205
B.2 Tampon phage AB 1x . . . . . 205
B.3 Tampon phage divalent . . . . . 205
B.4 Tampon nanopore . . . . . 205

# Liste des notations

Nous avons regroupé ci-dessous les principales notations employées dans les différents chapitres du document. Dans la mesure du possible, nous avons tenté de conserver les mêmes notations d'un chapitre à l'autre.

## Notations générales

| | |
|---|---|
| *DMSO* | dimethyl sulfoxide |
| *OG* | octyl $\beta$-D-glucopyranoside |
| *LDAO*, *DDAO* | N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide |
| *pfu* | plaque forming unit |
| *T*5*st*(0) | mutant thermostable de T5 |
| *T*5*amHA*911 | mutant conditionnel nickless T5 |
| *bp*, *kpb* | paire de base, kilo paires de base |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| *SUV* | Petite vésicule unilamellaire (Small Unilamellar Vesicle) |
| *GUV* | Vésicule unilamellaire géante (Giant Unilamellar Vesicle) |
| *BLM* | Bicouche lipidique "noire" (Black Lipid Membrane) |
| *LPS* | lipopolysaccharides |
| *RICM* | Reflection Interference Contrast Microscopy |
| *cmc* | concentration micellaire critique |
| *ED*, $dd H_2O$ | Eau distillée, eau désionisée |

# Chapitre 1

# Introduction

J'ai effectué ma thèse dans le laboratoire Nanobiophysique de l'ESPCI ParisTech [1], alors nouvellement créé. Le laboratoire a bénéficié de financements provenant de l'ESPCI et de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) via le programme "Physique et Chimie du Vivant". De multiples thématiques de recherche ont pu être abordées, dont les deux sujets présentés ici.

Cette thèse est un travail essentiellement expérimental, et, le laboratoire étant jeune, une partie conséquente du travail a consisté à mettre en place les montages expérimentaux ; depuis l'achat du matériel jusqu'à l'écriture des programmes d'analyse de données, en passant par l'intégration et l'interfaçage du matériel.

Une autre partie importante du travail fut l'apprentissage de certaines techniques de biologie moléculaire et de biochimie, dans un esprit "expériences en molécules uniques". En plus du savoir-faire du laboratoire, nous avons bénéficié d'un environnement privilégié grâce à la proximité de nombreux laboratoires de biophysiques sur l'ensemble de la montagne Sainte Geneviève.

Ma première année de thèse a été consacrée à des travaux sur les translocations de molécules d'ADN dans l'$\alpha$ hémolysine, dont les résultats sont présentés dans la première partie. Les deux années suivantes, ainsi que mon stage initial de M2, ont été focalisées sur l'étude du bactériophage T5 ; elles constituent la deuxième partie de mon manuscrit. Le travail sur T5 s'est effectué en étroite collaboration avec le laboratoire "virologie bactérienne" de l'IBBMC [2].

Ces deux sujets de recherche paraissent relativement éloignés. Ils sont néanmoins proches du point de vue expérimental, ce qui justifie leur rapprochement puisque la partie expérimentale est la plus coûteuse en terme de temps. L'ensemble des protocoles expérimentaux de ces deux sujets sont regroupés dans la troisième partie du manuscrit.

Les résultats principaux obtenus dans le cadre de ma thèse ont mené aux conclusions

1. Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris.
2. L'Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire (UMR 8619) est une unité mixte CNRS-Université Paris-Sud 11.

suivantes :

Le travail sur l'ouverture des molécules d'ADN à travers le nanopore d'$\alpha$-hémolysine a permis de montrer la complexité d'un tel phénomène. Les modèles physiques simples publiés jusqu'à présent expliquent partiellement la diversité des observations expérimentales, notamment en ce qui concerne les effets de séquence, de longueur de l'ADN et de géométrie du pore.

Le travail sur T5 a permis de décrypter la cinétique du processus d'éjection de l'ADN du phage T5 *in vitro*. Nos résultats ont permis de remettre en cause un modèle de cinétique d'éjection spécifique à T5 et de comprendre l'éjection selon un schéma plus général, similaire à ce qui a été observé pour le phage lambda.

Enfin, nous avons mis en place un dispositif original de patch clamp planaire permettant des mesures simultanées de courant électrique et de fluorescence sur des membranes lipidiques planes. Des premiers résultats encourageants ont été montrés sur T5 et ce système devrait pouvoir être exploité dans d'autres situations expérimentales.

Première partie

# Translocation d'acides nucléiques au travers d'un nanopore d'alpha hémolysine

# Présentation des travaux de la première partie

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule support de l'information génétique dans le vivant. Il s'agit d'un hétéropolymère constitué de quatre bases azotées (Adénine, Thymine, Guanine et Cytosine) liées de manière covalente le long d'une chaîne ribo-phosphatée chargée négativement. Les bases azotées de l'ADN s'assemblent deux à deux, l'adénine (**A**) étant complémentaire de la thymine (**T**) et la guanine (**G**) de la cytosine (**C**). Dans la nature l'ADN est essentiellement présent sous la forme de deux brins complémentaires s'assemblant de manière antiparallèle en double hélice. L'hybridation des brins est assurée via les liaisons faibles (liaisons hydrophobes et liaisons hydrogènes) entre les paires de bases complémentaires. La liaison A-T est plus faible que la liaison G-C car elle possède une liaison hydrogène en moins (2 contre 3).

La molécule d'ADN peut être dénaturée de différentes manières, les liaisons faibles entre brins d'ADN antiparallèles étant alors rompues.

La dénaturation peut être thermique. Il faut typiquement chauffer à 90°C pour séparer deux longues molécules d'ADN dans des conditions standards. La température de fusion de l'ADN, c'est-à-dire la température à laquelle les deux brins se séparent, traduit la stabilité de leur association. Pour une solution donnée, les paramètres principaux affectant la stabilité des molécules sont la longueur de la molécule et le rapport du nombre de paires en G-C par rapport au nombre de paires A-T.

En 1997 des études [33, 9] ont permis de dénaturer mécaniquement la double hélice d'une unique molécule d'ADN, en tirant chaque brin de part et d'autre à température ambiante. Cette expérience a permis de révéler une force seuil de l'ordre de 12 piconewtons nécessaire à l'ouverture de la double hélice. De même que la température de fusion donne une idée de la stabilité de la molécule, le signal force longueur-mesuré lors de la dénaturation mécanique est parsemé de creux et de bosses qui révèlent la stabilité locale de la molécule. Ce paysage est dominé par la séquence de l'ADN : schématiquement, les zones riches en G-C créent des points de blocages lors de l'ouverture.

Plus récemment [129, 54, 86, 117, 93], il a été démontré qu'il est possible d'ouvrir de petites molécules d'ADN en les forçant à passer à travers un trou nanométrique de taille intermédiaire entre l'ADN simple brin et l'ADN double brin. La molécule d'ADN chargée est tirée par une force électrostatique, et la molécule se dénature afin de passer au travers du nanopore.

La structure de l'ADN ainsi que les trois types de dénaturation sont résumés figure 1.1.

La dénaturation de l'ADN à travers un nanopore fait l'objet de la première partie de ma thèse. Nous avons étudié l'influence de la séquence sur la dénaturation dans les nanopores.

Le chapitre 2 introduit les expériences sur les nanopores. Le principe de la technique expérimentale est présenté. Le chapitre 3 décrit les expériences de dénaturation de l'ADN par translocation, antérieures à ce travail de thèse. Deux modèles théoriques d'ouverture sont décrits, notamment un modèle théorique d'ouverture de longs brins d'ADN qui fixe le cadre général vis à vis duquel nous avons conçu nos expériences. Le chapitre 4 présente, à travers deux articles, les principaux résultats que nous avons obtenus et qui remettent en cause le modèle présenté précédemment. Le chapitre 5, présente nos principales conclusions et donne un aperçu de la complexité des phénomènes qu'il faudrait prendre en compte pour comprendre le dézippage de l'ADN dans les nanopores.

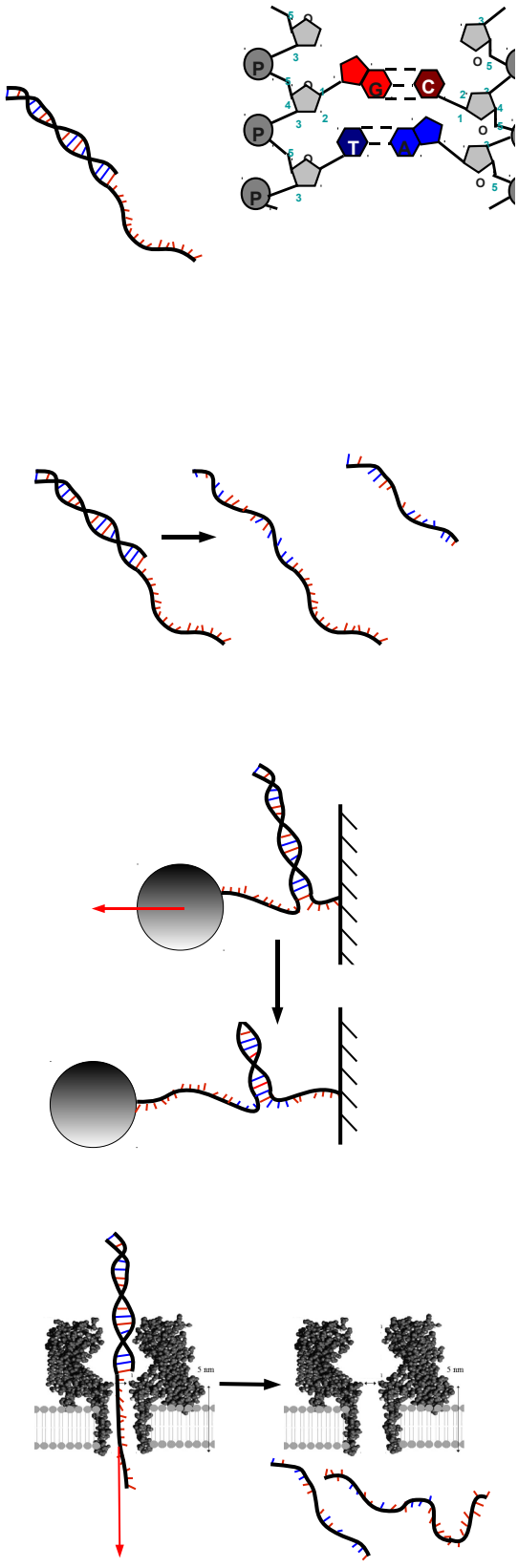



**Figure 1.1** – Structure de l'ADN et trois techniques de dénaturation de la double hélice d'ADN ; dénaturation thermique, dénaturation mécanique par application d'une force au bout d'un brin d'ADN et par application d'une force électrostatique dans un nanopore.

# Chapitre 2

# Présentation des expériences de nanopore

## 2.1 Les nanopores, des compteurs Coulter à l'échelle moléculaire

Un compteur Coulter est un appareil permettant de détecter électriquement le passage d'un objet à travers un trou de taille semblable à cet objet. La détection s'effectue via la mesure du courant électrique passant à travers ce trou. A potentiel constant, lorsqu'un objet passe à travers le trou, la résistance électrique du circuit augmente brutalement, le courant chute, signant ainsi le passage de l'objet. [1]

Bien que les dimensions soient extrêmement réduites, les expériences de nanopore suivent en grande partie ce principe. Un pore unique formé par une protéine, l'$\alpha$-hémolysine, est inséré dans une bicouche lipidique, le tout baigné dans une solution saline concentrée ($KCl$ à $1M$). La membrane lipidique dans laquelle le pore est inséré est isolante électriquement. Une différence de potentiel électrostatique ($100mV$ typiquement) est appliquée de part et d'autre de la membrane à l'aide d'électrodes d'argent, induisant un courant ionique de l'ordre de la centaine de picoampères. Par électrophorèse, les molécules chargées diffusant à proximité du pore, tels les acides nucléiques, sont entraînées à l'intérieur de celui-ci. Sur le schéma 2.1 on peut voir un duplex d'ADN (ADN double brin) se faire piéger dans le nanopore via une extrémité simple brin dépassant du double brin. Le courant électrique chute de manière concomitante à ce piégeage car la molécule d'ADN obstrue le pore. La différence de potentiel produit une force sur l'ADN, qui est une molécule chargée. Si la force électrostatique est suffisamment grande la molécule d'ADN est dénaturée et passe à travers le pore. Le courant électrique revient ensuite à son niveau initial.

Typiquement, au cours d'une expérience, des centaines de signaux de translocations de molécules à travers le pore de ce type sont enregistrés puis analysés.

1. En biologie, de tels compteurs sont utilisés en routine afin de dénombrer des cellules.

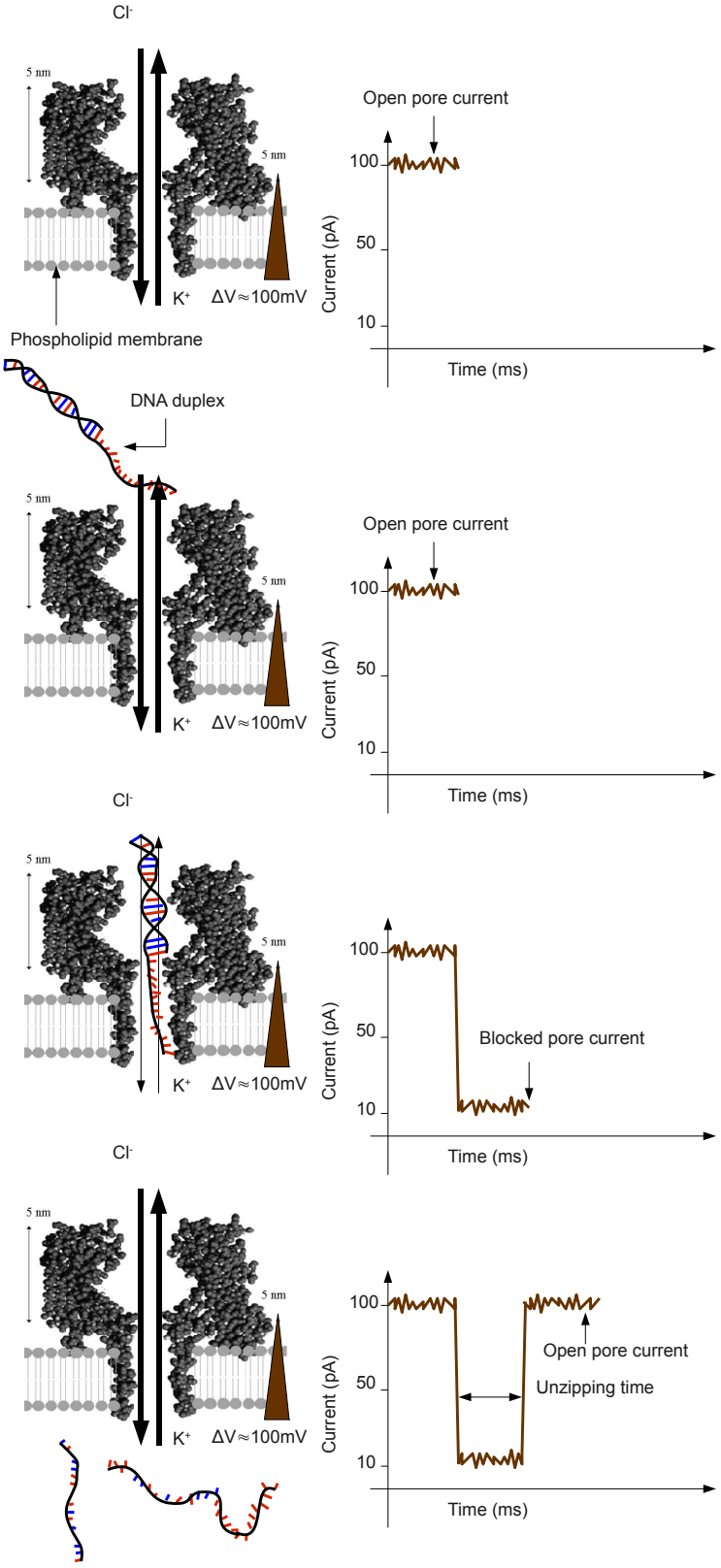



**Figure 2.1** – Principe des expériences de nanopore.

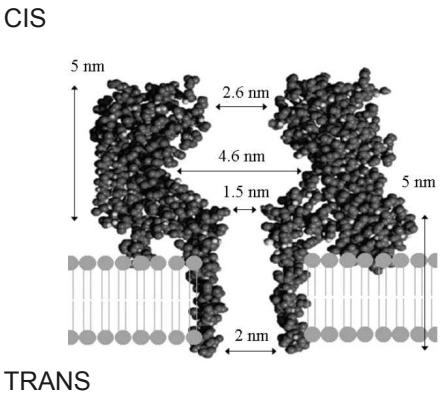



**Figure 2.2** – Structure de l'alpha-hémolysine.

## 2.2 Structure et propriétés de l'alpha hémolysine

Le nanopore d'alpha hémolysine ($\alpha$-HL) a été le plus utilisé des nanopores dans les expériences de translocation de molécules uniques. C'est aussi celui que nous avons utilisé. Il s'agit d'une protéine de 293 acides aminés qui s'auto-assemble en heptamère dans les membranes cellulaires et synthétiques pour former un pore de 1.5nm de diamètre. *In vivo* $\alpha$-HL est une toxine du Staphylocoque doré qui "perce" les globules rouges et les vide de leur contenu.

La structure moléculaire de l'$\alpha$-HL a été résolue par cristallographie aux rayons X [121]. La figure 2.2 montre sa structure typique en champignon. Le domaine transmembranaire est un canal composé de 14 brins en tonneau $\beta$ ayant des résidus hydrophiles à l'intérieur du canal et hydrophobes à l'extérieur.

Du compartiment cis (haut) vers le compartiment trans (bas), le canal est constitué d'une entrée de 2.6 nm de diamètre, d'un vestibule large de 4.6nm de diamètre, puis d'un resserrement d'1.5nm de diamètre suivi du domaine transmembranaire de 5nm de long et d'environ 2nm de diamètre. Deux anneaux de résidus chargés d'acides aminés sont présents, un chargé positivement à l'entrée du domaine transmembranaire, l'autre négativement à sa sortie.

Le resserrement de 1.5nm permet à l'ADN simple brin de passer sans grande gêne stérique [59, 87], tandis que l'ADN double brin doit être dénaturé avant de pouvoir passer complètement à travers le pore.

## 2.3 Ordres de grandeurs du courant et des forces appliquées

Un rapide calcul permet de trouver l'ordre de grandeur du courant électrique mesuré et de la force appliquée sur les molécules bloquées dans les nanopores. Compte tenu de la concentration saline utilisée (1M KCl) dans les expériences, la longueur de Debye est extrêmement faible. La différence de potentiel appliquée de part et d'autre de la membrane se trouve donc concentrée au niveau du domaine transmembranaire du nanopore. Environ 100mV sont appliqués à travers un trou de $\approx$ 5nm de long. Le champ électrique local $E$ dans le pore est de l'ordre de $E =$

$V/d = 2.10^7 V.m^{-1}$.

La conductivité électrique d'une solution de 1M KCl à température ambiante est de $\sigma = 10\Omega^{-1}.m^{-1}$. Si l'on approxime le nanopore d'alpha hémolysine par un cylindre d'1nm de rayon et de longueur 5nm où le champ électrique est uniforme, nous trouvons un courant électrique de 600 picoampères pour une différence de potentiel de 100mV [2], valeur nettement plus élevée que celle obtenue expérimentalement (130pA à 100mV). Cet écart s'explique par le confinement extrême des ions dans le pore (effet de déplétion des ions et de la charge de surface du pore cf [5, 106]).

Calculons maintenant l'ordre de grandeur de la force appliquée sur l'ADN, en supposant que la charge effective de la portion d'ADN contenue dans la partie transmembranaire du pore, là où le champ électrique est le plus intense, soit de quelques électrons. [3] La force $F$ appliquée vaut alors $Q_{eff}E = 1,6.10^{-19} * 2.10^7 \approx 4pN$. Elle est donc de quelques pN pour une différence de potentiel de 100mV.

## 2.4 En pratique

Le montage expérimental est décrit à la fois dans la partie protocole de la thèse (paragraphe 16.2) et dans l'article [130] qui est présenté dans le chapitre 4. Pour l'utilisation de nanopores biologiques, la première étape d'une expérience consiste à former une bicouche peinte isolante (résistance supérieure à $1G\Omega$). Un nanopore d'alpha hémolysine unique doit être inséré dans la bicouche lipidique. Cette insertion est effectuée en incubant la membrane avec une quantité suffisamment diluée d'$\alpha$-HL. Une différence de potentiel constante est appliquée de part et d'autre de la bicouche. L'augmentation brusque du courant électrique signe l'insertion d'un pore dans la membrane. La caractéristique I-V du pore est alors mesurée pour vérifier l'insertion correcte du pore. Notamment, la caractéristique I-V de l'$\alpha$-HL est asymétrique ($I(+V) \neq I(-V)$), ce qui permet de vérifier le sens d'insertion de la molécule dans la bicouche.

Le courant reste constant et stable tant qu'aucune autre molécule n'est ajoutée en solution. Les premiers signaux de translocation apparaissent après l'ajout des molécules à caractériser dans le compartiment cis de la chambre (voir figure 2.2). L'expérience consiste alors à mesurer les signaux de courant lors du passage des molécules sondées. Une expérience peut durer une heure et permettre d'enregistrer plusieurs centaines de signaux de translocation.

En général, l'analyse qui suit l'expérience consiste à caractériser les signaux de translocation en mesurant le temps de translocation et le niveau du courant pendant que la molécule est bloquée (durée et niveau de courant du blocage, voir figure 2.1). Il est important de souligner l'aspect statistique de l'expérience ; un signal de translocation n'apporte que peu d'information, mais les informations peuvent être extraites de l'analyse statistique de l'ensemble des signaux

2. Supposons que le champ est uniforme et est restreint à la partie transmembranaire du canal d'ADN (cf [5]), alors $I = U.\sigma S/L = 0.1 * 10 * 3.10^{-18}/5.10^{-9} = 6.10^{-10} = 600pA$.

3. Environ 12 paires de bases peuvent s'accommoder dans la partie transmembranaire du pore. Comme l'ADN est une molécule chargée (une charge négative par phosphate, donc par base), mais que ces charges sont écrantées par des contre-ions et par les résidus polaires du pore, une charge effective de quelques électrons pour 12 paires de base est une approximation raisonnable. En électrophorèse libre en solution, la charge effective par paire de base est de 0.2 à 0.4 électrons par base.

de translocation. Les expériences et l'analyse de la distribution des temps de passage est ensuite répétée pour différentes molécules (voir figure 2.3 pour un exemple) et éventuellement à différents voltages.

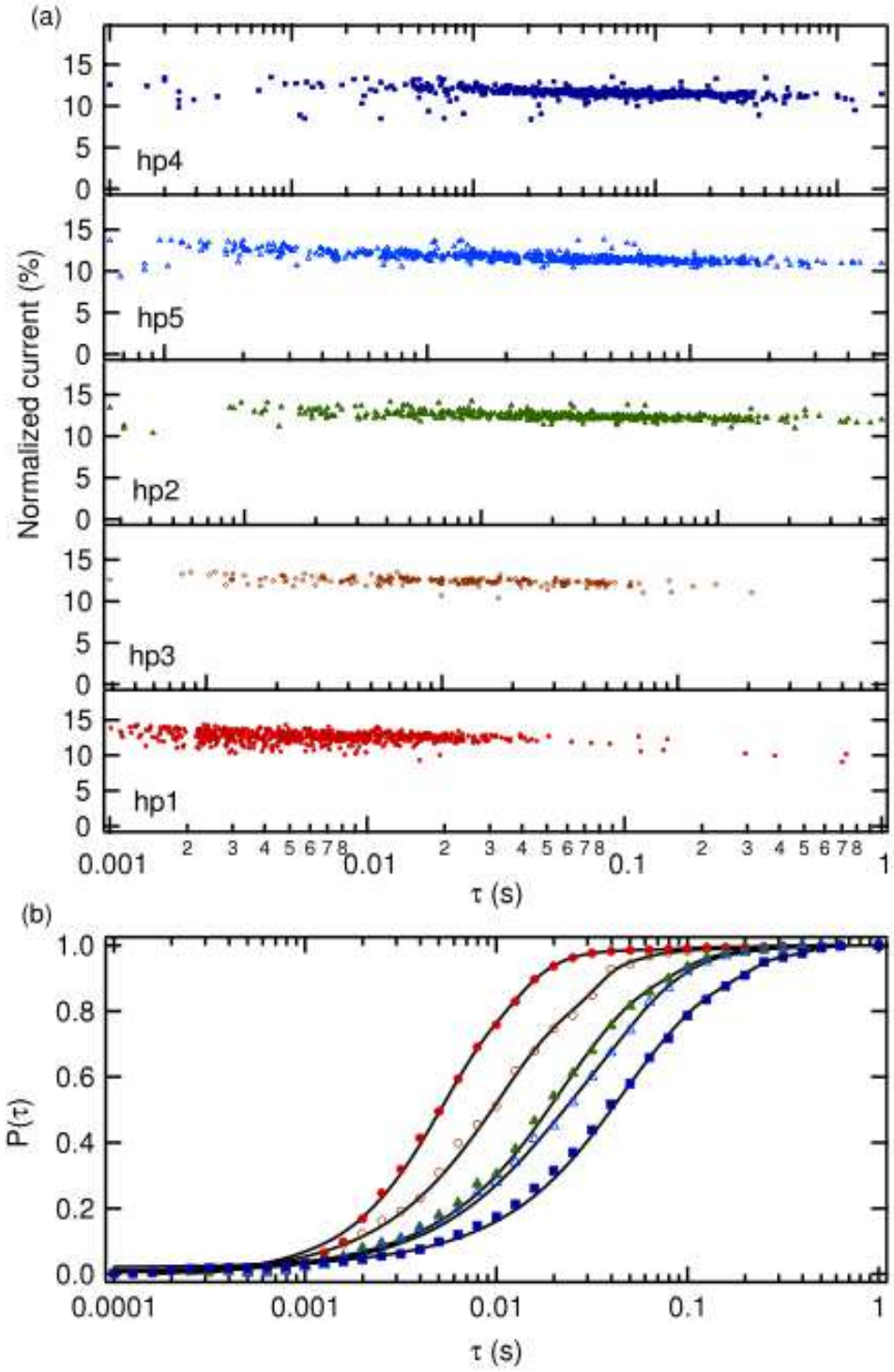



**Figure 2.3** – Haut : représentation typique du résultat de la mesure des translocations de 5 molécules d'ADN différentes. Chaque graphe représente les données d'une expérience pour un type de molécule (hp1 à 5) à voltage fixé. Pour chaque molécule, un point représente la translocation d'une molécule, caractérisée par son niveau de blocage, exprimé par le rapport du niveau de courant bloqué au niveau de courant ouvert (axe des ordonnées), et par la durée de l'évènement (abscisse en échelle logarithmique). Bas : la distribution des temps de passage est intégrée pour chaque molécule afin de faire apparaître la différence du temps de blocage caractéristique en fonction du type de molécule (le code couleur est identique entre haut et bas). Dans cet exemple les distributions sont quasi exponentielles ; l'axe des abscisses est logarithmique afin de mieux percevoir les différences entre molécules. Données issues de l'article présenté en 4.4.

# Chapitre 3

# Expériences antérieures et modèles d'ouverture de l'ADN à travers un nanopore

## 3.1 Expériences antérieures de dézippage d'ADN à travers le nanopore d'alpha hémolysine

### 3.1.1 Les courts hairpins (3 à 8 pb), sans poignée simple brin, s'ouvrent en une étape correspondant à un saut d'énergie égal à l'enthalpie libre d'appariement de l'ADN en solution

L'ADN double brin est trop large pour rentrer dans le canal transmembranaire de l'alpha hémolysine. Toutefois, deux études publiées en 2001 ont permis de montrer que l'ADN double brin peut passer au travers du nanopore s'il est dénaturé [129, 54]. Dans ces études, de courtes molécules d'ADN double brin (hairpins de 3 à 8 paires de bases, totalement hybridées sans partie simple brin) sont transloquées à travers l'hémolysine. La translocation de ces molécules s'effectue en deux étapes (voir figure 3.1) :

- Dans un premier temps, une molécule diffusant à proximité du pore est piégée dans le vestibule de l'alpha hémolysine. Le niveau de courant bloqué dépend de la taille de la molécule : plus la molécule est grosse, plus le courant est faible.
- Après une durée variable, de quelques millisecondes à quelques secondes, un court pic de diminution de courant est observé avant que le courant électrique ne retrouve son niveau initial. Cette étape est interprétée comme la dénaturation de l'ADN suivie de la translocation de la molécule sous forme simple brin à travers le canal transmembranaire de l'alpha hémolysine.

Le temps de résidence de l'ADN dans le vestibule augmente avec la longueur d'appariement de l'ADN. Ce temps est d'une milliseconde en moyenne pour les duplex de 3 paires de bases, et de quelques secondes pour les duplex de sept paires de bases. Cette cinétique de dissociation de courtes molécules d'ADN peut être décrite par une réaction à une étape, où le temps de résidence correspond au saut à travers une barrière $\Delta G^0$ égale à l'enthalpie libre d'appariement

des molécules d'ADN en solution.

Dans ces expériences, les molécules ne pénètrent pas dans le canal de l'alpha hémolysine, elles restent dans la partie vestibulaire de l'alpha hémolysine (cf figure 3.1). Le courant électrique permet de sonder le passage de la molécule, mais la différence de potentiel n'exerce pas ou peu de force sur la molécule. L'accord entre les temps de dissociation calculés dans les expériences et en solution [115, 133] suggère de plus qu'il n'y a pas d'interaction majeure entre l'ADN et l'alpha hémolysine.

Il est difficile d'ouvrir des molécules de ce type plus longues que 8 paires de bases : le temps moyen de dézippage devient trop grand. En effet, ces ADNs sont "coupés nets", c'est-à-dire qu'ils n'ont pas d'extrémité simple brin qui dépasse contrairement à ce qui est montré figure 2.1. Le potentiel appliqué n'est pas traduit en terme de force appliquée sur l'ADN. Dans les expériences suivantes, une "poignée" simple brin dépasse des molécules d'ADN, ce qui permet d'ouvrir des molécules plus longues et de contrôler en partie la force à l'origine de la dénaturation de l'ADN.

### 3.1.2 La présence d'une poignée simple brin sur les hairpins permet d'exercer une force électrophorétique qui facilite le dézippage de la molécule

Si l'on ajoute une poignée simple brin le long des duplex d'ADN, il est possible d'ouvrir de plus longs duplex d'ADN [86, 117, 93]. La partie double brin de la molécule est coincée dans le vestibule tandis que la poignée, généralement un complexe poly A de 30 paires de bases, s'insère dans le canal transmembranaire de l'alpha hémolysine, là où le champ électrique est le plus intense (voir figure 2.1). Une force mécanique est alors exercée sur le duplex via la force électrophorétique exercée sur la poignée, comme montré sur la figure 2.1 en introduction.

Les cinétiques d'ouverture des duplex d'ADN peuvent être interprétées selon un modèle de Kramers dont la barrière énergétique effective de dézippage $\Delta G_{eff}$ est biaisée par la différence de potentiel appliquée de part et d'autre de la membrane. Il est nécessaire d'introduire un coefficient $Q_{eff}$, qui représente la charge effective de la portion d'ADN "tirée" par la différence de potentiel. Cette charge effective est de l'ordre de l'électron (1.13e, cf [86]). Si l'on suppose que la force est appliquée uniquement sur les 12 paires de bases de la poignée simple brin d'ADN située dans la partie transmembranaire du pore, là où le champ électrique est le plus intense, nous trouvons une charge effective par paire de base de 0.1e. Cette valeur relativement faible montre que la charge négative de l'ADN dans le canal est contrebalancée par des contre-ions positifs et par les groupements polaires de l'alpha hémolysine.

## 3.2 Ouverture de courts duplex d'ADN : modèle de Kramers

La distribution des temps de passage est approximativement exponentielle dans toutes ces expériences. Finalement, elles peuvent s'intégrer dans un modèle de Kramers modifié, où le temps de dézippage est le temps de passage d'une barrière d'énergie $\Delta G$. Cette barrière est réduite par le voltage $U$, proportionnellement à la charge effective $Q_{eff}$ de l'ADN dans la partie transmembranaire du pore d'alpha hémolysine. Le temps de dézippage moyen, $< \tau_{unzip} >$,

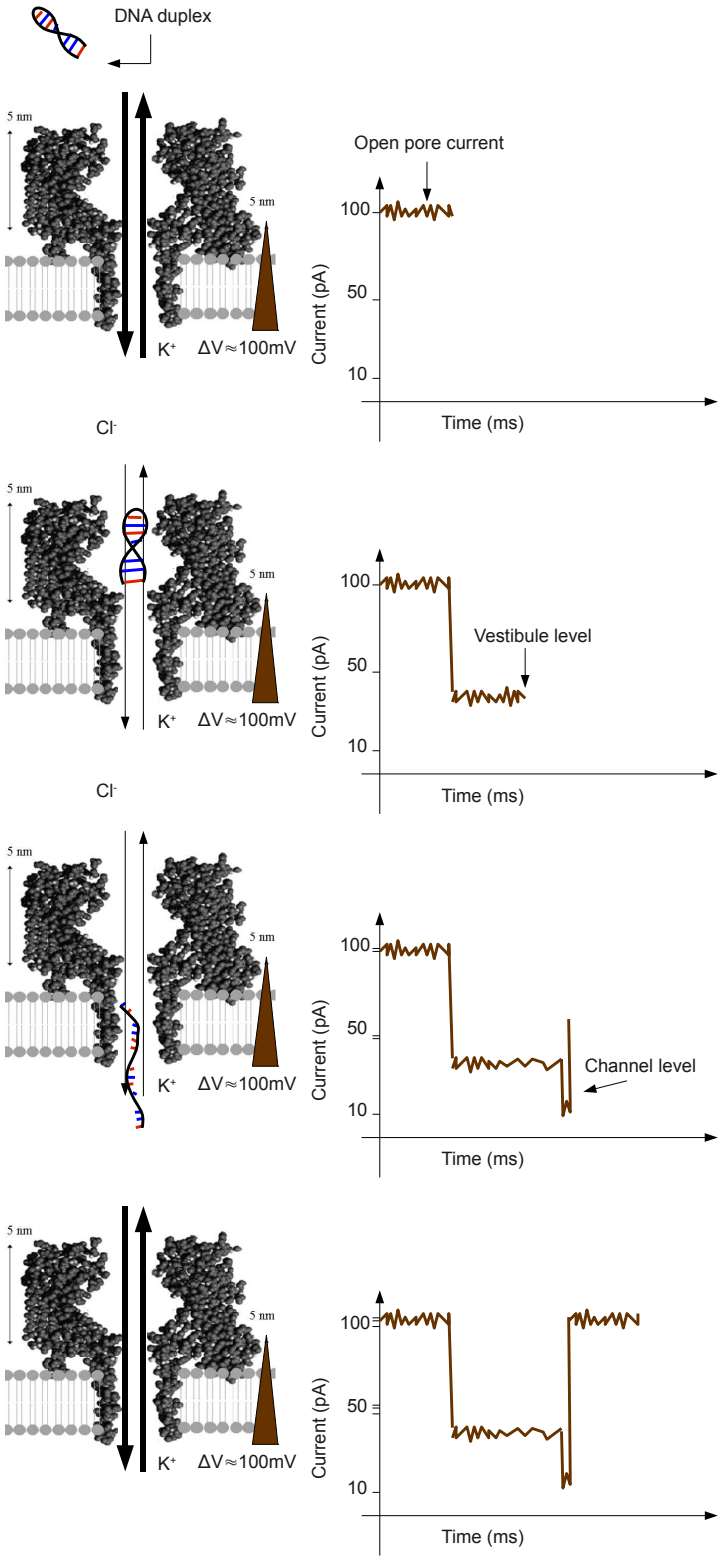



**Figure 3.1** – Signal de translocation typique observé dans [129] pour des molécules d'ADN sans poignée simple brin. La molécule d'ADN est piégée dans le vestibule pendant une durée variable. Si la molécule se dénature, elle passe à travers le nanopore sous forme d'ADN simple brin, ce qui se traduit par une chute de courant rapide avant la remontée à son niveau ouvert.

s'écrit alors :

$$< \tau_{unzip} >= \frac{1}{\nu_0} exp(\frac{E - Q_{eff}\, U}{k_b\, T})$$

Avec :
- $< \tau_{unzip} >$ temps moyen de dézippage de la molécule
- $U$ différence de potentiel appliquée de part et d'autre de la membrane
- $E$ qui est une énergie est égale à l'enthalpie libre d'appariement du duplex d'ADN $\Delta G^0$, lorsque la molécule n'a pas de poignée simple brin. En présence de poignée simple brin, cette énergie est une énergie effective de dézippage de l'ADN.
- $Q_{eff}$ charge effective de l'ADN dans le canal d'alpha hémolysine ; elle vaut $\approx$ 1e avec une poignée simple brin. Elle est quasiment nulle sinon.
- $\nu_0$ fréquence d'essai moléculaire

Le processus décrit étant un processus en une étape, la distribution des temps de passage est une simple exponentielle.

## 3.3 Ouverture de longs duplex d'ADN

Le modèle et les expériences précédentes suggèrent que l'ouverture de l'ADN s'effectue en une seule étape. Les molécules d'ADN plus longues ($>$ 15 paires de base) ne s'ouvrent probablement pas en une seule étape. On s'attend à ce que la séquence influe localement sur le processus de dézippage, de la même manière que les expériences de dénaturation mécanique montrent des points de blocage ou des zones de faible stabilité le long de l'ADN.

Pour décrire ce phénomène, nous avons quantifié les temps de premier passage à travers l'alpha hémolysine de long duplexs d'ADN ($>$45 pb) munis d'une poignée simple brin. Nous avons modélisé ce processus par la diffusion biaisée à force constante, d'une fourche d'ouverture le long de la molécule d'ADN. Je présente succinctement le modèle de diffusion de la fourche avant de présenter l'article dans lequel nous étudions le dézippage de deux molécules ayant une stabilité globale identique, mais dont le paysage énergétique parcouru par la fourche d'ouverture est très différent (cf figure 5 de l'article du chapitre 4).

### 3.3.1 Un modèle d'ouverture séquentielle de l'ADN à travers un nanopore

Notre groupe a décrit un modèle théorique [10] du processus d'ouverture pour de longues molécules d'ADN à travers un nanopore.

Le dézippage est décrit dans le modèle par un processus de diffusion d'une fourche de translocation (cf figure 3.2) dans un paysage énergétique 1D déterminé par la séquence de l'ADN. Le paysage énergétique est biaisé par le voltage appliqué. La distribution des temps de translocation peut alors être calculée numériquement en fonction de la température et du voltage pour un paysage énergétique donné, c'est-à-dire pour une séquence donnée.

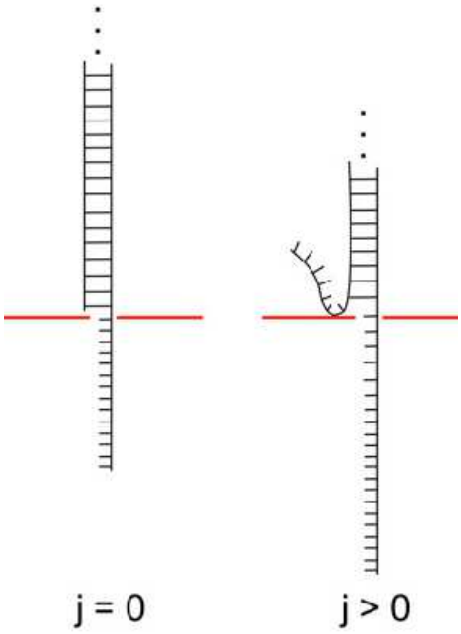



**Figure 3.2** – Représentation schématique de l'ouverture d'ADN utilisée dans le modèle d'ouverture séquentielle. Le fourche de translocation est située au niveau du pore. Elle délimite l'ADN double brin du coté du compartiment cis ainsi que les $j$ bases simple brin de la partie de molécule deshybridée, des $j$ autres paires de bases situées dans le compartiment trans.

Pour calculer le paysage d'énergie, il faut d'abord calculer $E^j_{duplex}$, fonction égale au travail à fournir pour séparer les deux brins d'ADN de la paire de bases 1, première paire de bases double brin, à la paire de bases $j$, dernière paire de bases ouverte et qui représente la position de la fourche d'ADN. Dans le modèle, cette énergie est calculée à partir de la description théorique de la différence d'enthalpie et d'entropie ($\Delta H_i$ et $\Delta S_i$) correspondant à la formation des différentes paires de bases. Cette description inclut l'influence des paires de bases voisines et est basée sur des mesures expérimentales [115, 133].

$$E_j^{duplex} = \Sigma_{i=1}^{j}(\Delta H_i - T\Delta S_i)$$

Le biais énergétique lié à la différence de potentiel est pris en compte en introduisant le paramètre $W$, qui représente la différence d'énergie électrostatique entre deux bases liées du côté cis de la membrane et deux paires de bases non liées, chacune d'un coté de la membrane. Le paysage énergétique vaut alors :

$$E_j = E_j^{duplex} - Wj$$

$W$ est le paramètre qui dépend de la différence de potentiel $U$ appliquée à travers la membrane. Le plus simple est de supposer que $W$ soit proportionnel à $U$, la constante de proportionnalité étant la charge effective $q_{eff}$ d'une paire de bases [1].

1. D'après Mathé et coll.[86], $q_{eff} \approx 0.1e$.

$$W = q_{eff}\, U \tag{3.1}$$

Cette simplification est discutée en détail dans le deuxième article.

### 3.3.2 Une ouverture séquentielle des longues molécules d'ADN ? Conception de l'expérience.

En prenant en compte explicitement la séquence de l'ADN, il devrait être possible de mettre en évidence le fait que l'ouverture de longues molécules d'ADN ne se fait pas en une étape. Notamment, deux molécules de stabilité globale identique ayant un paysage énergétique différent, devraient s'ouvrir différemment si l'ouverture est séquentielle et de manière identique sinon.

Nous montrons un tel effet dans l'article qui suit. Nous avons produit deux molécules d'ADN, appelées $\lambda$-SLS et $\lambda$-RLS, qui ont une région double brin de 45 paires de bases et une poignée polyA simple brin de 30 paires de bases. Ces séquences ont étés choisies de manière à obtenir une stabilité globale identique entre les deux molécules et un paysage énergétique très différent :

- $\lambda$-SLS présente un paysage énergétique relativement homogène
- $\lambda$-RLS a un paysage "escarpé". Notamment, une région riche en A-T précède une région riche en G-C qui induit une bosse et un blocage probable de la fourche de translocation à ce niveau.
- pour éviter un effet dû à une différence lors de l'initiation de l'ouverture, les 8 premières paires de bases du duplex sont identiques entre les deux molécules.

L'article qui suit décrit les résultats qui montrent qu'effectivement, si les données de stabilité globale sont identiques, comme le montrent les données numériques obtenues par le serveur mfold [133] et les courbes de fusion en solution, leur temps de dézippage à travers l'alpha hémolysine varie d'un facteur 3, en accord qualitatif avec le modèle d'ouverture séquentiel.

| NOM | SEQUENCE | |
|---|---|---|
| $\lambda$-RLS | 5'-CCTGAACAGTGAGCGAAGCCCGGCGCGGACAAAATGCCGCAGCCTA$_{30}$-3' | 75pb |
| | 3'-GGACTTGTCACTCGCTTCGGGCCGCGCCTGTTTTACGGCGTCGGA-5' | 45pb |
| $\lambda$-SLS | 5'-CGTAGTTCGTGCGTGGAGATCTGCCTCCGTGGCCTCGCGCAGCCTA$_{30}$-3' | 75pb |
| | 3'-GCATCAAGCACGCACCTCTAGACGGAGGCACCGGAGCGCGTCGGA-5' | 45pb |

# Chapitre 4

# Expériences et résultats

## 4.1 Article : Probing DNA base pairing energy profiles using a nanopore (Eur. Biophys. J., 2008)

Eur Biophys J
DOI 10.1007/s00249-008-0372-2

BIOPHYSICS LETTER

# Probing DNA base pairing energy profiles using a nanopore

**Virgile Viasnoff · Nicolas Chiaruttini · Ulrich Bockelmann**

Received: 7 July 2008 / Revised: 9 September 2008 / Accepted: 10 September 2008
© European Biophysical Societies' Association 2008

**Abstract** We experimentally show that the voltage driven unzipping of long DNA duplexes by an α-hemolysin pore is sensitive to the shape of the base pairing energy landscape. Two sequences of equal global stability were investigated. The sequence with an homogeneous base pairing profile translocates faster than the one with alternative weak and strong regions. We could qualitatively account for theses observations by theoretically describing the voltage driven translocation as a biased random walk of the unzipping fork in the sequence dependent energy landscape.

**Keywords** Nanopore · α-Hemolysin · Unzipping · DNA · Sequence energy landscape

## Introduction

Determining the structures and the exchanges between structures of molecules such as nucleic acids and proteins is one of the keys to the understanding of their biological functions. Single molecule force measurements using either position or force clamp (Greenleaf et al. 2007) have been used to reveal the local heterogeneity of base pairing energies (Bockelmann et al. 2002; Collin et al. 2005), the interchange between alternative folded structures (Harlepp et al. 2003; Li et al. 2007; Greenleaf et al. 2008; Garcia-Manyes et al. 2007) as well as the mechanisms of enzymatically mediated mechanical opening of dsDNA (Larson et al. 2008). Theses studies were carried out using mostly optical traps or AFM. They rely on the direct measurement of the instantaneous force involved in the various above mentioned mechanisms. These techniques, although extremely powerful, demand a large amount of work and know-how in the preparation of the tethered probed sample as well as a long time for data collection. In addition they cannot be easily parallelized. In the past decade, the electrophoretic threading of biomolecules through a single nanopore (Kasianowicz et al. 1996) has emerged as an alternative time-efficient approach. The first studies focused on characterizing and understanding the passage of ssDNA and ssRNA through the α-hemolysin (Akeson et al. 1999; Meller et al. 2000). Theses molecules are small enough (1.3 nm in diameter) to translocate through the pore. Transient ionic current blockades are recorded. dsDNA with a helix diameter (2.2 nm) larger than the pore size (1.5 nm) can also translocate, presumably due to the mechanical action of the pore that either opens (Sauer-Budge et al. 2003; Mathe et al. 2004; Tropini and Marziali 2007) or stretch the paired structure (Zhao et al. 2008). Hence, it has been suggested that nanopores could be used to study the stem–loop structures of ssRNA by their sequential opening during the translocation (Bundschuh and Gerland 2005).

To date, however, this technique has been limited by its ability to measure only quantities that are averaged at best over a single translocation event but more generally over the distributions of all recorded events. Although a real time analysis of the blocked current noise has been shown to discriminate between different types of inserted molecules (Vercoutere et al. 2003), it is generally impossible to get information on the actual position of the molecule in the pore

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00249-008-0372-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Viasnoff (✉) · N. Chiaruttini · U. Bockelmann
Laboratoire de Nanobiophysique, CNRS, ESPCI ParisTech,
10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France
e-mail: virgile.viasnoff@espci.fr

during its translocation. There is one reported exception though, for ssRNA sequences consisting in blocks of poly dA and poly dC (Akeson et al. 1999), where a current change indicates the passage of the different molecule parts. The lack of instantaneous information complicates the elucidation of the unzipping process of dsDNA by a nanopore. Indeed, while the translocation mechanism of unstructured ssDNA or ssRNA is rather well characterized and understood, the process by which a double stranded part can pass through the nanopore remains to be studied. It has been shown that the average translocation time of unstructured homogeneous single stranded DNA or RNA scales linearly with the sequence length, slightly depends on the sequence composition and seem to vary quadratically with the applied voltage (Meller et al. 2000, 2001; Meller and Branton 2002). The translocation times of double stranded DNA are much longer and were interpreted in terms of an unzipping event followed by the translocation of the opened structure. This mechanism was described as an activated process over the effective energy barrier that corresponds to a partial opening of the sequence. In the case of short blunt end duplexes (Vercoutere et al. 2001) (<8 mers) the energy barrier was related to the bulk free enthalpy $\Delta G_o$ of the entire hairpin. The helix thermally opens and is then threaded into the pore lumen. The applied voltage hardly biases the unzipping process. In the case of longer duplexes [10 mers as in Mathe et al. (2004) or 50 mers as in Sauer-Budge et al. (2003)] with larger $\Delta G_o$, the spontaneous opening of all base pairs by thermal activation is not probable enough to allow the translocation. If a single stranded overhang is added at one end, a mechanical force can be applied on the duplex. The unzipping process is then biased by the applied voltage. The effective energy barrier extracted from the experiments corresponds to the opening of 3–5 bp but has not been related to any specific part of the sequence. The barrier rather accounts for a Kramers like behavior of the unzipping time with the applied voltage. A multi step mechanism where bases or groups of bases would sequentially open was also suggested (Dudko et al. 2007). In order to fit the experimental results, a two-dimensional (2D) multi barrier stochastic model (Lakatos et al. 2005) and a microscopic approach based on extended Kramers theory with one supplementary free energy parameter (Dudko et al. 2007) have been proposed. To account theoretically for the nanopore unzipping of long sequences (>30 mers), we recently suggested a model (Bockelmann and Viasnoff 2008) where the actual sequence is explicitly taken into account. The unzipping process is described as a discrete motion of the DNA into the pore where each step is an activated process over the energy barrier needed to open/close the first base outside the pore and thread it in/out of the pore. The step length is equal to the base size.

In order to further unravel the unzipping mechanism we designed two sequences of $N_b = 45$ bp with the same total base pairing enthalpies and entropies but with a different energy landscape. We show that the existence of local energy barriers located in the middle of the sequence landscape slows down the translocation process. The translocation time of long structures is found to depend on the local base-pair arrangements and not only on the global stability or the duplex length, which indicates that the unzipping mechanism of DNA in nanopores is sequential. Our model is able to predict the difference in translocation time between both sequences.

## Experimental results

### Description of the sequences

We designed two different sequences of 45 bp coined $\lambda$-RLS for Rough Landscape Sequence and $\lambda$-SLS for Smooth Landscape Sequence. The details of the sequences are given in the Supplementary Materials. $\lambda$-RLS is the sequence of the lambda phage from base 738 to 783. Its total GC content is 64.4%. It presents an AT rich region around base 18, and a GC rich region around base 28. We designed $\lambda$-SLS with a G–C content of 66.7% (1 additional GC pair) evenly spread along the sequence. We used Mfold (Zuker 2003) to estimate the base pairing enthalpies and entropies of our sequences. We optimized $\lambda$-SLS such that both its enthalpy and entropy match those of $\lambda$-RLS to 0.3%. The results are given in Table 1. Both sequences have (1) the same eight first bases in order to avoid any difference in the unzipping time due to the nucleation of the opening fork. (2) A 3′ end with a single stranded overhang of 30 adenines that serves as a handle to initiate the threading.

### Melting curves

We tested the global stability of the sequences by measuring their bulk melting profiles (Mergny and Lacroix 2003). Absorbance at 260 nm was measured as a function of temperature in the following buffer: LiCaco 20 mM, KCl

**Table 1** Mfold predicted values of the thermodynamical parameters for both sequences at 25°C and 1 M monovalent salt

| Seq | $\Delta H_o$ (kcal/mol) | $\Delta S_o$ (cal/mol per K) | $\Delta G_o$ (kcal/mol, $T = 25$°C) |
|---|---|---|---|
| $\lambda$-RLS | −378.4 | −995.5 | −81.6 |
| $\lambda$-SLS | −379.3 | −998.5 | −81.6 |

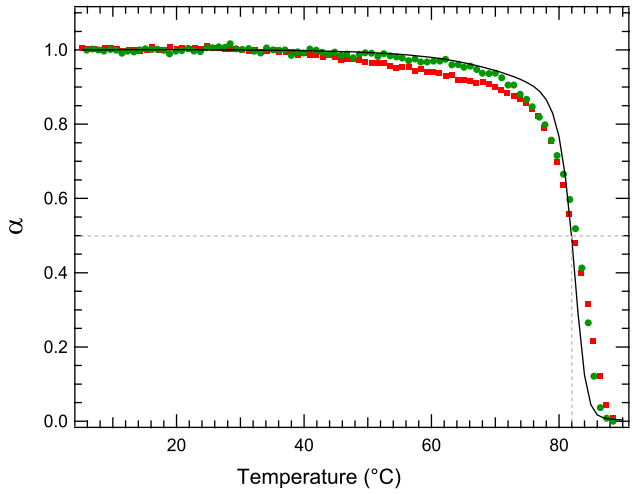



**Fig. 1** The hybridized fraction $\alpha$ = (dsDNA)/[(ssDNA) + (dsDNA)] of duplexes versus temperature [$\lambda$-RLS (*square*) and $\lambda$-SLS (*circle*)]. Buffer: LiCaco 20 mM, KCl 100 mM, pH 7.2, 0.2 °C/min. The measured $T_m = 82.6 \pm 0.3$°C. The *continuous line* represents the melting profile generated by the Mfold server ([DNA] = 1 µm, [$Na^+$] = 120 mM). The predicted melting temperature is $T_m = 82.2$°C

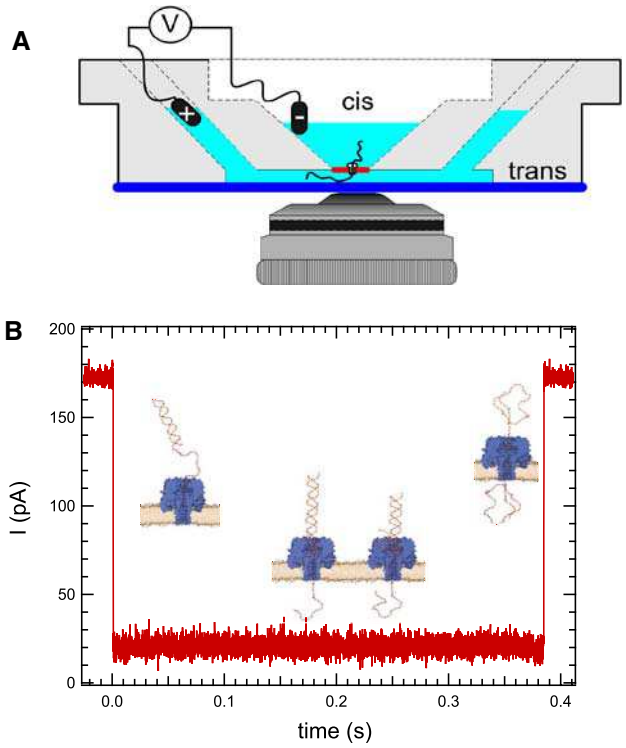



**Fig. 2** **a** Experimental set-up. The bilayer is formed on a 30 µm hole in a Teflon septum 100 µm above a glass slide. A single $\alpha$-hemolysin pore is incorporated in the bilayer. We used 1 M KCl TBE 1× pH 7.4. **b** Typical translocation curve at 150 mV. We superimpose the putative position of the DNA in the pore during the translocation process. The pore and the DNA are drawn to scale

100 mM, pH 7.2. Figure 1 shows that the melting curves cannot be distinguished within experimental uncertainty. The melting temperature is 82.6 ± 0.3°C. The clear overlay of the profiles indicates that both sequences have very similar global stability. In addition the agreement of the Mfold estimated melting profile with our experimental data is good. Hence, we conclude that the $\Delta H_o$ and $\Delta S_o$ of our sequences match their predicted values.

## Nanopore unzipping

Then, we studied the distributions of translocation time $\tau$ of both duplexes across a single $\alpha$-hemolysin pore embedded in a suspended bilayer. The bilayer was formed on a 30 µm hole made in a Teflon cell mounted on an inverted microscope. Figure 2 depicts schematically our experimental set-up. The blockade events are detected with a current amplifier (Axopatch 200B). The blockade signals are filtered at 10 kHz and digitized at 20 kS/s. We worked at $T = 24$°C, pH 7.4, TBE 1×, 1 M KCl. Figure 3a shows the distributions of blocked current levels versus blockade durations for $\lambda$-SLS at 250 mV. We distinguish fast translocating events corresponding to non-hybridized ssDNA from long events corresponding to the unzipping of dsDNA. The distribution of fast events matches the distribution of ssDNA only (data not shown). Theses events were subsequently withdrawn from the analysis. The distributions of current levels are identical for both duplexes. We call $P(\tau) = \int_0^\tau p(t)dt$ the integrated distribution of translocation times $\tau$, where $p(\tau)$ is the distribution of blockade duration. Figure 3b shows $P(\tau)$ for both sequences at 250 mV. We observe that $\lambda$-RLS translocates more slowly than $\lambda$-SLS. This observation remains true over our accessible voltage range 180–350 mV. The typical ratio of the passage times is around 3. Comparison of the distributions at six different voltages are given in the Supplementary Materials. Figure 4a shows how $P(\tau)$ of $\lambda$-SLS depends on voltage. We observe that the distributions steepen and that the unzipping times decrease as the voltage $U$ is increased. Our distributions do not fit to the functional form $1 - \exp(-\tau/\tau_K)$ expected from a Kramers approach and observed for shorter hairpins (Mathe et al. 2004). We thus characterize the distributions by their median value $\tau_{1/2}$, defined as $P(\tau_{1/2}) = 1/2$. As demonstrated by Fig. 4c, $\tau_{1/2}$ diverges at low voltages and does not have the exponential dependance on the applied voltage $U$ expected from a Kramers approach. At low voltage, both sequences tend to have the same translocation time whereas at higher voltages, $\lambda$-RLS is always slower than $\lambda$-SLS by a factor 2–4, even at our highest achievable voltage of 350 mV.

## Discussion

If we interpret our data as a single activated event, an increase of the unzipping time by a factor of 2–4 corresponds

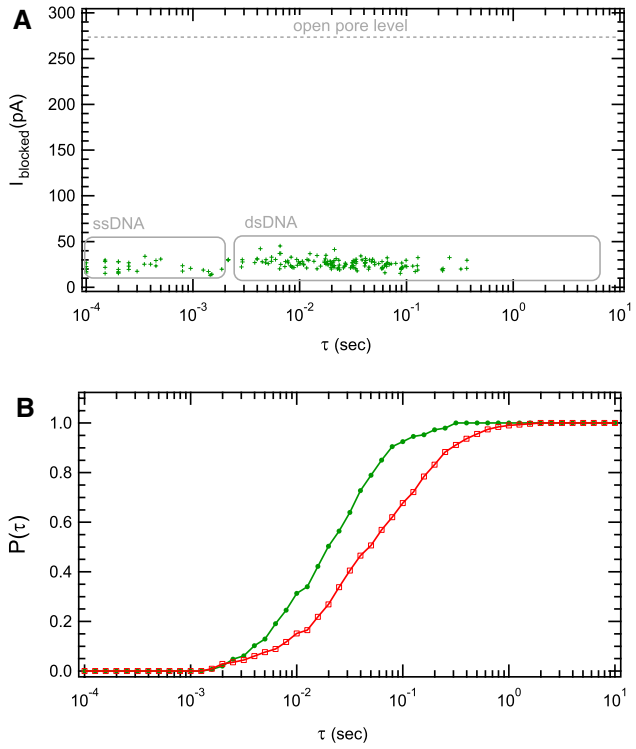



**Fig. 3** **a** Event diagram showing the blocked current levels versus the translocation durations for λ-SLS at 250 mV. Two populations clearly appear. The fast translocating events correspond to non-hybridized molecules and are subsequently withdrawn from analysis. **b** Integrated probability $P(\tau)$ of the translocation times for λ-RLS (*open square*) and λ-SLS (*filled circle*) at 250 mV. Notice that λ-RLS translocates more slowly than λ-SLS

to a rather small change in the effective activation energy of about 1 kcal/mol. Translocation of our long DNA duplexes are however very unlikely to happen in a single microscopic activated event. It would imply an activation barrier of the order of $\Delta G_0 = 135kT$. In a simple Kramers approach, $\tau_K$ would read $\tau_K = \frac{1}{\nu_0}\exp[(\Delta G_0 - Q_{\text{eff}}U)/k_bT]$. Using the literature values for $Q_{\text{eff}} = 0.1\text{–}0.2e^-/bp$, $\nu_0$ should be comprised between $10^{20}$ and $10^{40}$ Hz in order to account for the observed values of $\tau_{1/2}$. Hence the activated state should correspond to a partial opening of the DNA. Given that (1) for dsDNA, the measurable unzipping times are between 10 ms and 10 s, (2) the applied voltage is of the order of 100 mV, (3) the average free enthalpy per base pair is around $3k_bT$ and that typical $\tau_0$ are around $10^{-6}$ s, the number of base pairs involved in the transition state is always between 4 and 8 when derived from the measurements of $\tau$. In addition the value of the effective barrier depends on on the actual shape of the energy profile and may not be readily translated into a number of involved base pairs. Hence the Kramers approach is not sufficient to understand the microscopic mechanism of the unzipping and translocation of long DNA duplexes. It also fails to describe the dependence of $\tau_{1/2}$ with $U$.

For long duplexes we rather think that the DNA first nucleate an unzipping fork that progressively slide along the sequence. Notice that due to the pore geometry, the helix is shear open rather than pull open (as it happens with optical tweezers). The number of base pairs sustaining the mechanical force in a sheared DNA was theoretically estimated (deGennes 2001) to be 6. Since the first eight base pairs are the same for both sequences, we believe that the nucleation process is not responsible for the slower translocation of λ-RLS. We propose to describe the translocation process of our sequences as the progressive threading of the bases into the pore as they individually unzip. We hypothesized that the observed discrepancy is ascribable to the local probing of the sequence energy profile by the pore. The energy profile differences between both sequences is due to (1) the sequence dependence of base pairing energies as measured in the first neighbor model. (2) The difference of interactions of each base with the pore. This last contribution is believed to account for the sequence dependance of the translocation times for single stranded DNA (Meller et al. 2000; Luo et al. 2007; Gauthier and Slater 2008). However, these interactions involve changes in the translocation time of around 10–100 μs. They thus seem too weak to explain the differences (∼1 s) observed in this study. Furthermore the base content of both sequences being almost similar, we expect their effects to be comparable in both sequences.

To explore the influence of the base pairing energy landscape on the translocation process, we recently developed a model (Bockelmann and Viasnoff 2008) where the unzipping process is described as a biased random walk of the opening fork in a 1D energy landscape calculated using the nearest neighbors model (SantaLucia 1998). The energy required to open the first $j$ ($1 < j < N_b = 45$) bases pairs reads:

$$E_j^{\text{bulk}} = \sum_{i=1}^{j} \Delta H_i - T\Delta S_i \tag{1}$$

where $\Delta H_i$ and $\Delta S_i$ are the bulk literature values for the $i$th base pair. We call $W$ the difference in electrostatic potential energy between two bases paired on the *cis* side of the membrane and two bases, unpaired, one on each side of the membrane. We estimate the energy of the DNA strand with $j$ open and translocated bases as

$$E_j = E_j^{\text{bulk}} - jW. \tag{2}$$

$W$ has to be above $\Delta G_0/N_b = 3k_bT$ to favor the unzipping process. We modeled the DNA translocation as the random walk of the last open base in the sequence energy landscape using a Monte Carlo simulation previously described (Bockelmann and Viasnoff 2008) and identified the translocation time to the first passage time at base 45. The

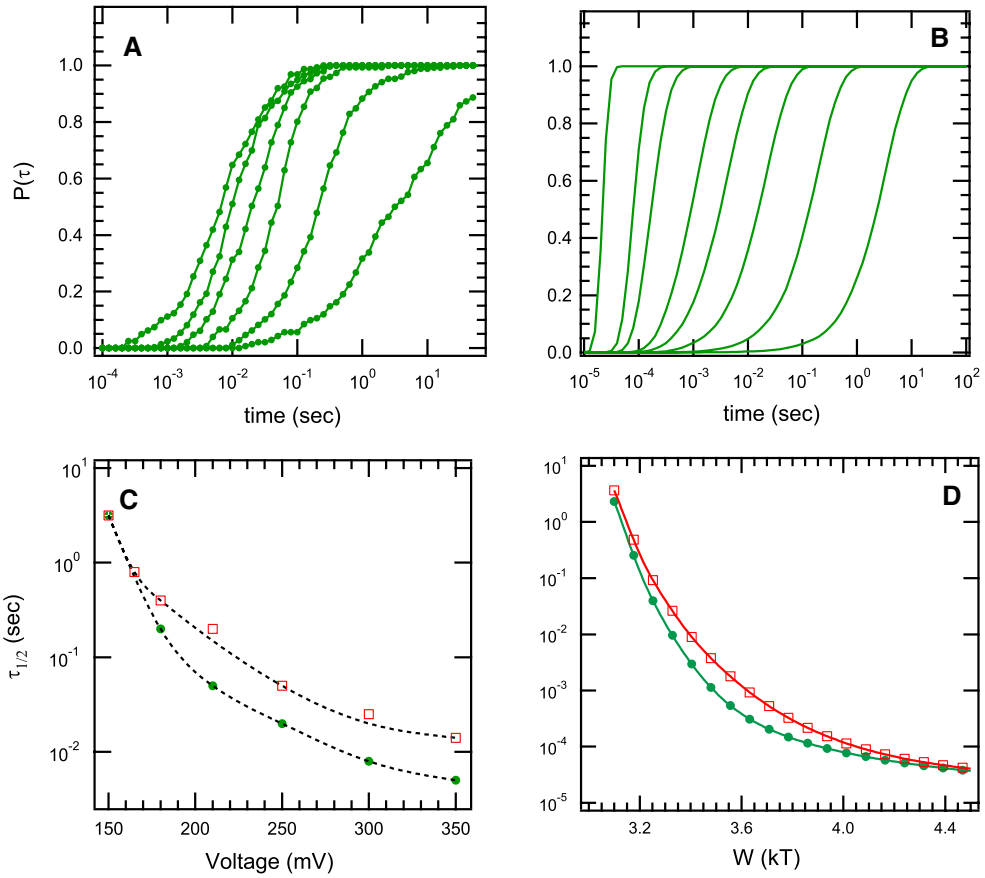



**Fig. 4** **a** Integrated distribution of the translocation times $P(\tau)$ for $\lambda$-SLS at various voltages: 150, 180, 210, 250, 300, 350 mV increasing from *right* to *left*. The duration of events lasting longer than 60 s was not measured, but they were nonetheless taken into account in the normalization of $P(\tau)$. About 400 events were typically measured per distribution with a minimum of 200 for the smallest voltage. **b** $P(\tau)$ for $\lambda$-SLS calculated from the model. We used a typical microscopic attempt frequency of $\nu_0 = 10^6$ Hz to set the time scale of our Monte Carlo simulation. **c** Characteristic rise time $\tau_{1/2}$ versus voltage for $\lambda$-RLS (*open square*) and $\lambda$-SLS (*filled circle*). The *dotted lines* are guides to the eye. Notice the strong increase of $\tau_{1/2}$ at low voltages. Above 200 mV $\lambda$-RLS translocates between two and four times slower than $\lambda$-SLS. **d** $\tau_{1/2}$ Versus $W$ as calculated from the model at $T = 24°C$

energy profiles for both sequences at $W = 3.5$ are exemplified on Fig. 5. Figure 4b, d shows the predicted distributions and $\tau_{1/2}$ for both sequences. The experimentally observed trends are well accounted by the model: (1) $\lambda$-RLS translocates about three times more slowly than $\lambda$-SLS due to longer trapping of the unzipping fork in the energy well around base pair 18. (2) The translocating time diverges faster than exponentially at low $W$. The divergence comes from the apparition of barriers increasing either in number or height as the energy landscape is less tilted. The ratio of the unzipping times of both sequences converges to unity at low $W$ since the sequences have the same $\Delta G_0$. (3) The distributions steepen with increasing voltage due to the vanishing number of local energy minima resulting in a purely diffusive motion of the fork in a 'flat' landscape. (4) The order of magnitude of the predicted values for the translocation times is correct given a typical attempt rate $\nu_0 = 10^6$ Hz.

Interestingly, however, we find two main discrepancies that prevent the fitting of the experiments with the theory (1) the dependance of $W$ versus $U$ is far from linear. Hence $W$ cannot be written $Q_{\text{eff}}U$. The predicted $\tau_{1/2}$ varies by five decades for a 25% increase in $W$ whereas doubling $U$ only leads to a three decades decrease of the observed $\tau_{1/2}$. The predicted divergence is too strong. One explanation may be that the base pair opening involves some collective unzipping. Taking theses effects into account fuels some ongoing work. (2) The predicted shapes of the distributions are not quite correct. At low $W$, the theoretical distributions become exponential since the unzipping process is dominated by the activated jump over the highest barrier of the landscape. In the low voltage regime the measured distributions are larger than exponential. It can be that the unzipping/translocation process is not a simple 1D process. The position and bent of the helix and the open strand in the pore can potentially induce several opening modes involving different local energy barriers to unzip a few bases. At high $W$ the translocation boils down to a pure diffusion process where the energy landscape plays a minor role and the theoretical distributions become more gaussian like. This high voltage region may not be experimentally accessible. Despite theses discrepancies, our model is able to qualitatively predict, without any ad hoc parameters, the translocation behavior of the tested sequences.

## Conclusion

In conclusion, we experimentally showed that two sequences with similar global stability can unzip and

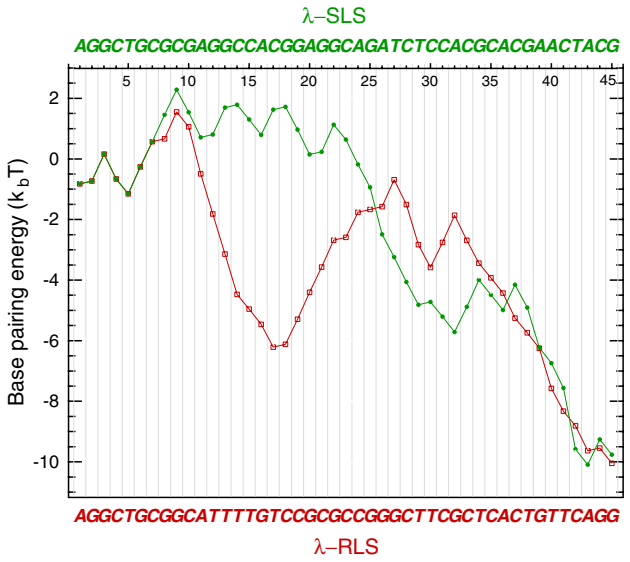



**Fig. 5** The biased energy landscape $E_j = \sum_{i=1}^{j} \Delta H_i - T\Delta S_i - jW$ for $\lambda$-RLS (*open square*) and $\lambda$-SLS (*filled circle*) for $W = 3.5$. Notice the existence of a pronounced energy well around base 18 for $\lambda$-RLS. The pinning of the unzipping process around this region slows down the translocation of $\lambda$-RLS compared to $\lambda$-SLS

translocate through an α-hemolysin pore at different speeds. This difference indicates that the translocation of dsDNA involves a sequential unzipping process and that the pore probes the local energy profile of the sequence. The divergence of the translocation times at low voltages is faster than exponential and their distributions cannot be accounted by a jump over an effective energy barrier. We showed that describing the unzipping process as 1D random walk in the sequence dependant energy landscape can qualitatively account for our observations.

**Acknowledgments** The authors thank Laurent Lacroix (MNHN) for his precious help with the melting experiments. Financial support was provided by ANR PNANO grant ANR-06-NANO-015-01.

## References

Akeson M, Branton D, Kasianowicz JJ, Brandin E, Deamer DW (1999) Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. Biophys J 77(6):3227–3233

Bockelmann U, Viasnoff V (2008) Theoretical study of sequence-dependent nanopore unzipping of DNA. Biophys J 94(7):2716–2724

Bockelmann U, Thomen P, Essevaz-Roulet B, Viasnoff V, Heslot F (2002) Unzipping DNAn with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips. Biophys J 82(3):1537–1553

Bundschuh R, Gerland U (2005) Coupled dynamics of RNA folding and nanopore translocation. Phys Rev Lett 95(20):208104

Collin D, Ritort F, Jarzynski C, Smith SB, Tinoco I, Bustamante C (2005) Verification of the crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. Nature 437(7056):231–234

deGennes PG (2001) Maximum pull out force on DNA hybrids. C R Acad Sci Paris IV:1505–1508

Dudko OK, Mathe J, Szabo A, Meller A, Hummer G (2007) Extracting kinetics from single-molecule force spectroscopy: nanopore unzipping of DNA hairpins. Biophys J 92(12):4188–4195

Garcia-Manyes S, Brujic J, Badilla CL, Fernandez JM (2007) Force-clamp spectroscopy of single-protein monomers reveals the individual unfolding and folding pathways of i27 and ubiquitin. Biophys J 93(7):2436–2446

Gauthier MG, Slater GW (2008) A monte carlo algorithm to study polymer translocation through nanopores. i. theory and numerical approach. J Chem Phys 128(6):065–103

Greenleaf WJ, Woodside MT, Block SM (2007) High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion. Annu Rev Biophys Biomol Struct 36:171–190

Greenleaf WJ, Frieda KL, Foster DA, Woodside MT, Block SM (2008) Direct observation of hierarchical folding in single riboswitch aptamers. Science 319(5863):630–633

Harlepp S, Marchal T, Robert J, Leger JF, Xayaphoumine A, Isambert H, Chatenay D (2003) Probing complex RNA structures by mechanical force. Eur Phys J E 12(4):605–615

Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW (1996) Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. Proc Natl Acad Sci USA 93(24):13770–13773

Lakatos G, Chou T, Bergersen B, Patey GN (2005) First passage times of driven DNA hairpin unzipping. Phys Biol 2(3):166–174

Larson MH, Greenleaf WJ, Landick R, Block SM (2008) Applied force reveals mechanistic and energetic details of transcription termination. Cell 132(6):971–982

Li PTX, Bustamante C, Tinoco I (2007) Real-time control of the energy landscape by force directs the folding of RNA molecules. Proc Natl Acad Sci USA 104(17):7039–7044

Luo KF, Ala-Nissila T, Ying SC, Bhattacharya A (2007) Heteropolymer translocation through nanopores. J Chem Phys 126(14):145101

Mathe J, Visram H, Viasnoff V, Rabin Y, Meller A (2004) Nanopore unzipping of individual DNA hairpin molecules. Biophys J 87(5):3205–3212

Meller A, Branton D (2002) Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore. Electrophoresis 23(16):2583–2591

Meller A, Nivon L, Brandin E, Golovchenko J, Branton D (2000) Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. Proc Natl Acad Sci USA 97(3):1079–1084

Meller A, Nivon L, Branton D (2001) Voltage-driven DNA translocations through a nanopore. Phys Rev Lett 86(15):3435–3438

Mergny JL, Lacroix L (2003) Analysis of thermal melting curves. Oligonucleotides 13(6):515–537

SantaLucia J (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. Proc Natl Acad Sci USA 95(4):1460–1465

Sauer-Budge AF, Nyamwanda JA, Lubensky DK, Branton D (2003) Unzipping kinetics of double-stranded DNA in a nanopore. Phys Rev Lett 90(23):238101

Tropini C, Marziali A (2007) Multi-nanopore force spectroscopy for DNA analysis. Biophys J 92(5):1632–1637

Vercoutere W, Winters-Hilt S, Olsen H, Deamer D, Haussler D, Akeson M (2001) Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel. Nat Biotechnol 19(3):248–252

Vercoutere WA, Winters-Hilt S, DeGuzman VS, Deamer D, Ridino SE, Rodgers JT, Olsen HE, Marziali A, Akeson M (2003) Discrimination among individual watson–crick base pairs at the

termini of single DNA hairpin molecules. Nucleic Acids Res 31(4):1311–1318

Zhao Q, Comer J, Dimitrov V, Yemenicioglu S, Aksimentiev A, Timp G (2008) Stretching and unzipping nucleic acid hairpins using a synthetic nanopore. Nucleic Acids Res 36(5):1532–1541

Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 31(13): 3406–3415

**Supplementary Materials**

DNA Sequences

| | |
|---|---|
| $\lambda$-RLS | 5' *AGGCTGCG* GCATTTTTGTCCGCGCCGGGCTTCGCTCACTGTTCAGG 3' |
| $\lambda$-SLS | 5' *AGGCTGCG* CGAGGCCACGGAGGCAGATCTCCACGCACGAACTACG 3' |

The sequences have the same first 8 bases. They are hybridized with a 75 mer (c$\lambda$-RLS ,c$\lambda$-SLS ) composed of the 45 bases complementary sequence plus a polyA tail of 30 adenines at its 3' end.

| | |
|---|---|
| c$\lambda$-RLS | 5' CCTGAACAGTGAGCGAAGCCCGGCGCGGACAAAATGC *CGCAGCCT* $(A)_{30}$ 3' |
| c$\lambda$-SLS | 5' CGTAGTTCGTGCGTGGAGATCTGCCTCCGTGGCCTCG *CGCAGCCT* $(A)_{30}$ 3' |

Comparisons of the distributions of both duplexes at all voltages

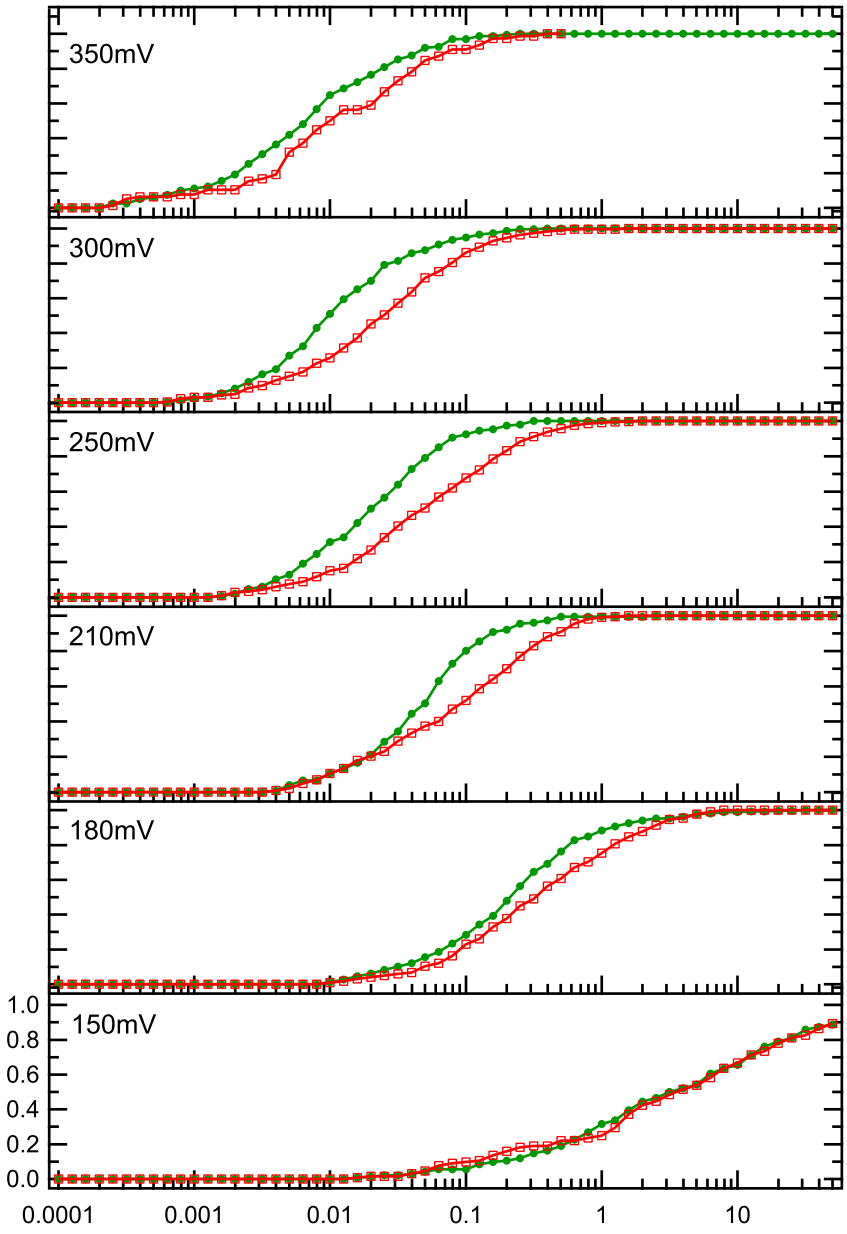



Figure 1: Overlay of the measured distributions $P(\tau)$ for both sequences $\lambda$-RLS ($\square$) and $\lambda$-SLS ($\bullet$) at V=150,180,210,250,300,350mV.

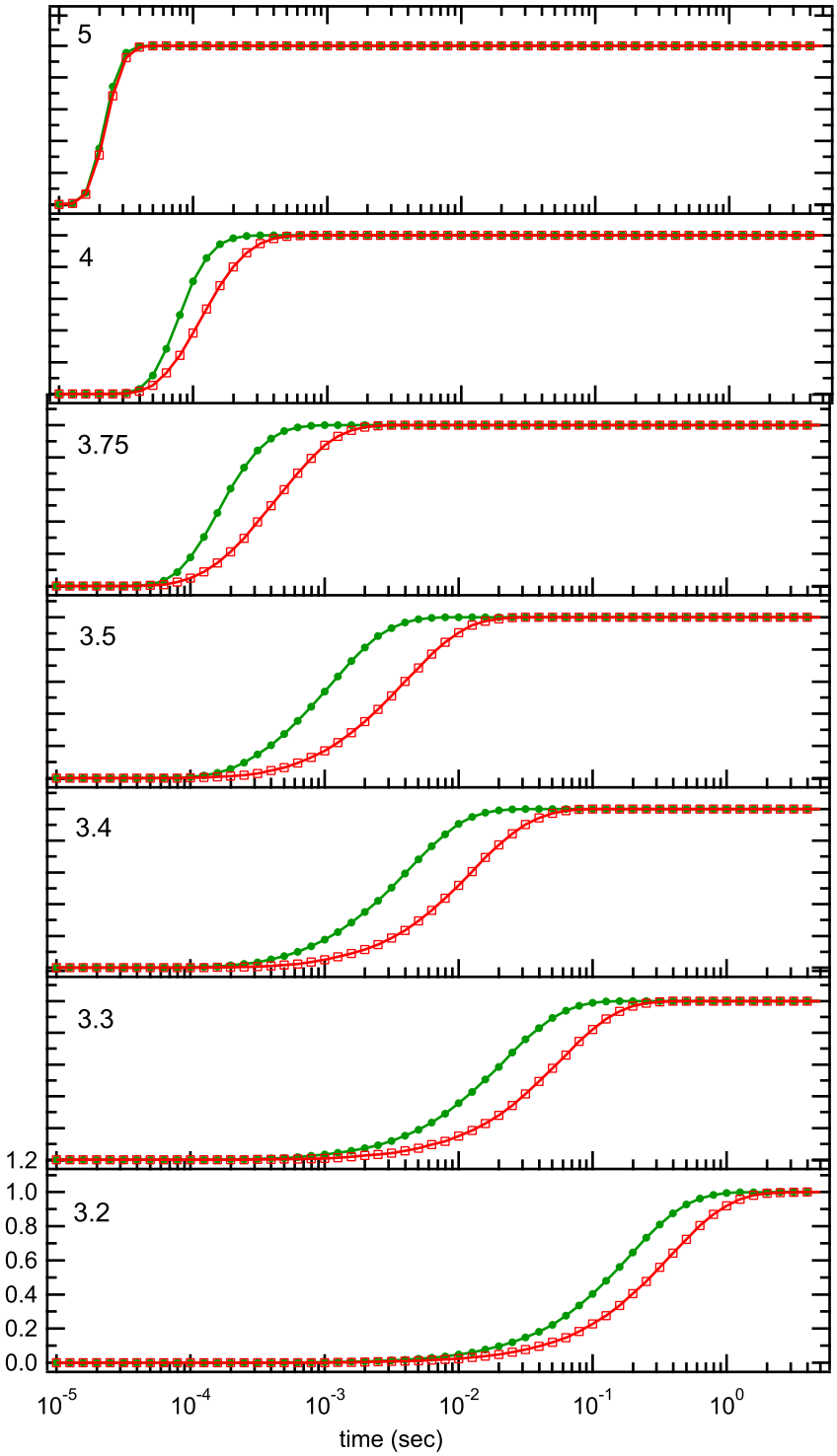



Figure 2: Overlay of the calculated distributions $P(\tau)$ for both sequences $\lambda$-RLS ($\square$) and $\lambda$-SLS ($\bullet$) at W=3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.75, 4, 5 $k_bT$.

## 4.2 Discussion

Les cinétiques de translocation de $\lambda$-SLS et $\lambda$-RLS obtenues s'accordent qualitativement avec la théorie d'ouverture séquentielle de l'ADN. La molécule de $\lambda$-SLS, ayant un paysage énergétique homogène, transloque environ 3 fois plus vite que $\lambda$-RLS qui présente un point de blocage marqué. Cet effet est présent à tous les voltages supérieurs à 200mV et s'estompe à plus faible voltage. Nous avons une explication qualitative mais néanmoins le modèle n'est pas quantitatif. Deux désaccords quantitatifs importants sont détaillés dans les paragraphes suivants.

### 4.2.1 La distribution des temps de translocation est pluriexponentielle

Selon le modèle de Kramers, nous devrions obtenir des distributions de temps de passage à travers le nanopore simplement exponentielles, pour une molécule et un voltage donné. Selon le modèle d'ouverture séquentielle, la distribution des temps de passage est intermédiaire entre une distribution gaussienne à fort biais ($W > 3.5k_bT$) et une exponentielle à faible biais ($W < 3k_bT$) [10].

Dans les expériences, nous trouvons une distribution de temps de passage "plus large" qu'une simple exponentielle. La présence de plusieurs temps caractéristiques ne peut s'expliquer ni dans le modèle de Kramers ni dans le modèle d'ouverture séquentielle. La distribution s'élargit d'autant plus que les temps de translocation sont grands, comme on peut le voir aux plus faibles voltages où les temps de translocation sont de l'ordre de la seconde. Les distributions à V=150mV (Figure 1 des supplementary materials de l'article précédent) s'étendent sur quatre décades, tandis que les distributions théoriques (Figure 2 des supplementary materials) s'étendent sur deux décades (voir aussi la figure 1 de l'article suivant). [1]

### 4.2.2 Le modèle présente une dépendance en voltage beaucoup trop rapide par rapport aux expériences

Si l'on suppose que le paramètre de contrôle des simulations $W$ (voir équation 3.1) est proportionnel à $U$, la dépendance du temps d'ouverture des molécules $< \tau_{unzip} >$ en fonction du voltage est beaucoup plus prononcée dans la théorie que dans les expériences. En effet, dans le modèle d'ouverture séquentielle, il existe une valeur seuil de $W$ située autour de $W = 3k_bT$ pour laquelle le dézippage passe d'un régime énergétiquement favorable à un régime énergétiquement défavorable. Pour des molécules de 45 paires de bases de long comme celles que nous utilisons, ce seuil est extrêmement prononcé : le temps de translocation moyen diminue de 5 décades en augmentant $W$ de 12% (voir figure 4 (d), de l'article précédent). Dans les expériences, une modification d'un facteur 2 de la différence de potentiel (de 150mV à 300mV) réduit de seulement 2,5 décades le temps de translocation moyen. Il s'agit d'un désaccord notable entre théorie et expérience. La dépendance au voltage de la translocation est beaucoup plus molle expérimentalement que celle prédite par la théorie.

1. Bien qu'il ne soit pas explicitement signalé, cet effet est aussi visible dans les études précédentes de dézippage d'ADN [86].

### 4.2.3 Une force fluctuante ?

L'article présenté dans le paragraphe 4.4 propose un modèle susceptible d'expliquer la faible dépendance du temps d'ouverture en fonction du voltage. L'idée principale du modèle est que la force appliquée sur la molécule serait susceptible de fluctuer. En se basant sur le modèle d'ouverture séquentielle, il est possible de retrouver le comportement expérimental. Pour cela on suppose l'existence d'une fluctuation d'ordre $k_b T$ du paramètre $W$ corrélée à l'échelle de la milliseconde. Ce modèle apporte aussi un élément de réponse concernant la distribution pluriexponentielle des temps de passage.

Un développement de ce modèle est détaillé dans l'article suivant. Nous résolvons numériquement l'équation de Fokker-Planck associée à la diffusion de la fourche dans un paysage fluctuant (contrairement à la méthode de Gillespie utilisée dans l'article précédent), et précisons le résultat analytique du modèle dans les deux cas extrêmes où le temps de corrélation de $W$ est très court ou très long devant le temps moyen de translocation de la molécule.

## 4.3 Influence d'autres paramètres tel que l'élasticité de la molécule d'ADN et les interactions pore/ADN

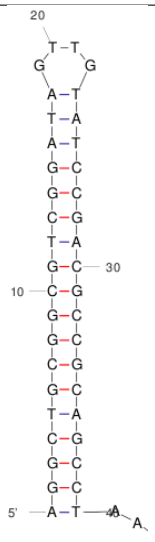
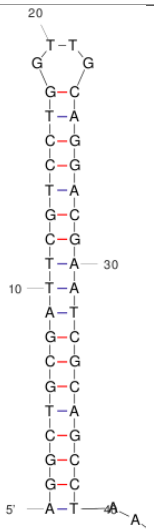
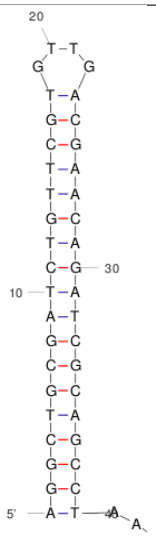
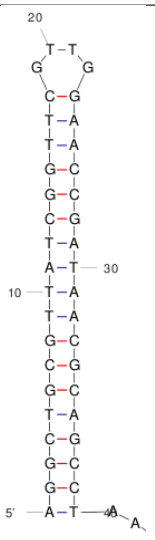
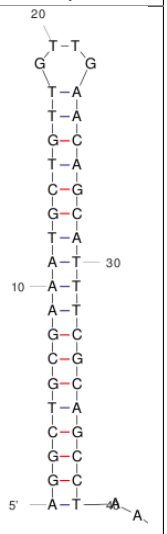
L'article qui suit présente une autre série d'expériences de dézippage d'ADN que nous avons réalisées sur 5 hairpins ayant une région double brin de 18 paires de bases. Les molécules sont munies d'une poignée simple brin polyA de 30 bases. Les 8 premières paires de bases sont identiques pour toutes les molécules. Leur structure est présentée sur le tableau 4.1. Le détail de leur fabrication est précisé dans la partie protocole paragraphe 16.1.2.

Quel que soit le modèle utilisé pour décrire la translocation (ouverture séquentielle, Kramers, force fluctuante), nous devrions obtenir un temps de passage de ces molécules ordonné selon la stabilité globale des molécules. Or, les expériences présentées dans l'article suivant montrent de manière non équivoque que contrairement aux modèles théoriques, ces molécules ne transloquent pas dans l'ordre de leur énergie globale d'appariement.

Le résultat le plus surprenant est obtenu entre la molécule hp1 et hp4. Hp1 est plus stable que hp4 en solution : mfold prédit une différence de $4k_b T$ de leur énergie d'appariement et la mesure des températures de fusion montre une différence de 10°C entre ces deux molécules (78°C pour hp1 et 68°C pour hp4). Contrairement à toute attente, hp1 passe à travers le nanopore d'alpha hémolysine environ 10 fois plus vite que hp4 !

Une piste d'explication est proposée dans l'article. Si l'on suppose que les molécules sont ouvertes par cisaillement, l'initiation du dézippage dépend de manière complexe de la réponse élastique de l'ADN à cette contrainte. La réponse mécanique de l'ADN à une contrainte de cisaillement n'est pas bien connue. Elle commence à être étudiée quantitativement, comme le montre une expérience récente de micromanipulation par pince optique [128]. Parmi les autres pistes à explorer, nous pouvons suggérer l'existence d'autres processus coopératifs ou bien l'importance des interactions entre le pore et l'ADN.

**Table 4.1** – Structure et enthalpie libre d'appariement des 5 molécules d'ADNs testées. $\Delta G^0$ est calculé par le serveur Mfold à 1M NaCl à 24°C. $\Delta G^0$ est exprimé en $k_b T$ (facteur de conversion : 1kT=0.592 kcal.mol)

| | hp1 | hp2 | hp3 | hp4 | hp5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Séquence |  |  |  |  |  |
| $\Delta G^0$ | 52.0 | 49.8 | 48.3 | 48.1 | 47.3 |

## 4.4 Article : Force fluctuations assist nanopore unzipping of DNA (J. Phys. Condens. Matter, 2010)

J. Phys.: Condens. Matter **22** (2010) 000000 (11pp) UNCORRECTED PROOF

# Force fluctuations assist nanopore unzipping of DNA

(*Ed: Stuart*)
Processing/JPCM/
cm355230/SPE
Nanopores
Printed 16/8/2010
Spelling US
Issue no
Total pages
First page
Last page
File name
Date req
Artnum
Cover date

**V Viasnoff, N Chiaruttini, J Muzard[1] and U Bockelmann**

Nanobiophysics Lab, UMR CNRS Gulliver, ESPCI, 10 rue Vauquelin, F-75005 Paris, France

E-mail: virgile.viasnoff@espci.fr

Received 27 April 2010, in final form 8 July 2010
Published
Online at stacks.iop.org/JPhysCM/22/000000

**Abstract**

We experimentally study the statistical distributions and the voltage dependence of the unzipping time of 45 base-pair-long double-stranded DNA through a nanopore. We then propose a quantitative theoretical description considering the nanopore unzipping process as a random walk of the opening fork through the DNA sequence energy landscape biased by a time-fluctuating force. To achieve quantitative agreement fluctuations need to be correlated over the millisecond range and have an amplitude of order $k_BT$/bp. Significantly slower or faster fluctuations are not appropriate, suggesting that the unzipping process is efficiently enhanced by noise in the kHz range. We further show that the unzipping time of short 15 base-pair hairpins does not always increase with the global stability of the double helix and we theoretically study the role of DNA elasticity on the conversion of the electrical bias into a mechanical unzipping force.

Q.1 (Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

## 1. Introduction

Proteinaceous and artificial nanopores are under increasing investigation as ways to efficiently detect and count single molecules. The transient blockade of the pore ionic current concomitant to the translocation of a molecule of interest has been studied to characterize the passage of single-stranded DNA (ssDNA) [1, 2], proteins [3–5], neutral polymers [6] or to study local chemical reactions [7]. Nanopores can also be used as force transducers. The electrophoretically driven translocation of molecules larger than the pore diameter can be obtained at high enough bias provided that the molecules deform to accommodate into the pore lumen. Double-stranded DNA (dsDNA) [8–10], loosely folded proteins [4, 11] or DNA-bound enzymes [12–15] can be forced to translocate by application of a suitable voltage bias. In the case of dsDNA the translocation process can be associated with unzipping of the base-pair sequence if the pore is smaller than 2 nm. Force spectroscopy [16, 17] or constant force unzipping [8, 9] have been performed on rather short dsDNA (10–20 bp). Unlike other micromanipulation techniques, such as optical or magnetic trapping, nanopore unzipping does not allow the measurement of the unzipping force nor of the position of the DNA strand in the pore. Instead a controlled biasing voltage is applied and the distributions of total DNA passage time are measured. The electrophoretic drive plays the role of the magnetic or optical force but cannot be directly measured. At a first approximation it can be related to the applied voltage $V$ as $F = q_{\text{eff}} * \frac{V}{d}$, where $d$ is the pore length and $q_{\text{eff}}$ is an effective charge, the value of which ranges from 0.1 to 0.4 $e^-$/bp. This approach was successfully used to explain unzipping of short DNA hairpins under constant or ramped voltages. Several studies tried to decipher the mechanism of DNA unzipping in nanopores as a function of the pore size [18], sequence length and base composition [8–10, 19, 20]. So far, the theoretical descriptions of nanopore unzipping consider the diffusion of the unzipping fork at constant force or constant loading rate over a single effective energy barrier for short hairpins [9, 21] or in a sequence-dependent energy landscape for larger sequences [22, 23, 17, 21, 24]. All-atom molecular dynamics simulations were performed to look at the unzipping process of short hairpins in artificial or proteinaceous pores [25–27]. However, to date, all models fail to quantitatively predict the translocation time of dsDNA in nanopores although the same approaches accurately describe DNA unzipping using optical or magnetic traps.

[1] Present address: School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin, Republic of Ireland.

 © 2010 IOP Publishing Ltd Printed in the UK & the USA

**Table 1.** Hairpin and duplex sequences used in this study. Duplex sequences given here are hybridized to their complementary part attached to a polyA moiety.

| | |
|---|---|
| Hairpins | |
| hp1 | 5′ **AGGCTGCG**GCGTCGGATA *GTTG* TATCCGACGC**CGCAGCCT**$(A)_{30}$ 3′ |
| hp2 | 5′ **AGGCTGCG**ATTCGTCCTG *GTTG* CAGGACGAAT**CGCAGCCT**$(A)_{30}$ 3′ |
| hp3 | 5′ **AGGCTGCG**ATCTGTTCGT *GTTG* ACGAACAGAT**CGCAGCCT**$(A)_{30}$ 3′ |
| hp4 | 5′ **AGGCTGCG**TTATCGGTTC *GTTG* GAACCGATAA**CGCAGCCT**$(A)_{30}$ 3′ |
| hp5 | 5′ **AGGCTGCG**AAATGCTGTT *GTTG* AACAGCATTT**CGCAGCCT**$(A)_{30}$ 3′ |
| Duplex | |
| Dupl | 5′ **AGGCTGCG**GCATTTTGTCCGCGCCGGGCTTCGCTCACTGTTCAGG 3′ |

It was previously reported that the nanopore unzipping process depends on the pore geometry [18, 28], the base-specific pore/DNA interactions [29] and local base-pairing stability [20, 28]. In this paper we argue that considering the base-pair stabilities alone is not enough to account for nanopore unzipping experiments. Force fluctuations and/or local molecule elasticity may also play an important role. In the first part, we show that the voltage dependence of the translocation of a 45-mer DNA duplex can be quantitatively explained by the presence of correlated time fluctuations of order $1k_BT$/bp in the unzipping force. In the second part we show experimental evidence that 15-mer hairpins do not always unzip according to their global stability. We hypothesize that this behavior may partly originate from cooperative opening of several bases due to local differences in molecular elasticity. We provide an illustrative 1D model of force spreading along a DNA molecule unzipped in a shear mode.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Hairpins and duplex

All DNA oligonucleotides were purchased PAGE purified from Eurogentec SA. The hairpins were slowly annealed after thermal denaturation at 95 °C. They were used at a final concentration of 2.5 $\mu$M. For the duplex, the amount of single-stranded DNA in the solution was minimized by an agarose gel purification (without staining) of the hybridized strands. The sequences of the molecules are given in table 1. Common features of the sequences are highlighted in bold and loops are hyphenated. Hairpin sequences are given in full. The duplex sequence is complemented by the appropriate other DNA strand with a polyA tail of 30 bases at its 3′ end. We used TE Buffer 1x, pH = 7.4 supplemented with 1 M KCl. All experiments were carried out at 24 °C.

### 2.2. Experimental set-up

We used a classical nanopore set-up already described in [20]. Black lipid membranes were formed on a hole of 30 $\mu$m in diameter, punctured in a Teflon septum. The DPhPC (Avanti Lipids) bilayer was about 10 $\mu$m in diameter with a lipid annulus around. This configuration allowed the membranes to resist voltages as large as 350 mV without rupture. Alpha hemolysin was purchased from Sigma.

Melting curves were obtained by measuring the change in absorbance at 260 nm of the DNA hairpins at 1 $\mu$M. The temperature was varied by 0.2 °C min$^{-1}$ between 20 and 95 °C. The following buffer was used: LiCaco 20 mM, KCl 100 mM, pH 7.2. The dissociation coefficients were extracted using the standard protocol described in [30].

### 2.3. Numerical calculation of the first passage time

We theoretically describe the translocation of DNA through a nanopore by the biased diffusion of a fictitious point particle representing the unzipping fork in the energy landscape $E_j$ created by the unzipping of the first $j$th bases. We coined $w$ the mechanical and electrostatic energy difference $w$ between two bases paired on the *cis* side of the membrane and two bases, unpaired, one on each side of the membrane. We assume that it does not depend on the sequence. The bases are numbered from 1 to $N$ starting at the first base after the poly A overhang. We call $E_j$ the free enthalpy needed to unzip the first $j$th bases. The unzipping energy landscape then is

$$E_j = \sum_{i=1}^{j} (\Delta H_i - T\,\Delta S_i) - j\,w \tag{1}$$

where $\Delta H_i$ and $\Delta S_i$ are the tabulated bulk melting values of each base pairs according to the nearest-neighbor model [31]. The energy $w$ linearly biases the energy landscape estimated for DNA thermal melting in solution. Distributions of DNA unzipping time are calculated from the distributions of the first passage time of the unzipping fork at base $N$. In a previous work [24] we solved the diffusion dynamics in this landscape by thermally activated jumps from one to the next base pairs using a Gillespie method [32]. This method is not very efficient at calculating very long translocation times. In order to compute first passage times over 13 decades in time, we adopt a more continuous approach by solving the Fokker–Planck equation associated with the diffusion process. Let $f(x,t)$ be the probability of finding the unzipping fork at position $x$ at time $t$. The time evolution of $f$ follows

$$\partial_t f = \partial_x \left\{ D \left[ \partial_x + \frac{1}{k_B T} \partial_x E_j \right] f \right\}. \tag{2}$$

The equation was solved by matrix multiplications representing discrete spatial steps equal to one base. The diffusion coefficient $D$ is the only fitting parameter. It sets the unitary timescale $t_o$ as $\sqrt{Dt_o} = 1$ base. The boundary conditions are reflecting at $x = 1$ to prevent backward escape, and fully absorbing at $x = N$. The cumulative distributions of first passage time $P_w(\tau)$ are calculated as $1 - \int_0^N f(x,t)\,\mathrm{d}x$.

We use $f(x,0) = \delta(0)$ as the initial condition. In the range of common accessible times the Gillespie method or solving the Fokker–Planck equations led to similar results (data not shown).

## 3. Results and discussion

### *3.1. Unzipping of long DNA duplexes: the role of force fluctuations*

DNA unzipping under constant force using magnetic tweezers [33] have been implemented on DNA duplexes of several kilobase pairs. Above a certain force threshold (between 12 and 15 pN) the DNA mechanically melts. Around the transition a gradual opening of the molecules was observed with transient pauses at tightly bound regions resulting from a large local GC content. The unzipping time thus depends not only on the global duplex stability but on the local shape of the unzipping energy landscape. The same behavior could be expected for nanopore unzipping. In that case, however, the DNA duplexes are significantly shorter (typically less than 100 bp). For so few bases other parameters than base-pairing stability may also affect the unzipping dynamics. Among those are DNA/pore interactions, geometrical constraints and confinement, detailed process of single base unzipping and local distribution of mechanical stress. For very short sequences (10 bp or less) a small number of molecular events are expected to allow the translocation of the molecule. Indeed it has been reported that the translocation of short hairpins follow a Kramers description and can be reduced to a thermal passage over an energy barrier (Kramers event) corresponding to the opening of five bases [9]. This description was further refined allowing a finite escape time of the freed molecule [17, 21]. However, the value of the energy barrier could not be deduced directly from the sequence. For longer sequences the Kramers picture becomes inappropriate and it was demonstrated [24] that the unzipping process can be described by the sequential opening of the individual base pairs. One can expect that the detailed mechanisms of base-pair opening are averaged and that the DNA unzipping dynamics is mainly controlled by the large scale variations of base composition. As a result, the unzipping time depends mostly on the details of the energy landscape [24, 20]. In section 3.2 we study the voltage dependence of DNA unzipping of a 45-mer duplex coined *Dupl* and described in table 1. A previous study [20] showed that 45 bp is enough to consider the variations of base composition as the main factor controlling the DNA translocation dynamics. We then provide a random walk model under fluctuating force that quantitatively accounts for the voltage dependence of the unzipping dynamics under constant voltage.

We start by determining experimentally the voltage dependence of the 45 bp DNA duplex coined *Dupl* described in table 1. Figure 1(a) shows the translocation time cumulative distributions $P(\tau)$ at biasing voltages ranging from 150 to 350 mV. The voltage dependence of the median time $\tau_{1/2}$ defined as $P(\tau_{1/2}) = 0.5$ is given in figure 1(b). Should the unzipping be a simple Kramers process over an activation energy barrier $E^*$, one would expect, i—cumulative distributions $P(\tau)$ of the form $P(\tau) = 1 - \exp(-\tau/\tau_o)$ and ii—median times $\tau_{1/2} = \ln(2) * \tau_o$ that scale as $\tau_{1/2} \propto \exp(\frac{E^* - q_{\rm eff}V)}{k_{\rm B}T})$. Figure 1(c) shows that the predicted functional form does not match well our experimental distributions that are wider than exponential. Moreover, the log–lin plot of $\tau_{1/2}$ versus $V$ in figure 1 shows that $\log(\tau_{1/2})$ does not vary linearly with $V$, especially for voltages below 200 mV. At low voltages $\tau_{1/2}$ diverges more rapidly than exponentially with the voltage. Since none of the above features are experimentally observed, we conclude that the unzipping process cannot be described by two states (open and closed) separated by a fixed effective energy barrier. Spatial coordinates and the existence of several unzipped states should be taken into account.

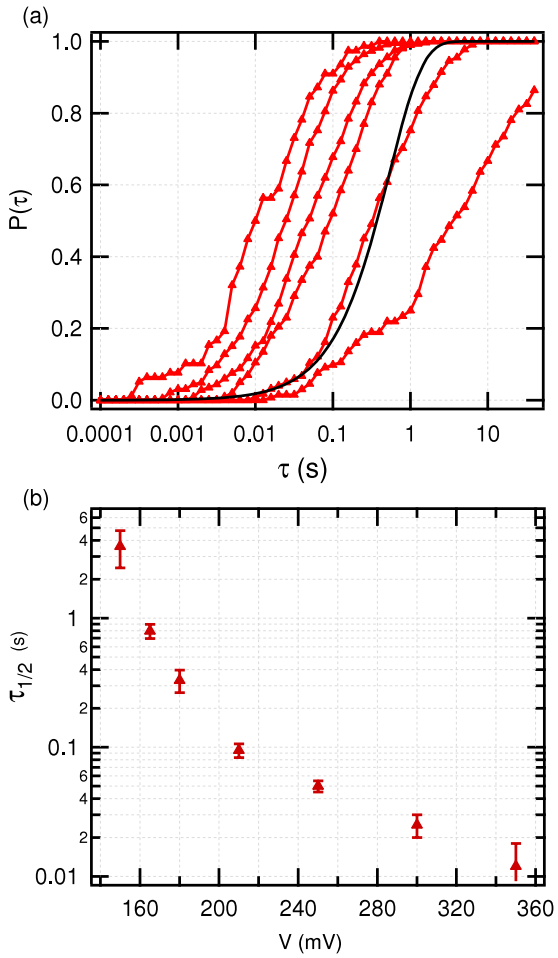



**Figure 1.** Experimental results. (a) Cumulative distributions of the translocation times $P(\tau)$ for the 45-mer duplex *Dupl* at various voltages. From right to left, $V = 150$, 180, 210, 250 and 350 mV. Translocation experiments were performed at 24 °C, pH 7.4, 1 M KCl. The black solid lines correspond to an exponential fit of the distribution at 180 mV: $P(\tau) = 1 - \exp(-\alpha\tau)$. (b) Median time $\tau_{1/2}$ of the distributions as a function of the applied voltage $V$. Notice that $\tau_{1/2}$ does not vary exponentially with $V$. Doubling $V$ results in a 2.5 decade decrease in $\tau_{1/2}$.

We thus describe the unzipping process as a random walk of the opening fork. This dynamic description is similar to the approaches proposed to explain DNA unzipping using magnetic traps at constant force [33]. Unzipping of

DNA can be described theoretically as a random walk of a fictitious particle (representing the opening fork) in a free energy landscape. The landscape is calculated as the free enthalpy gain of the system as a function of i—the position of the DNA in the pore [23] and ii—the number of open base pairs [23, 24, 22]. The action of the transmembrane voltage is modeled by a bias of the energy landscape. The bias can be implemented in two ways. A 'ratchet-like' approach: the entry rate of a single base in the pore depends on the voltage, whereas the opening and closing of each base pair [23] is only thermally activated without any voltage dependence. Or a 'mechanical' approach: the opening fork always stands at the pore constriction, the threading of the single strand is instantaneous and the electrophoretic drive biases the opening and closing rates of the last closed base pair [34, 24]. In the following, we describe a 1D model that takes this 'mechanical' approach.

Let us assume that the opening fork always stands at the pore constriction, the threading of the single strand is instantaneous and the electrophoretic drive biases the opening and closing rates of the last closed base pair. The energy landscape is built as a function of the base number $j$ as

$$E_j = \sum_{i=1}^{j} (\Delta H_i - T\,\Delta S_i) - j\,w \qquad (3)$$

where $\Delta H_i$ and $\Delta S_i$ are the tabulated bulk melting values of each base pair according to the nearest-neighbor model [31]. The mechanical and electrostatic energy difference $w$ between two bases paired on the *cis* side of the membrane and two bases, unpaired, one on each side of the membrane, is assumed to be sequence-independent. The energy landscape is thus tilted linearly by $w$. The translocation time of a particle equals its first passage time at base $N$. The latter is calculated numerically by solving the associated Fokker–Planck equation by discrete steps equal to one base, as described in section 2.

Figure 2(a) shows the distributions of translocation time calculated for the *Dupl* sequence at various biasing energies $w$ ranging from 2.5 to 5 $k_BT$. The dependence of the median times $\tau_{1/2}$ with $w$ is also represented in figure 2(b). The model makes both the following predictions:

(i) For $w$ smaller than ~3.3 $k_B$ T, the distributions can be well fitted by a single exponential $P_w(\tau) = 1 - \exp(-\tau/\tau_o)$ (see figure 2(a)). For values of $w$ above 3.3 $k_BT$, the distributions become steeper than exponential.

(ii) $\tau_{1/2}$ diverges very quickly at low biasing energy $w$ and more slowly at low $w$. Doubling $w$ results in an 11 orders of magnitude reduction of the translocation time.

Both effects can be explained by the shapes of the energy landscape $E_j$ depicted in figure 3 for various $w$. At low $w$, the energy landscape has local minima that pin the unzipping fork. The pinning regions are highlighted in bold.

For $w < 3k_BT$ the landscape displays a single minimum localized at $n = 0$ corresponding to the fully closed molecule. The unzipping process is thermodynamically unfavorable and occurs only through a fluctuation over a very large effective energy barrier corresponding to the whole energy profile.

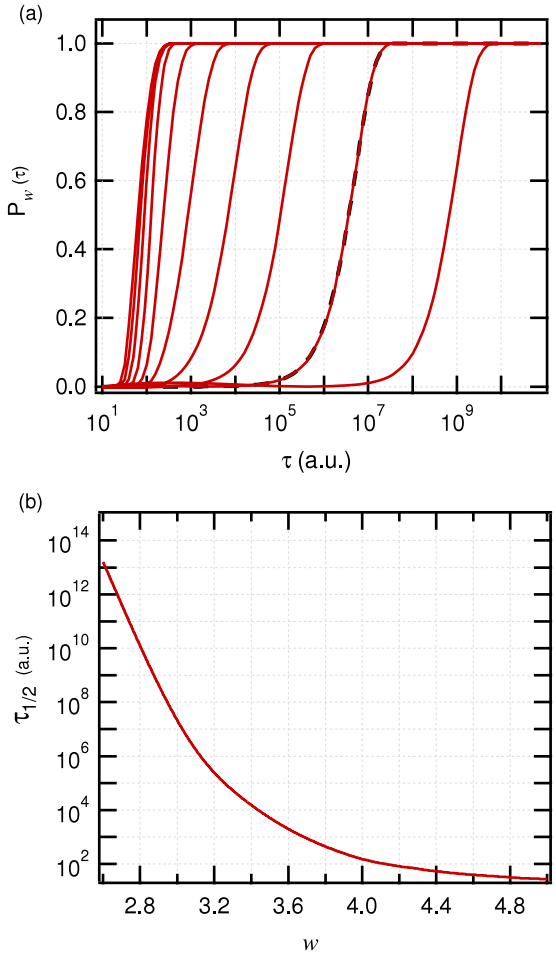



**Figure 2.** Predicted values of the distribution of first passage times assuming constant biasing energy $w$. (a) Cumulative distributions of first passage times $P_w(\tau)$ for the *Dupl* sequence at various $w = 2.89$, 3.1, 3.25, 3.5, 3.7, 3.9, 4 and 4.2 $k_BT$ (right to left). For small $w$, the distributions nicely fit to a simple exponential (dashed line). At larger $w$, the distributions become increasingly sharp. (b) Median first passage times $\tau_{1/2}$ versus $w$. Notice the very strong dependence of $\tau_{1/2}$ with $w$ for $w < 3.2k_BT$. Doubling the bias energy results in an 11-decade decrease of the translocation time.

This explains the very large values of $\tau_{1/2}$ at low $w$ and the exponential form of $P_w(\tau)$.

For $3 < w < 3.8k_BT$, the unzipping process is thermodynamically favorable but should still occur by an activated jump over an energy barrier with a voltage-dependent width. Furthermore, in the present energy landscape a second minimum appears around base 15 that localizes the unzipping fork. The activation energy for DNA unzipping is then due to bases $n > 15$. The escape process is still thermally activated but the effective energy barrier is changed. It results that $\tau_{1/2}$ has a non-monoexponential dependence with $w$.

For $w > 3.8k_BT$, there is no local minimum anymore. The unzipping fork is no longer pinned. The unzipping process is not dominated by a Kramers escape rate but amounts to a biased diffusion in a smooth landscape. In this ballistic limit $\tau_{1/2}$ varies linearly with $w$. A detailed discussion of these regimes can be found in [24].

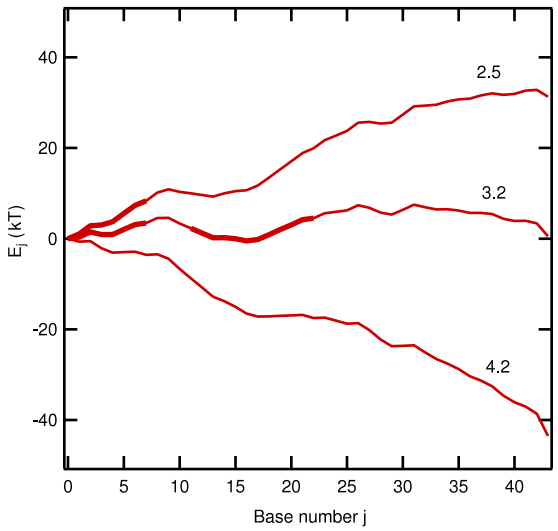



**Figure 3.** Energy landscape $E_j$ for the *Dupl* sequence at $w = 2.5k_BT$, $3.2k_BT$ and $4.2k_BT$. Monitoring $f(n,t)$, the probability of finding the unzipping fork on base $n$ at time $t$, we identified the pinning region of the unzipping process. These regions are highlighted in bold. At low $w$ the unzipping fork is localized around base zero and translocation occurs by an activated jump over the energy barrier made by the whole sequence. At intermediate $w$, a second minima appears that pins the unzipping fork around base 15. The activation barrier is reduced. At large $w$ the landscape does not present any minima and the translocation is no longer an activated process.

In order to relate the theoretical predictions to the experimental data we needed to evaluate the biasing energy applied to an individual base $w$ as a function of $V$. In leading order $w$ is expected to be proportional to the biasing voltage $w = q_{\text{eff}} V$. The effective charge $q_{\text{eff}}$ should depend not only on the charge of the DNA but also on other transduction factors such as the local geometry and elasticity. It is left as a fitting parameter. According to the model, doubling of $w$ results in a 11 orders of magnitude decrease of the predicted $\tau_{1/2}$. However, we experimentally observe a 2.5 orders of magnitude decrease upon doubling $V$. Hence the predicted localization of the unzipping fork is much too strong compared to our experimental observations. In addition, over the whole experimental voltage range, the measured distributions $P_w(\tau)$ always span several time decades, while the model predicts a ballistic regime with very narrow distributions $P_w(\tau)$ at large $w$. It is a clear indication that the ballistic regime is not observed in the available voltage range.

The model hence needs to be modified in order to fit our experimental results. In particular, the pinning transition needs to be more progressive. Since the nonlinear dependence of the translocation time with $V$ is strong, one can expect that small temporal fluctuations of the biasing energy $w$ may result in a large effect on the distribution of translocation times. Indeed $w$ is prone to fluctuate, even at fixed applied voltage, since it should depend on the pore/DNA configuration, the instantaneous charge distribution and the instantaneous pore configuration. The translocation process might be assisted by thermal fluctuations in the biasing force. To investigate this idea, we implement such fluctuations by introducing a time-dependent energy landscape calculated as

$$E_j(t) = \sum_{i=0}^{j} (\Delta H_i - T\,\Delta S_i) - j\,w(t) \qquad (4)$$

where $w(t)$ is now a time-dependent stochastic variable with a Gaussian probability $p(w) = \frac{1}{\sqrt{(2\pi\sigma^2)}} \exp^{(-(w-w_o)^2/2\sigma^2)}$ centered on $w_0$ with $w_o = q_{\text{eff}} V$ and with a voltage-independent spread $\sigma$ of order $1k_BT$. In order to simplify the resolution of the dynamic equation, we assume that *w(t)* is constant by part during a correlation time $\tau_{\text{corr}}$. We also assume that the fluctuations of *w(t)* happen on a much longer timescale than the thermal fluctuations acting on individual base pairs. Thermal noise and force fluctuations are thus additive. Strictly speaking, the Fokker–Planck equation is a noiseless equation derived from a Langevin equation with a random noise. The expression we use is valid only for white uncorrelated thermal noise. If the random force is 'colored' and correlated [35], the expression of the Fokker–Planck equation is longer than the one solved here. However, in the present case we take $w$ constant by part. Hence our treatment of the noise is correct. Under these assumptions the diffusion dynamics can still be described by the usual Fokker–Planck equation. For every $\tau_{\text{corr}}$ the value of $w$ is randomized to an uncorrelated value of probability $p(w)$. The unzipping probabilities are averaged over 500 noise realizations for each $w_o$. We thus have the following fitting parameters: $q_{\text{eff}}$ that determines the force transduction efficiency, $D$ that determines the unitary timescale of the simulation and $\tau_{\text{corr}}$ that sets the correlation time of the fluctuations. $\sigma$ is expected to be of order $1k_BT$.

Let us analyze different limits for the noise correlation time.

In the limit of $\tau_{\text{corr}} \sim 1$ (a.u.), i.e. around the unitary time required to move by only one base, the noise effect is very small. The value of $w$ is randomized at each step. Since the translocation process involves many single-base opening steps, it amounts to biasing the energy landscape by the value $\bar{w} = w_o$. This limit is equivalent to our previously described model at a fixed $w$.

The limit $\tau_{\text{corr}} \to \infty$ depicts a situation where each single molecule translocates with a random but fixed $w$. The probability distributions of unzipping times should then be the average of the probabilities obtained by the previous model for $w$ varying by a few $k_BT$. The typical translocation times for these distributions span the full time range covered by a $1k_BT$ variance in $w$. This range is around 7–8 decades in time for small $w_o$. It would thus mean that the distributions should be extremely large with most molecules remaining stuck in the pore. Experimentally, though, we observe that almost all molecules end up translocating over two decades in time.

We thus investigate the regime where $\tau_{\text{corr}}$ is of the same order of magnitude as the translocation time of DNA for rather large values of fixed $w$. Assuming $\sigma = 1k_BT$, we study the dependence of $\tau_{1/2}$ versus $w_o$ for various $\tau_{\text{corr}}$. As shown in figure 4 the effect of $\tau_{\text{corr}}$ is rather strong. For $\tau_{\text{corr}} = 30$ a.u. we find that $\tau_{1/2}$ now decreases by only 2.5 orders of magnitude upon doubling $w_o$. The first passage time distributions are also more stretched than in the preceding

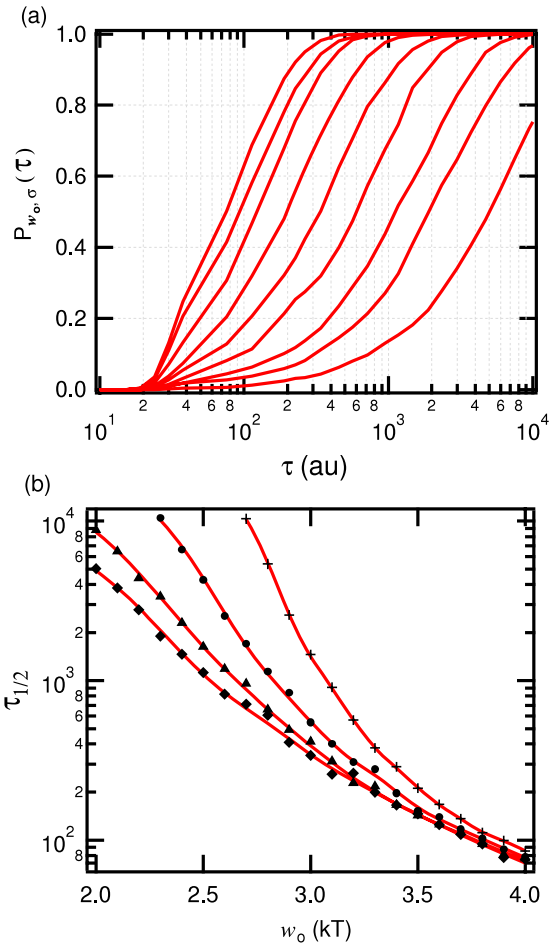



**Figure 4.** Effect of a Gaussian correlated noise of amplitude $\sigma = 1\,k_BT$ on the unzipping process. (a) Cumulative distributions of the first passage times $P_{w_o,\sigma}(\tau)$ for *Dupl* sequence at various $w_o$ and a correlation time $\tau_{corr} = 30$ a.u. $w_o = 2$, 2.3, 2.5, 2.8, 3.0, 3.3, 3.6, 3.8 and $4k_BT$ (right to left). The distributions $P_{w_o,\sigma}(\tau)$ are wider than in the previous model especially at large $w_o$. (b) Dependence of $\tau_{1/2}$ with $w_o$ for $\sigma = 1k_BT$ and $\tau_{corr} = 10$, 20, 30 and 40 a.u. Notice the reduction of the divergence of $\tau_{1/2}$ with increasing correlation time.

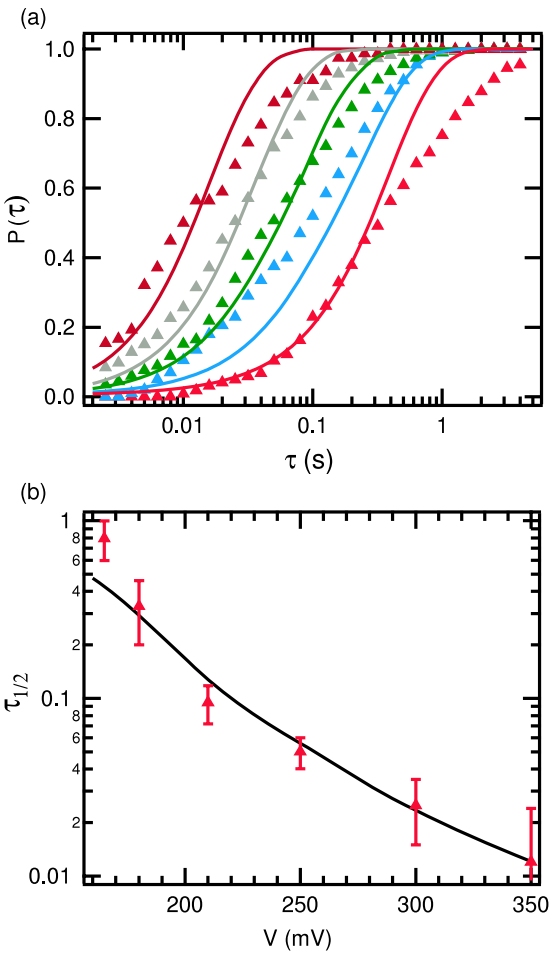



**Figure 5.** (a) Fit of the experimental curves (symbols) by the predicted first passage time distributions for the following values of fitting parameters: $\sigma = 1.2k_BT$, $D = 9$ base$^2$ $\mu s^{-1}$, $q_{eff} = 0.22$ and $\tau_{corr} = 2.1$ ms. (b) Fit of the dependence of the experimental median translocation time. The introduction of fluctuations in the biasing energy leads to a significantly improved agreement between experiment and theory.

model, especially at large $w_o$. Introducing Gaussian correlated noise in the value of the biasing energy thus greatly reduces the dependence of $\tau_{1/2}$ with $w_o$. It can be crudely understood by saying that, even if $w_o$ lies in the highly pinned regime, the molecules translocate when the fluctuation is large enough to allow its unzipping during the correlation time. An analytical description of this effect can be found in the appendix.

Our experimental data can now be fitted as shown in figure 5. We find $q_{eff} = 0.22e$ (in agreement with previous publications [9, 23, 36]) and $D$ is 9 base$^2$ $\mu s^{-1}$ corresponding to a unitary time step of 1.1 $\mu$s (in agreement with a typical DNA single-base unzipping and translocating rate [23, 20, 37]). The best fit is obtained for $\sigma = 1.2k_BT$. Our model then predicts that the correlation time of the fluctuations $\tau_{corr} \sim 2$ ms. The fit of the unzipping time probabilities is given in figure 4(a) at various $w_o$. Although the predicted distributions do not perfectly fit the experimental curves, the agreement is very significantly improved by the introduction of time-correlated fluctuations in the bias energy. This indicates that a stochastic resonance [35, 38] affects the unzipping process, in the sense that the presence of noise greatly facilitates the translocation. One might expect that the agreement between experiment and theory could be further improved by refining our description of the noise. A more rigorous treatment of the problem would be to solve a 2D master equation using the Gillespie method with both fork position and $w$ as stochastic variables with appropriate transition rates. This approach is left for future work.

In addition to force fluctuations, one could also expect that the unzipping energy landscape in a nanopore differs from the landscape derived from the nearest-neighbor model measured in bulk. Entropic differences between the unzipped and zipped states are likely to be reduced due to the confined environment. This effect should tend to stabilize the paired state and minimize the effect of temperature. In contrast, the possible interactions through hydrogen bonds of the bases with the pore hydrophilic residues could lower the enthalpic contribution of the melting energy and favor DNA unzipping. The pore could then have a kind of 'catalytic' action on the

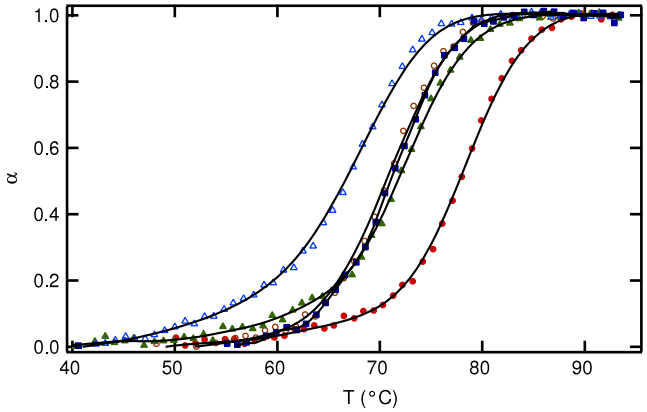



**Figure 6.** Thermal melting curves of the five short hairpins: the dissociation coefficient $\alpha = \frac{[ssDNA]}{[dsDNA]}$ is plotted as a function of temperature for hp1 (●), hp2 (▲), hp3 (○), hp4 (■) and hp5 (△). The melting temperatures are ordered according to the predicted hairpin stabilities.

duplex unzipping process. In the absence of quantitative measurements of these effects, it is hard to conclude what is the main contribution of the pore on DNA unzipping.

### *3.2. Unzipping of short hairpins: putative role of cooperative unzipping*

The model presented above assumes that the kinetics of DNA unzipping is governed by the duplex energy landscape. The influence of DNA stability on the distributions of translocation times was usually performed on small hairpins (around 10 bases). The sequence stabilities were modified either by lengthening the sequence [9, 19] or by introducing mismatches [8, 10, 19]. These modifications not only change the total base-pairing energy by several tens of per cent but also modify the number of base pairs to open. It was found that the translocation times of these molecules correlate either quantitatively [39] or qualitatively [17, 19] with the hairpin stability. These translocation process were described by a simple Kramers process. However, in a Kramers event the height of the energy barrier may not correlate with the stability difference between both equilibrium states. Furthermore, cooperative opening of bases as well as local force spreading along the DNA molecule could be expected to play an important role in the dynamics of unzipping of short molecules. In this section we experimentally show that short hairpins do not always translocate according to their global stabilities as usually described in the literature. We then derive a simple 1D athermal model that accounts for duplex rigidity in order to illustrate how shear forces spread along the DNA molecule during nanopore unzipping.

*3.2.1. Small hairpins' translocation is not always controlled by their global stabilities.* We designed 5 hairpins of 15 base pairs with the following characteristics: the first 8 bases (AGGCTGCG) and the loop sequence (GTTG) are identical for all molecules and an overhang of 30 polyA is added at their 3′ moieties. Mfold Server was used to predict the thermodynamic

**Table 2.** Thermodynamical parameters of the DNA hairpins predicted by the Mfold Server at 1 M NaCl and 24 °C. $\Delta H_o$ is in kcal mol$^{-1}$, $\Delta S_o$ in cal mol$^{-1}$ K$^{-1}$ and $\tau_{1/2}$ in ms.

| Name | $\Delta H_o$ | $\Delta S_o$ | $\Delta G_o$ | A | T | G | C | $\tau_{1/2}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hp1 | 148.3 | 395.64 | 30.8 | 3 | 8 | 3 | 4 | 5 |
| Hp2 | 149.1 | 402.8 | 29.5 | 5 | 6 | 4 | 3 | 18 |
| Hp3 | 145.7 | 394.37 | 28.6 | 6 | 6 | 2 | 4 | 9 |
| Hp4 | 145.7 | 394.7 | 28.5 | 6 | 6 | 2 | 4 | 39 |
| Hp5 | 144.4 | 391.9 | 28 | 5 | 6 | 4 | 3 | 23 |

parameters of the hairpins. The hairpins are named according to their stability in descending order. The free enthalpy differences at 24 °C between hp1 and hp5 are 2.8 kcal mol$^{-1}$ = $4.8k_BT$/molecule. The values are summarized in table 2.

First, we checked that the thermal melting profiles of the hairpins vary according to the predicted stabilities. As shown in figure 6, the melting temperatures follow the free enthalpy order. The hairpins were then threaded at constant voltage (150 mV) through a single alpha-hemolysin pore in 100 mM *tris* buffer at pH = 7.4, 1 M KCl and 24 °C. The scatter plot of the normalized blocked currents $i_b$ versus the translocation times $\tau$ for each hairpin are shown on figure 7(a). Figure 7(b) shows the overlay of the cumulative translocation probabilities $P(\tau)$ for the various molecules. The graphs clearly indicate that the blocked current is the same for all sequences, whereas the translocation times vary. The hairpins can be classified by increasing order of characteristic translocation times as: hp1 < hp3 < hp2 < hp5 < hp4. The corresponding values of $\tau_{1/2}$ defined as $P(\tau_{1/2}) = 0.5$ are given in table 2. Surprisingly, figure 7(b) indicates that hp1 translocates about ten times faster than hp4. The cumulative distributions $P(\tau)$ cannot be perfectly fitted by a monoexponential. They display a long time tail larger than what is expected from an activated jump over a single energy barrier. The width of the distributions also increase as the characteristic time becomes longer. It results that the unzipping of these hairpins cannot be described by a simple two-state process separated by an activation energy barrier that scales with the global stability of the hairpins. The non-exponential distributions probably result from multiple intermediate states, the energies of which are not correlated with the global helix stability. In particular, DNA/pore interactions can act as catalysts as described in section 3.1. However, hp3 and hp4 have almost the same global stability and base content but translocate on different timescales. We do not have any final explanation for our observations: however, in the rest of the paper we would like to point out the possible role of the local elasticity of the DNA molecule on the force spreading along the bases and in turn on the unzipping cooperativity. We do not pretend that it explains our results but it just emphasizes the fact that local mechanical properties of the DNA helix can play an additional role to base-pair stability for unzipping of short DNA hairpins.

*3.2.2. Simple athermal 1D model.* It was previously reported that the unzipping time of a hairpin depends on the pore geometry and on the DNA position relative to the pore constriction [28]. Similarly, experiments and

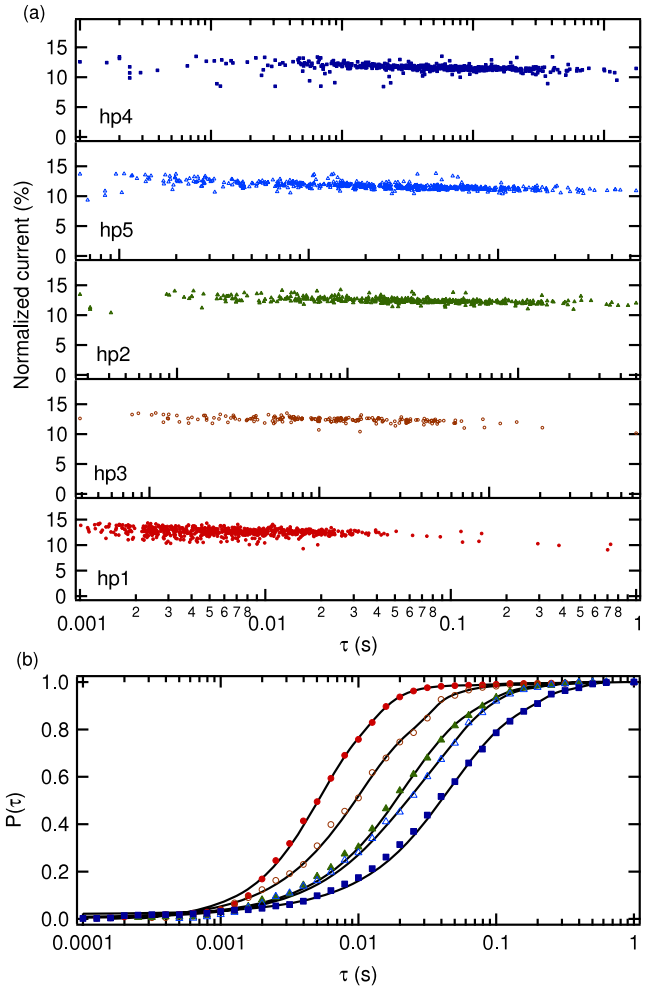



**Figure 7.** (a): Scatter plots of normalized blocked currents versus translocation times $\tau$ for all hairpins. From top to bottom: hp4, hp5, hp2, hp3 and hp1. (b): Cumulative probability of the translocation times of hp1 (●), hp2 (▲), hp3 (○), hp4 (■) and hp5 (△). The probability is calculated over 600 events on average. Straight lines are guides to the eye. Notice that the median translocation times do not follow the hairpin stability order.

simulations [40, 18] have shown that the threshold voltage for DNA hairpin translocation through artificial pores of 1.5 nm is lower than through pores of 2 nm. This counterintuitive result was attributed to two preferential translocation modes selected by the pore diameter: smaller holes favor low energy translocation modes where the DNA bases unzip; in contrast, larger holes favor higher energy processes where the DNA duplex is stretched without unzipping. Selection of these modes is mediated through DNA/pore interactions. In this section we point out that the local elasticity of the molecule might also play an important role in short DNA unzipping. The unzipping of a DNA hairpin lodged in the vestibule part of the pore and held with the polyA handle is depicted in figure 8. The bases are likely to undergo a shear stress, forcing them to open along the DNA axis. However, in such a configuration, the electrophoretic drive is transduced into a mechanical force through the single-stranded part lodged in the stem and the mechanical reaction of the pore in the vicinity of the constriction. The size of the sheared region and the magnitude of the shear stress depend on the local torsional and elongational modules of the molecule. In turn, these local moduli depend on the sequence. Figure 8 depicts an idealized 1D model view inspired by [41] of the DNA hairpin under a shear force $F$ applied at its ends. The model is purely athermal and intended to illustrate the putative role of molecule elasticity. More elaborate models or simulations should be derived to expect any fitting potency. Each nucleotide is represented by a massless bead connected along the DNA backbone by a spring of constant $k_s$ and bound to its complementary base by a breakable elastic spring of constant $k_b$ and rupture force $f_c$. This is, of course, an oversimplified vision, neglecting the 3D DNA structure. The structure is coarsely described by the effective value of $k_s$ that also accounts for part of the stacking interactions between bases. We define $r = \frac{k_b}{k_s}$ and call $N$ the number of base pairs. $u_i$ (respectively $v_i$) represents the displacement of base pair $i$ from its equilibrium position on strand 1 (strand 2, respectively). $f_i$ is the local force sustained by base $i$. Unzipping occurs if $f_i > f_c$, where $f_c$ is the local critical force. $f_i$ is written: $f_i = k_b(u_i - v_i)$ and can be calculated by solving the following system (see the appendix):

$$\begin{pmatrix} \alpha & 1 & & & & & \\ 1 & \alpha-1 & 1 & & & & \\ & 1 & \alpha-1 & 1 & & & \\ & & & \cdots & & & \\ & & & & 1 & \alpha & \end{pmatrix} \mathbf{f}_i = \begin{pmatrix} 2fr \\ 0 \\ 0 \\ \cdots \\ 0 \end{pmatrix} \quad (5)$$

where $\alpha = -(1 + 2r)$. In this model $f_i$, the force supported by each base pair is thus a function of the relative rigidity of the bases compared to backbone $r$ and on the total number of base pairs of the DNA duplex (through the dimension of the matrix).

Let us first analyze the regime of large $N$. As shown in figure 9 inset, $f_i$ is accurately approximated in this limit by the continuum solution $f_i = f_1 \exp[(i-1)/\lambda]$ with $\lambda = \sqrt{1/2r}$. The shear stress amplitude $2F$ is supported by each base pair with a characteristic exponential decay length $\lambda$. In a quasi-static regime the sum of forces is null $\sum_0^N f_i = 2F$. This condition imposes $F = \frac{\lambda}{2} f_1[1 - \exp(-N/\lambda)]$. The critical external force needed to trigger DNA unzipping is thus: $F_c = \frac{\lambda}{2} f_c[1 - \exp(-N/\lambda)]$. If $F > F_c$ collective opening can occur over $j$ base pairs provided that $f_j > fc$. $F_c$ does depend on $N$ and $r$ because of the shear spreading along the molecule. In typical DNA unzipping using magnetic or optical tweezers the force is applied orthogonally to the DNA backbone. Only the first base supports the whole external stress and $F_c = f_c$. In contrast, for nanopore unzipping where DNA is likely to be shear-opened, the critical external force is $F_c = \sqrt{\frac{1}{8r}} f_c$ in the limit of large $N$. Figure 9(a) shows the dependence of $f_i$ with the ratio $r = \frac{k_b}{k_s}$ for a duplex of 40 base pairs. For large $r$, the first base undergoes a high shear force of the order of $2f$ whereas the following bases hardly support any stress. In the other limit, $r \ll 1$, the shear force is equally supported by all base pairs. The threshold force supported by a base pair is the rupture force $f_c$ above which the base pairs open. If $r \gg 1$ the bases will open one by one for $F > 1/2 f_c$. If $r \ll 1$, all base

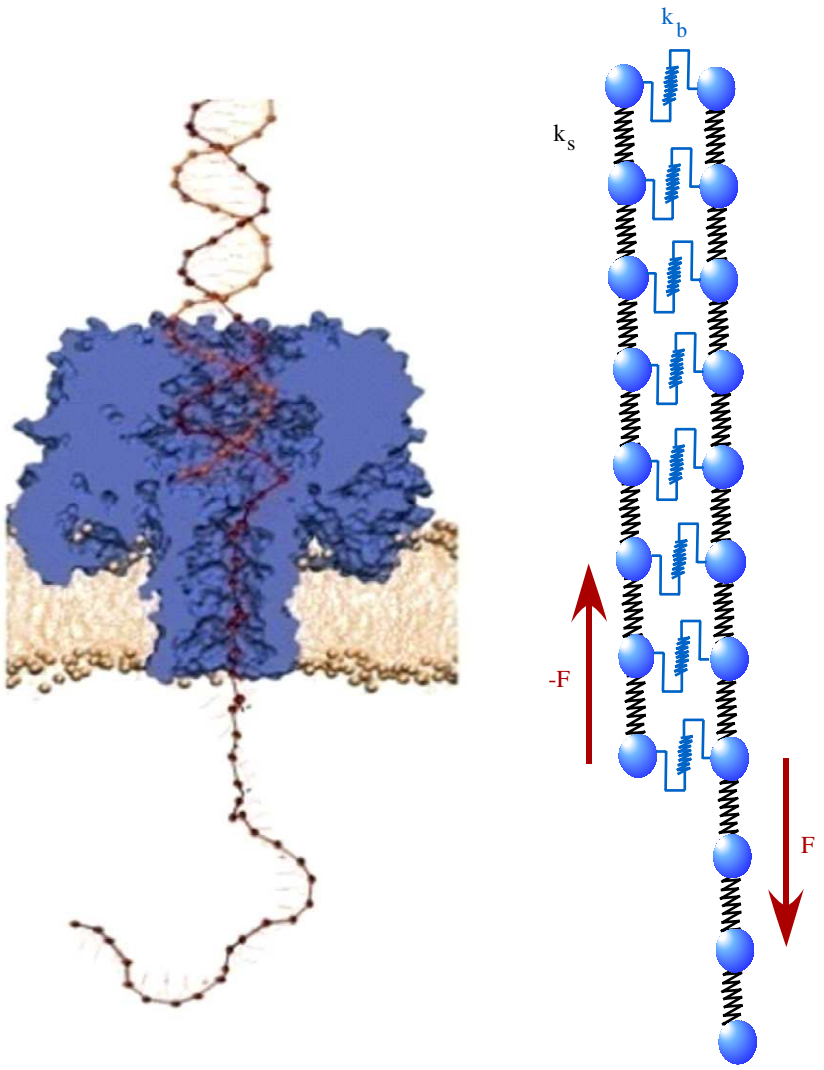



**Figure 8.** Left: putative position of the dsDNA in the pore. Right: 1D model of the DNA molecule under a shear stress. A point force $f$ is applied on the first closed base pair. The elasticity of the DNA backbone is described by a spring constant $k_s$ between each nucleotide. The elasticity of a base pair is modeled by the spring constant $k_b$. The force spreads exponentially along the DNA helix.

pairs will open simultaneously for $F > N/2\,f_c$. It is likely that the relevant values of $r$ are below 0.1 if one compares the forces needed to unzip DNA (12 bp) compared to those needed to stretch it (60–120 pN). A good way to estimate $r$ would be to run a simulation of DNA under shear and measure the spread of the deformation for a very long DNA duplex.

In the limit of $N \lesssim \lambda$ finite size effects occur and the shear spreading is no longer exponential. Figure 9(b) shows the distribution of the force along the duplex for a fixed force $F$, a ratio $r = 0.001$ and for different duplex lengths. For $N = 200$ the force decreases exponentially along the molecule. As $N$ decreases the force sustained by each base increases accordingly. Hence for a homogeneous duplex with $r = 0.001$ and a critical force $f_c$, the critical shear $F_c = 0.5\frac{f_c}{0.1}$ for $N = 10$ but increases to $F_c = 0.5\frac{f_c}{0.04}$ for $N = 200$. In this limit, and for a fixed external stress $F$, a short hairpin can open $j$ base pairs at a time whereas a longer hairpin can stay closed. This result is not due to the global stability of the hairpin but to elastic spreading of the force along the molecule. This effect does not exist in optical trap DNA unzipping since the force is orthogonal to the backbone and $F_c = f_c$ independently of the duplex length.

We conclude that molecules shorter than the typical length $\lambda$ may open cooperatively at smaller forces than longer molecules and that more rigid molecules are expected to unzip at larger forces but in a more cooperative way. These conclusions do not involve any considerations on the base-pairing stability. For short hairpins the sequence-dependent local elasticity of the molecule is likely to play a role in the unzipping mechanism. More accurate evaluation of this effect could be tested by MD simulations.

## 4. Conclusion

We showed that the nanopore unzipping of long DNA sequences can be understood as a diffusion of the unzipping fork along the sequence energy landscape, biased by a fluctuating force. Assuming Gaussian fluctuations with a

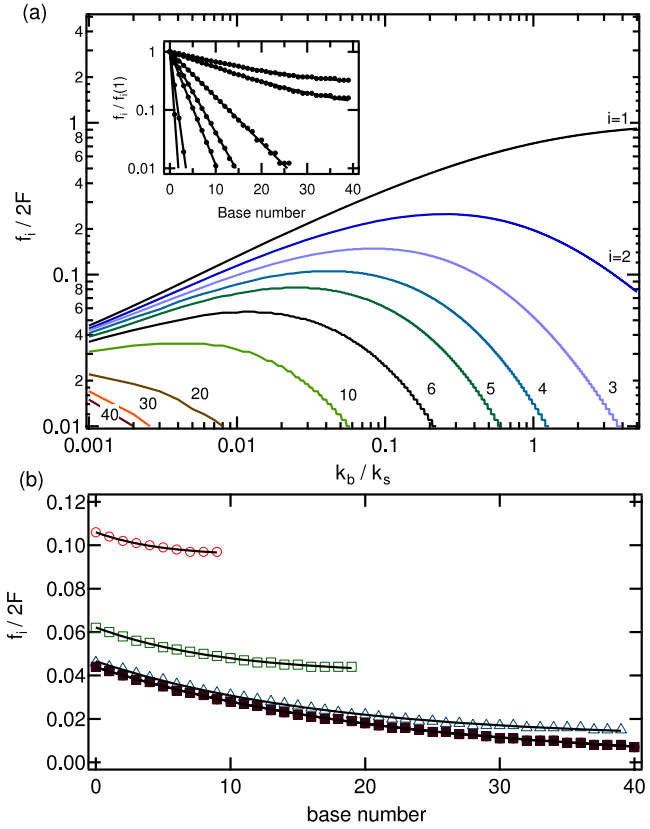



**Figure 9.** A: normalized forces exerted on the base pair as a function of the ratio $r = k_b/k_s$ for bases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20 and 40. $f_b(n)$ denotes the force sustained by base pair $n$ and $f$ is the externally applied force. At large $r$, the shear force is mostly supported by the first base pair. In the opposite limit, each base pair is equivalently sheared. Inset: force supported by each base pair for $r = 5$, 1, 0.1, 0.05, 0.015, 0.002 and 0.001 from left to right. The shear force decays exponentially over a characteristic distance $\lambda = \sqrt{\frac{k_s}{2.k_b}}$. B: finite size effects on the base pair load for fixed force $F$ and given ratio $r = 0.001$. The various curves are plotted for 10 (○), 20 (□), 40 (△) and 200 (■) base pairs.

standard deviation of $1k_BT$ and a correlation time around 2 ms, we could reproduce the measured distributions of unzipping times and their voltage dependence. The comparison between experiment and theory indicates that thermal fluctuations of the biasing force are important for the translocation of molecules through nanopores and that the associated unzipping is assisted by a stochastic resonance. We further showed examples of 15 base-pair hairpins that do not translocate according to the global stability of their helix, as usually reported in the literature. We discussed the influence of factors other than base-pair stability on the dynamics of translocation of short hairpins. We specifically focus on the problem of cooperativity due to local DNA elasticity.

## Acknowledgments

We would like to thank T Maggs, F Petrelis, A Aksimentiev and D Lacoste for fruitful discussions. This work was supported by ANR grant ANR-06-NANO-015.

## Appendix

### *A.1. Analytical derivation of the cumulative first passage time distributions*

In this appendix we derive a semi-analytical expression of the distribution of first passage time $P_{w_o,\sigma}(\tau)$ assuming that the biasing energy is constant over a time $\tau_{corr}$. We study both limits: $\tau \ll \tau_{corr}$ and $\tau \gg \tau_{corr}$. In the limit $\tau \ll \tau_{corr}$, the value of $w$ is constant over $0 < t < \tau$ but random for each molecule. $P_{w_o,\sigma}(\tau)$ then is

$$P_{w_o,\sigma}(\tau) = \int_0^\infty p(w) P_w(\tau)\, \mathrm{d}w = \langle P_w(\tau) \rangle \qquad \text{for } \tau \ll \tau_{corr}.$$

In the limit $\tau \gg \tau_{corr}$, the value of $w$ is constant by part over a time period of $\tau_{corr}$. The probability of translocating during a time interval of $\tau_{corr}$ is thus $\int_0^\infty p(w) P_w(\tau_{corr})\, \mathrm{d}w$. It is constant over each interval $\tau_{corr}$. Let us call $\tilde{P}_{w_o,\sigma}(\tau) = 1 - P_{w_o,\sigma}(\tau)$. Then $\tilde{P}$ is

$$\tilde{P}_{w_o,\sigma}(\tau + \tau_{corr}) = \left[1 - \int_0^\infty p(w) P_w(\tau_{corr})\, \mathrm{d}w\right] \times \frac{1}{\tau_{corr}} \tilde{P}_{w_o,\sigma}(\tau) \tau_{corr}.$$

where $P_w(\tau)$ is the translocation time distribution calculated at constant $w$. **Q.2**

In the limit of large $\tau \gg \tau_{corr}$, $\tilde{P}_{w_o,\sigma}(\tau)$ satisfies the equation

$$\partial_\tau \tilde{P}_{w_o,\sigma}(\tau) = -\underbrace{\frac{1}{\tau_{corr}} \int_0^\infty p(w) P_w(\tau_{corr})\, \mathrm{d}w}_{\nu} \tilde{P}_{w_o,\sigma}(\tau).$$

Thus at long time the distribution of first passage times becomes exponential with a characteristic rate $\nu$ that depends on the sequence and on the correlation time:

$$P_{w_o,\sigma}(\tau) = 1 - \exp(-\nu\tau) \qquad \text{for } \tau \gg \tau_{corr}.$$

### *A.2. Solution of the 1D spring model*

The system of equations that determines the deformation of the molecule in this 1D model is the following.

For base $i = 1$

$$k_s(u_2 - u_1) + k_b(v_1 - u_1) = f \tag{6}$$

$$k_s(v_2 - v_1) + k_b(u_1 - v_1) = -f \tag{7}$$

for base $1 < i < N$

$$k_s(u_{i-1} - 2u_i + u_{i+1}) + k_b(v_i - u_i) = 0 \tag{8}$$

$$k_s(v_{i-1} - 2v_i + v_{i+1}) + k_b(u_i - v_i) = 0 \tag{9}$$

for base $i = N$

$$-k_s(u_N - u_{N-1}) + k_b(v_N - u_N) = 0 \tag{10}$$

$$-k_s(v_N - v_{N-1}) + k_b(v_N - u_N) = 0. \tag{11}$$

This system is readily solved using the variable $\Delta_i = u_i - v_i$ and $\Sigma_i = u_i + v_i$.

Q.3

## References


[1] Kasianowicz J J, Brandin E, Branton D and Deamer D W 1996 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93** 13770–3

[2] Akeson M, Branton D, Kasianowicz J J, Brandin E and Deamer D W 1999 *Biophys. J.* **77** 3227–33

[3] Stefureac R, Long Y T, Kraatz H B, Howard P and Lee J S 2006 *Biochemistry* **45** 9172–9

[4] Oukhaled G, Mathe J, Biance A L, Bacri L, Betton J M, Lairez D, Pelta J and Auvray L 2007 *Phys. Rev. Lett.* **98** 158101

[5] Makarov D E 2009 *Acc. Chem. Res.* **42** 281–9

[6] Bezrukov S M and Kasianowicz J J 2001 *Biol. Memb.* **18** 453–7

[7] Wu H C and Bayley H 2008 *J. Am. Chem. Soc.* **130** 6813–9

[8] Sauer-Budge A F, Nyamwanda J A, Lubensky D K and Branton D 2003 *Phys. Rev. Lett.* **90** 238101

[9] Mathe J, Visram H, Viasnoff V, Rabin Y and Meller A 2004 *Biophys. J.* **87** 3205–12

[10] Sutherland T C, Dinsmore M J, Kraatz H B and Lee J S 2004 *Biochem. Cell Biol. Biochim.* **82** 407–12

[11] Pastoriza-Gallego M, Gibrat G, Thiebot B, Betton J M and Pelta J 2009 *Biochim. Biophys. Acta-Biomemb.* **1788** 1377–86

[12] Zhao Q, Sigalov G, Dimitrov V, Dorvel B, Mirsaidov U, Sligar S, Aksimentiev A and Timp G 2007 *Nano Lett.* **7** 1680–5

[13] Hornblower B, Coombs A, Whitaker R D, Kolomeisky A, Picone S J, Meller A and Akeson M 2007 *Nat. Methods* **4** 315–7

[14] Dorvel B, Sigalov G, Zhao Q, Comer J, Dimitrov V, Mirsaidov U, Aksimentiev A and Timp G 2009 *Nucleic Acids Res.* **37** 4170–9

[15] Hall A R, van Dorp S, Lemay S G and Dekker C 2009 *Nano Lett.* **9** 4441–5

[16] Tropini C and Marziali A 2007 *Biophys. J.* **92** 1632–7

[17] Mathe J, Arinstein A, Rabin Y and Meller A 2006 *Europhys. Lett.* **73** 128–34

[18] Comer J, Dimitrov V, Zhao Q, Timp G and Aksimentiev A 2009 *Biophys. J.* **96** 593–608

[19] McNally B, Wanunu M and Meller A 2008 *Nano Lett.* **8** 3418–22

[20] Viasnoff V, Chiaruttini N and Bockelmann U 2009 *Eur. Biophys. J.* **38** 263–9

[21] Dudko O K, Mathe J, Szabo A, Meller A and Hummer G 2007 *Biophys. J.* **92** 4188–95

[22] Bundschuh R and Gerland U 2005 *Phys. Rev. Lett.* **95** 208104–4

[23] Lakatos G, Chou T, Bergersen B and Patey G N 2005 *Phys. Biol.* **2** 166–74

[24] Bockelmann U and Viasnoff V 2008 *Biophys. J.* **94** 2716–24

[25] Heng J B, Ho C, Kim T, Timp R, Aksimentiev A, Grinkova Y V, Sligar S, Schulten K and Timp G 2004 *Biophys. J.* **87** 2905–11

[26] Heng J B, Aksimentiev A, Ho C, Marks P, Grinkova Y V, Sligar S, Schulten K and Timp G 2005 *Nano Lett.* **5** 1883–8

[27] Heng J B, Aksimentiev A, Ho C, Marks P, Grinkova Y V, Sligar S, Schulten K and Timp G 2006 *Biophys. J.* **90** 1098–106

[28] Muzard J, Martinho M, Mathe J, Bockelmann U and Viasnoff V 2010 *Biophys. J.* **98** Q.4

[29] Wanunu M, Sutin J, McNally B, Chow A and Meller A 2008 *Biophys. J.* **95** 4716–25

[30] Mergny J L and Lacroix L 2003 *Oligonucleotides* **13** 515–37

[31] Zuker M 2003 *Nucleic Acids Res.* **31** 3406–15

[32] Gilespie D 1977 *J. Phys. Chem.* **81** 2340–61

[33] Danilowicz C, Coljee V W, Bouzigues C, Lubensky D K, Nelson D R and Prentiss M 2003 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100** 1694–9

[34] Cocco S, Monasson R and Marko J F 2002 *Phys. Rev.* E **66** 051914

[35] Petrelis F, Aumaitre S and Mallick K 2007 *Europhys. Lett.* **79** 40004–5

[36] Nakane J, Wiggin M and Marziali A 2004 *Biophys. J.* **87** 615–21

[37] Flomenbom O and Klafter J 2003 *Phys. Rev.* E **68** 041910

[38] McDonnell M D and Abbott D 2009 *PLoS Comput. Biol.* **5** e1000348

[39] Vercoutere W, Winters-Hilt S, Olsen H, Deamer D, Haussler D and Akeson M 2001 *Nat. Biotechnol.* **19** 248–52

[40] Zhao Q, Comer J, Dimitrov V, Yemenicioglu S, Aksimentiev A and Timp G 2008 *Nucleic Acids Res.* Q.5

[41] de Gennes 2001 *C. R. Physique* **4** 1505–8 Q.6

# Chapitre 5

# Conclusion

Les modèles simples présentés en introduction sont des points de départ pour expliquer la translocation des molécules d'ADN dans les nanopores. La comparaison entre ces modèles et les expériences permet de voir si des effets plus subtils sont d'importance ou non. En l'occurrence, des modèles plus complexes comme ceux présentés dans le deuxième article sont nécessaires pour comprendre la physique du dézippage d'ADN à travers les nanopores. Nous pouvons toutefois regretter que les modifications apportées dans ces modèles alternatifs soient en partie "ad hoc". Actuellement, l'ordre de grandeur des fluctuations et de leur corrélation temporelle n'est étayé par aucune donnée expérimentale. Il manque aussi de données pour appuyer l'hypothèse de l'ouverture par cisaillement.

Indépendamment des effets de cisaillement, l'observation de temps de translocation dans le sens opposé aux énergies d'appariement (hp1 et hp4, cf deuxième article) peut être une manifestation de l'importance des interactions entre l'ADN et l'alpha hémolysine. L'étude des interactions entre la structure chimique du pore et celle de l'ADN paraît difficilement compatible avec une approche physique simple. Des études peuvent éventuellement être menées en dynamique moléculaire. Ce problème reste complexe étant donné la taille du système et la durée typique des évènements à prendre en compte. Actuellement, pour un système de cette taille, une microseconde peut être simulée pour une dynamique tout-atome tandis que les expériences mesurent des évènements dont la durée typique varie de quelques microsecondes à quelques secondes.

La pertinence de la modélisation physique simple de l'ouverture de l'ADN dans l'alpha hémolysine peut être mise en doute. La prise en compte de différents effets en milieu confiné (déplétion des co-ions, électro-osmose) tout en ignorant la structure moléculaire fine des deux protagonistes est-elle suffisante pour comprendre, par exemple, la faible dépendance en voltage du temps de translocation, la valeur de la charge effective de l'ADN et de la force appliquée ?

Notons que ces signaux de translocation sont malgré tout relativement faciles à analyser : le niveau de courant de blocage ne dépend pas des molécules et les distributions de temps de passage sont proches de monoexponentielles. Par contre, si l'on essaie de réaliser les mêmes expériences en inversant le sens du pore dans la membrane, nous obtenons une "zoologie" de signaux beaucoup plus complexes à interpréter. La géométrie du pore importe donc. Dans le sens "normal", la structure en champignon de l'alpha hémolysine permet probablement de

sélectionner le mode d'ouverture de l'ADN, puisqu'il est nécessairement orienté perpendiculairement à la membrane (voir figure 2.1). Au contraire, quand le pore est à l'envers, il n'y a pas cette structure en champignon pour guider la molécule d'ADN. Elle peut alors s'orienter de différentes manières et sélectionner des modes d'ouverture très différents [92].

## Deuxième partie

# Etudes *in vitro* de l'infection du bactériophage T5

# Présentation des travaux de la deuxième partie

Le mécanisme d'infection des bactéries par les bactériophages a fait l'objet de nombreuses recherches depuis la découverte des phages en 1915 par Frederick Twort et en 1917 par Félix d'Hérelle. Il a été montré en 1952 par Alfred Hershey et Martha Chase que lors de l'infection d'une bactérie par un phage, seul l'ADN du virus est transféré dans le cytoplasme de la bactérie. Le "fantôme" du virus, c'est-à-dire sa structure protéique sans l'ADN, reste accroché à l'extérieur de la surface de la bactérie. Historiquement, cette constatation a permis de confirmer la fonction de l'ADN en tant que support de l'information génétique.

Dans cette partie, nous étudions les étapes initiales d'infection du bactériophage T5 *in vitro*. Ce processus, *in vivo*, correspond au transfert du génome du virus à travers l'enveloppe de la bactérie hôte (figure 7.1, étapes 0 à 3). Chez certains phages, une simple interaction entre le virus et son récepteur membranaire purifié provoque une libération rapide du génome viral, "mimant" ainsi une infection. T5 éjecte ainsi spontanément son génome hors de la capside lorsqu'il rencontre sa protéine réceptrice, FhuA. Dans ce travail, c'est cette propriété qui a été mise à profit pour analyser le transfert de l'ADN viral, indépendamment d'une bactérie hôte.

Dans le chapitre 6, nous présentons un aperçu des virus et des bactériophages dans la biosphère. Cette partie met en perspective ce travail en soulignant l'abondance et la diversité extrême des phages ainsi que leur rôle majeur dans les écosystèmes. Le chapitre 7 dresse un portrait de notre système, le bactériophage T5. Nous rentrons dans le vif du sujet dans le chapitre 8 : le processus d'éjection de l'ADN de T5 *in vitro* est décrypté selon un schéma réactionnel à trois étapes présenté figure 5.1. En combinant les données sur des études de populations de phages et des observations à l'échelle de virus uniques, nous avons calculé le temps caractéristique de chacune de ces étapes.

La dernière étape du processus d'éjection *in vitro*, l'étape d'éjection de l'ADN proprement dite (revoir la figure 5.1), fait l'objet d'une attention particulière dans les chapitres 9 et 10. Les forces à l'origine de l'éjection ont été très étudiées. L'état de l'art sur ce sujet ainsi que certaines idées nouvelles sont présentées dans le chapitre 9. Le chapitre 10 décrit un travail expérimental en virus unique : afin de préciser les forces mises en jeu lors de cette étape, la dynamique de l'étape d'éjection est analysée et un modèle est proposé pour expliquer qualitativement le phénomène.

Dans les chapitres 8, 9 et 10, le système est le plus simple possible : le phage et son récepteur libre en solution sont les seuls protagonistes. Nous nous sommes efforcés, dans le

chapitre 11 de mener notre étude du processus d'éjection dans un système plus physiologique : la protéine FhuA est reconstituée dans une membrane lipidique et l'éjection a lieu à travers cette membrane. Cette dernière partie a pour objectif l'étude de facteurs physiologiques survenant lors de l'infection : influence des lipides, du potentiel membranaire, des agents condensants etc.

Enfin le chapitre 12 s'ouvre vers l'*in vivo*. La pertinence des résultats obtenus *in vitro* est discutée en fonction du contexte *in vivo*. Notamment, l'étude des forces à l'œuvre lors de l'étape d'éjection *in vitro* devrait permettre de discerner la part passive de la part active [1] du transfert du génome viral *in vivo*. Les perspectives de cette étude sont alors évoquées.

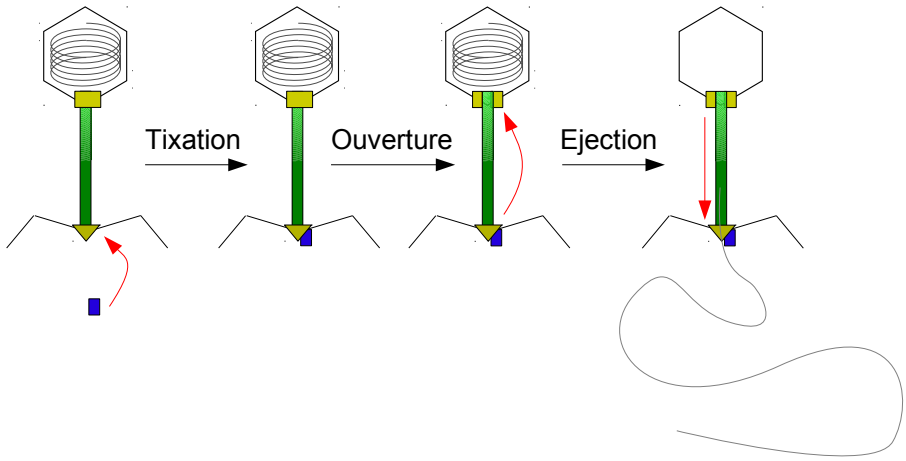



**Figure 5.1** – Les 3 étapes du processus d'éjection *in vitro*.

- 1. Fixation du phage sur son récepteur par l'intermédiaire d'une protéine située à l'extrémité distale de sa queue.
- 2. FhuA induit l'ouverture du connecteur via un changement conformationnel transmis le long de la queue du phage.
- 3. Passage de l'ADN à travers les différentes protéines de la queue du phage formant le canal de sortie.

## Vocabulaire

Je désignerai par **processus d'éjection** le processus englobant les étapes de **fixation**, d'**activation** (ou d'ouverture) et d'**éjection** proprement dite. [2]

1. C'est-à-dire nécessitant un apport d'énergie de la bactérie
2. Ne pas confondre l'étape d'éjection et le processus d'éjection, qui englobe deux étapes de plus.

# Chapitre 6

# Introduction aux bactériophages

## 6.1 La virosphère

Une particule virale est une entité biologique capable de se reproduire avec un répertoire génétique minimal.

Ces biosystèmes élémentaires possèdent certaines propriétés des systèmes vivants, comme la présence d'un génome ou la capacité de s'adapter aux changements environnementaux. Cependant ils sont dépourvus d'activité métabolique propre ; ils peuvent persister par eux-mêmes mais ont besoin d'un hôte approprié pour se développer et se multiplier.

Tous les virus sont donc des parasites intracellulaires obligés qui dépendent complètement, pour leur réplication, de la machinerie biochimique des cellules qu'ils infectent. Un virus doit impérativement introduire son génome (ADN ou ARN simple ou double brin) dans une cellule hôte afin d'en assurer l'expression : une fois le génome introduit, la cellule hôte fournit la machinerie métabolique et biosynthétique nécessaire à la formation de nouvelles particules virales complètes, les virions.

Les virus infectent des organismes dans les trois domaines du vivant (archées, bactéries et eucaryotes) et constituent l'entité biologique la plus abondante sur la planète. On estime qu'ils surpassent en nombre leurs cellules hôtes d'au moins un ou deux ordres de grandeur [8, 7].

Cette énorme « virosphère » (figure 6.1) [1] est omniprésente (du fond des océans jusqu'aux couches supérieures de l'atmosphère) et vraisemblablement responsable d'une importante pression de sélection sur les organismes cellulaires. Elle fait l'objet de questions fondamentales concernant non seulement le domaine de la virologie mais celui de la biologie en général : comment le domaine des virus est-il organisé, quelle est l'origine des virus et comment ont-ils évolué ?

1. Curtis Suttle, 2005, « Portion de la terre où les virus interagissent avec leurs hôtes » : à l'extérieur de la cellule hôte les particules virales en tant que telles ne sont pas fonctionnellement actives. Le terme virosphère fait référence à l'interaction hôte-pathogène qui confère aux virus les caractéristiques d'un système vivant.




**Figure 6.1** – Diversité de la virosphère. (source http ://www.ictvdb.org/ ; ICTVdB : The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses)

## 6.2 Les bactériophages

Les virus qui ont pour hôte les eubactéries et les archées sont appelés bactériophages ou tout simplement phages.

### 6.2.1 La découverte

Les premiers bactériophages ont été découverts en 1915 à Londres par le pathologiste britannique Frederick W. Twort qui, en travaillant avec des cultures de Micrococcus, a observé que certaines colonies prenaient parfois un aspect muqueux, pâle ou vitreux. Cet aspect vitreux pouvait être induit dans des colonies normales par simple contact avec un peu de matériel des colonies pâles. La transformation pouvait être propagée indéfiniment indiquant la présence d'un agent infectieux transmissible [124].

De façon indépendante, en 1917 Félix d'Hérelle, scientifique franco-canadien travaillant à l'Institut Pasteur, a découvert un microbe qui induisait la lyse des bactéries en culture liquide et la formation de taches claires (qu'il a appelées « taches vierges ») dans des cultures bactériennes sur agar. D' Hérelle a décrit ces microbes, il a postulé leur multiplication intracellulaire et leur parasitisme obligé et il les a nommés bactériophages [124].

Plus tard, en utilisant le dénombrement de ces taches claires (qu'on appelle aujourd'hui plages de lyse) comme moyen de titrage des phages, il a observé une augmentation de la population virale au fur et à mesure du rétablissement des patients atteints des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Ces résultats l'ont conduit à présenter les phages comme des agents bactéricides naturels et comme agents thérapeutiques potentiels [124].

La nature virale des bactériophages a été reconnue définitivement aux alentours des années 1940 après la mise au point du microscope électronique.

## 6.3 Evolution et écologie

L'hétérogénéité des structures et des propriétés biologiques et physicochimiques des virus (hôtes, contenu génétique, mécanismes de régulation, effets physiologiques...) suggèrent qu'ils sont d'origine polyphylétique[2]. Au fur et à mesure que la connaissance sur les virus augmente, il semble qu'on puisse les organiser en un nombre restreint de lignées virales constituées des membres infectant les hôtes des différents domaines du vivant. Chacune des lignées virales aurait évolué à partir d'un ancêtre commun présent sur la terre avant la divergence entre eubactéries et archées-eucaryotes, il y a 3-3,5 milliards d'années. [65, 7, 52, 8].

Sachant que les procaryotes ont précédé d'un milliard d'années l'apparition des premiers eucaryotes, on peut penser que, lors des débuts de la vie sur la terre, les interactions phage-

2. Un taxon (regroupement d'organismes possédant des caractéristiques communes) polyphylétique est un taxon défini par une ressemblance qui n'a pas été héritée d'un ancêtre commun. Ce terme désigne des taxons qui n'ont aucune pertinence pour retracer les liens de parenté et donc l'évolution. (source wikipedia)

hôte étaient les relations biologiques dominantes. Les phages, principaux agents de mortalité, étaient probablement les gardiens de la diversité biologique. Ils ont été des acteurs essentiels du recyclage de la matière organique et des nutriments par la lyse cellulaire et, de ce fait, les conducteurs des cycles énergétiques. Ces mêmes processus caractérisent encore aujourd'hui les principales interactions écologiques entre les phages et leurs hôtes [47, 125].

Les communautés de phages constituent, sans doute, le plus grand réservoir de diversité génétique sur la terre. Au moyen du transfert horizontal des gènes [3], les phages sont des vecteurs de matériel génétique et permettent l'échange d'ADN entre différentes souches bactériennes. Ils ont donc un impact majeur sur l'évolution des génomes bactériens.

## 6.4 Classification, morphologie et structure

Avec une estimation de $10^{31}$ « individus » dans la biosphère [14, 114, 65] et au moins plusieurs milliers de types répertoriés [4], les phages constituent un groupe extrêmement diversifié et le plus nombreux de tous les virus (figure 6.2). Pas moins de 100 nouveaux phages par an ont été décrits ces dernières décennies et de nouveaux phages sont continuellement répertoriés et classés selon leur morphologie et leur type de génome par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

Les bactériophages décrits jusqu'à présent infectent plus de 140 genres bactériens très divers comprenant des procaryotes aérobies ou anaérobies, des cyanobactéries, des mycoplasmes, des chlamydias, des bactéries bourgeonnantes ou ramifiées, des halophiles et méthanogènes extrêmes et même des archées qui se développent à très hautes températures (100°C) [65].

### 6.4.1 Les *Caudovirales*

96% des phages actuellement répertoriés, soit environ 5000 virus, sont des phages caudés (du latin cauda : queue) à ADN linéaire double brin et ont pour hôtes des eubactéries ou des archées. Ils constituent l'ordre des *Caudovirales* [4], dont fait partie le phage T5. Les *Caudovirales* ont une organisation tête-queue caractéristique, unique dans le monde des virus (voir pour un exemple la figure 7.2). Leur tête, à symétrie icosaédrique, peut être isométrique ou allongée (prolate), mais les formes isométriques sont prédominantes (dans 85% des familles). La capside, structure protéique de la tête qui enferme et protège le matériel génétique, n'a pas d'enveloppe lipidique : les caudovirales sont des « virus nus ». La taille de cette capside varie entre 50 et 100 nm selon les phages et chaque capside est constituée de sous-unités protéiques, identiques ou différentes, qui se regroupent par 5 ou 6, pour former des ensembles structurels identiques, les capsomères.

Les *Caudovirales* sont extrêmement variés dans leur contenu et composition d'ADN. La composition (A, T, G, C) de leur ADN ressemble généralement à celle de leur hôte ; cependant, certains phages (T4, par exemple) possèdent des bases modifiées telles que la 5-

3. Le transfert horizontal de gènes, est un processus dans lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant. Par opposition, le transfert vertical se produit lorsque l'organisme reçoit du matériel génétique à partir de son ancêtre. (source wikipedia)

| Forme | Type de génome | Famille | Caractéristiques | Exemples | Morphologie |
|---|---|---|---|---|---|
| Caudal | ADN double brin linéaire | *Myoviridae* | Queue contractile | T4, P1, P2, Mu, ΦH, | |
| | | *Siphoviridae* | Queue longue non contractile | λ, T1, T5, L5, ΨM1 | |
| | | *Podoviridae* | Queue courte | T7, P22, φ29 | |
| Polyèdres | ADN simple brin circulaire | *Microviridae* | Capsomères visibles | φX174 | |
| | ADN double brin circulaire super enroulé | *Corticoviridae* | Capside complexe, lipides | PM2 | |
| | ADN double brin linéaire | *Tectiviridae* | Vésicule lipidique interne, pseudo queue | PRD1 | |
| | ADN double brin linéaire | *SH1 group* (*) | Vésicule lipidique interne | SH1 | |
| | ADN double brin circulaire | *STV1 group* (*) | Protrusions en forme de tourelles | STIV | |
| | ARN simple brin linéaire | *Leviviridae* | Virus type polio | MS2 | |
| | ARN double brin linéaire segmenté | *Cystoviridae* | Enveloppe lipidique | φ6 | |
| Filamenteux | ADN simple brin circulaire | *Inoviridae* | Filaments longs | fd | |
| | | | Tiges courtes | MV/L1 | |
| | ADN double brin linéaire | *Lipothrixviridae* | Enveloppe, lipides | TTV1 | |
| | ADN double brin linéaire | *Rudiviridae* | Type TMV | SIRV-1 | |
| Pléomorphes | ADN double brin circulaire super enroulé | *Plasmaviridae* | Enveloppe, lipides, pas de capside | L2 | |
| | ADN double brin circulaire super enroulé | *Fuselloviridae* | Enveloppe, lipides, pas de capside, forme de citron | SSV1 | |
| | ADN double brin linéaire super enroulé | *Salterprovirus* | Enveloppe, lipides, pas de capside, forme de citron | His1 | |
| | ADN double brin circulaire super enroulé | *Guttaviridae* | Forme de goute | SNDV | |
| | ADN double brin linéaire | *Ampullaviridae* (*) | Forme de bouteille | ABV | |
| | ADN double brin circulaire | *Bicaudaviridae* (*) | Deux queues, cycle de croissance | ATV | |
| | ADN double brin linéaire | *Globuloviridae* (*) | Type paramyxovirus | PSV | |

*Caudovirales*

**Figure 6.2** – Classification, propriétés et morphotypes de bactériophages. (Adapté de [4]). Sont présentés quelques exemples de *Caudovirales* infectant entérobactéries (rouge), archées (bleu), bacillus (orange), mycobactérium (prune)

hydroxymethylcytosine, ce qui permet à leur ADN de résister aux enzymes de restriction de l'hôte [3]. L'acide nucléique se présente comme une molécule unique d'une longueur qui varie entre 18 kb et plus de 500 kb selon les phages [3, 16]. La molécule d'ADN, dont la longueur est souvent considérable par rapport à la dimension des têtes, est stockée de manière très condensée à l'intérieur des capsides. Ce point fera l'objet d'une étude approfondie dans cette thèse. Les gènes sont regroupés dans des clusters successifs exprimés de manière séquentielle : les gènes précoces, intermédiaires et tardifs. Les gènes précoces codent en général pour les protéines virales impliquées dans la régulation de l'injection du génome viral, dans la dégradation du génome de l'hôte et dans le contrôle de la transcription des gènes viraux. Les gènes intermédiaires interviennent dans la réplication du génome viral et les gènes tardifs correspondent aux gènes de structure et d'assemblage des nouveaux virions [2, 3].

Tous les *Caudovirales* possèdent une queue attachée à un des sommets de la capside icosaédrique. Cette queue est responsable de la liaison du phage à la cellule hôte et de l'éjection de l'ADN dans la bactérie. Selon les phages elle peut être très différente : sa longueur peut varier entre 10 et 800 nm [2], elle peut être contractile ou non, rigide ou flexible. Dans tous les cas décrits, elle présente une symétrie hélicoïdale d'ordre 3 ou 6 [15].

La queue porte, dans la plupart des cas, des structures de fixation terminales qui participent à la reconnaissance de l'hôte, telles que des plaques basales, des fibres, des pointes et/ou des appendices [3]. La queue est séparée de la tête par un assemblage appelé connecteur.

### 6.4.2 Les familles

L'ordre des bactériophages caudés, *Caudovirales*, est divisé en trois familles : Myoviridae, Siphoviridae et Podoviridae 6.2.

- Les *Myoviridae*, qui représentent 25% des phages caudés, ont une structure très complexe aussi bien au niveau de la capside que de la queue. Parmi les virus les mieux identifiés de cette famille on trouve T4 (*Enterobacteria phage T4*) et Mu (*Enterobacteria phage Mu*).
- Les *Podoviridae* ont une queue courte, droite et non contractile. Leur génome est en général de petite taille. Les bactériophages T7 (*Enterobacteria phage T7*), P22 (*Enterobacteria phage P22*) et phi29 (*Enterobacteria phage phi29*) sont quelques exemples de virus classés dans cette famille.
- Mais la plupart des phages caudés, 61%, appartiennent à la famille des *Siphoviridae* et ont une queue longue, flexible et non contractile. Sont classés au sein de cette famille, les phages T1 (*Enterobacteria phage T1*), lambda (*Enterobacteria phage lambda*), SPP1, HK97 (*Enterobacteria phage HK97*) et T5 (*Enterobacteria phage T5*).

### 6.4.3 Généralités du cycle viral des *Caudovirales* (voir figure 7.1 pour le cycle de T5)

Les phages ont développé différentes stratégies pour infecter la cellule hôte et s'approprier la machinerie cellulaire afin de fabriquer les composants nécessaires à la morphogenèse des virions. Cependant, certaines caractéristiques sont communes à tous les phages. Le cycle commence par une phase de recherche extracellulaire diffusion-dépendante : la rencontre d'un phage

et d'une bactérie se fait au hasard et sa probabilité dépend de la concentration de chacun d'entre eux dans le milieu ainsi que de leur vitesse de diffusion [65]. Mais pour que l'infection virale ait lieu sur l'hôte approprié, c'est-à-dire sur celui qui conduira à la production d'une progéniture, des anti récepteurs du phage doivent se fixer sur des récepteurs localisés à la surface de la cellule hôte, et ceci doit se produire avec une étroite spécificité. [21]. C'est ce qu'on appelle l'adsorption. Si la bactérie manque des récepteurs adéquats, elle résiste à l'infection. Une bactérie n'est donc sensible qu'à un nombre limité de phages et un phage n'est capable d'infecter qu'un nombre restreint d'espèces bactériennes.

Chez les phages caudés, les molécules qui participent à la reconnaissance du récepteur de la cellule hôte sont placées sur les fibres localisées à l'extrémité distale de leur queue. Certains phages utilisent une fibre unique et centrale, d'autres, assurent la spécificité avec des groupements de plusieurs fibres latérales. L'adsorption peut se produire en plusieurs étapes. Chez les coliphages[4] T1, T4 ou T5, par exemple, il y a une première liaison non spécifique et réversible des fibres latérales sur la surface bactérienne qui permet le positionnement correct du virion sur la surface, suivie de la liaison irréversible d'une autre protéine de queue à un récepteur secondaire [21, 65].

Les récepteurs potentiels de l'hôte sont très différents selon qu'il s'agisse des bactéries à Gram négatif ou des bactéries à Gram positif. Pour les premières les récepteurs sont des composants des lipopolysaccharides (LPS) et des protéines de la membrane externe (telles que les porines ou les protéines de transport). Pour les secondes, ce sont des éléments du peptidoglycane ou protéines associées [65].

L'interaction du phage avec le récepteur cellulaire induit une série d'événements irréversibles, assez méconnus, qui conduisent à l'éjection du matériel génétique hors de la capside et à son transfert à travers l'enveloppe bactérienne jusqu'au cytoplasme [102]. A la différence des particules virales eucaryotes qui, pour la plupart, pénètrent entièrement dans leur hôte par endocytose ou par fusion (pour les virus entourés d'une membrane), il est important de remarquer que chez les bactériophages, seul le génome viral est injecté dans le cytoplasme bactérien et que la particule virale vide reste attachée à la surface cellulaire. Le transfert du génome est un processus remarquable, compte tenu des barrières à franchir et de la longueur de la molécule d'ADN.

Après l'injection du matériel génétique, deux situations sont possibles :
- La transcription, la traduction puis la réplication du génome du phage virulent conduisent à la production rapide de nombreuses particules virales à l'intérieur de la cellule bactérienne. Le cycle, qualifié de productif ou lytique, mène à la lyse cellulaire et à la libération des virions dans le milieu environnant ;
- L'acide nucléique se maintient dans la bactérie à l'état latent, ou de "prophage", puis est répliqué avec le génome bactérien lors de la multiplication cellulaire. Dans ce cas, le génome du phage persiste dans son hôte sous forme de plasmide ou s'intègre par recombinaison site-spécifique dans le génome bactérien. Les gènes lytiques sont à l'état silencieux, réprimés. Le cycle est qualifié de lysogénique et le bactériophage est appelé phage tempéré.

Les phages caudés peuvent être lytiques (virulents) ou tempérés. Les phages lytiques présentent exclusivement des cycles productifs. Les phages tempérés peuvent rentrer en cy-

4. Se dit d'un bactériophage dont l'hôte est la bactérie *Escherichia coli*.

cle lytique à une fréquence qui dépend de la physiologie de l'hôte et de la multiplicité[5] de l'infection.

L'infection de la bactérie par un phage virulent change profondément la physiologie cellulaire : elle conduit à une réorganisation de l'activité métabolique et au détournement de la machinerie cellulaire au seul profit de la synthèse virale. Les premières étapes de la multiplication du phage, notamment la synthèse de protéines virales spécifiques, se mettent en place. Ces protéines précoces vont gouverner la réplication de l'ADN du phage et, simultanément, la synthèse des protéines structurales de capside et de queue. D'autres protéines, non structurales, seront produites et participeront à l'assemblage intracellulaire du virion infectieux responsable d'assurer la survie et la transmission extracellulaire. Les protéines de la phase tardive vont conduire à la lyse cellulaire et à la libération de la progéniture virale indispensable au démarrage d'un nouveau cycle d'infection.

5. Multiplicité : nombre de phages par bactérie infectée.

# Chapitre 7

# Présentation du bactériophage T5

## 7.1 Un coliphage lytique (figure 7.1)

Le bactériophage T5 est un virus bactérien lytique ayant pour hôte la bactérie *Escherichia Coli*. Son cycle de vie peut être brièvement résumé de la manière suivante : le virus s'attache réversiblement sur le LPS par l'intermédiaire de ses trois fibres en L puis irréversiblement via une protéine de queue distale (pb5) se qui fixe spécifiquement sur une protéine de la membrane externe (FhuA). Suite à cette fixation, des changements conformationnels de la queue du phage se produisent et le "clapet" moléculaire (connecteur), reliant l'un des sommets de la capside à la queue du phage s'ouvre. L'ADN libéré est transporté linéairement, paire de bases après paire de bases à travers la queue du phage et des membranes de l'hôte, jusqu'au cytoplasme. Une protéine de l'extrémité distale de la queue du phage (pb2) fait fonction de pore et assure le passage à travers les membranes [11]. Ce transfert s'effectue en deux temps (voir section 7.5.2). Le programme génétique du virus est exprimé : il détourne le métabolisme de la bactérie afin de produire de nouvelles particules virales. Enfin, la paroi de la bactérie est lysée et les nouvelles particules virales sont libérées dans le milieu extérieur.

## 7.2 Structure (figure 7.2)

T5 est un bactériophage caudé (à queue) appartenant à la famille des Siphoviridae. L'appartenance à cette famille se fonde essentiellement sur des propriétés structurales. Ainsi un Siphoviridae est constitué d'une capside icosaédrale protéique prolongée par une longue queue protéique flexible, mais non contractile[1]. Le génome du virus est stocké sous forme d'ADN double brin, hautement compacté dans la capside. Pour plus de détails sur la structure de T5, voir [31] et l'annexe A.

1. Il n'y a pas de contraction majeure de la queue suite à la fixation du phage sur la bactérie hôte.

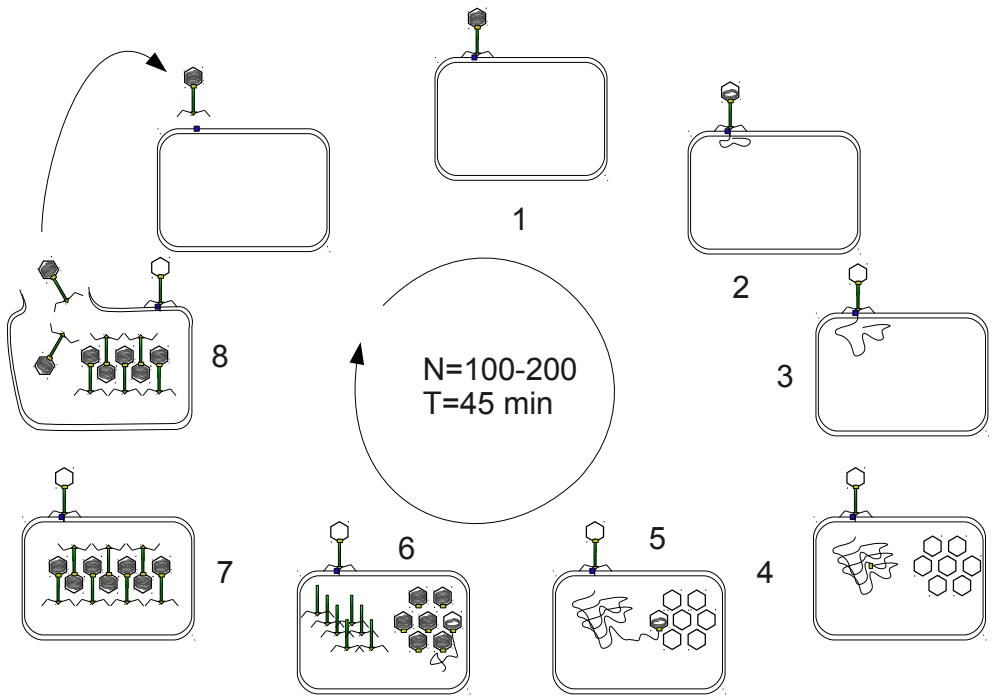



**Figure 7.1** – Cycle de vie du bactériophage lytique T5. Le phage et la bactérie sont quasiment à l'échelle. Le génome de T5 est par contre beaucoup plus petit que sa taille réelle. Une bactérie infectée libère en moyenne de 100 à 200 nouvelles particules infectieuses en 45 minutes [98]. 1. Adsorption spécifique de T5 sur la protéine de la membrane externe d'*E. Coli* FhuA. 2. First-Step Transfer ou "FST" : 8% de l'ADN de T5 est injecté dans la bactérie. Les protéines A1 et A2 de T5 codées sur l'ADN FST sont synthétisées. Le génome d'*E. coli* est dégradé (chromosome non représenté). 3. Second-Step Transfer ou "SST" : le reste du génome de T5 est internalisé dans la bactérie. 4. L'ADN de T5 est répliqué sous forme de concatémères, les protéines structurales des nouveaux virions sont synthétisées. 5. Encapsidation : Les capsides vides matures sont remplies avec l'ADN de T5 via le moteur moléculaire de la protéine portale. 6. Les queues sont synthétisées indépendamment des capsides. 7. Les queues sont assemblées sur les capsides pleines pour former des virions matures. 8. Synthèse d'enzymes dégradant la paroi bactérienne. La paroi finit par céder, libérant ainsi les nouvelles particules virales.

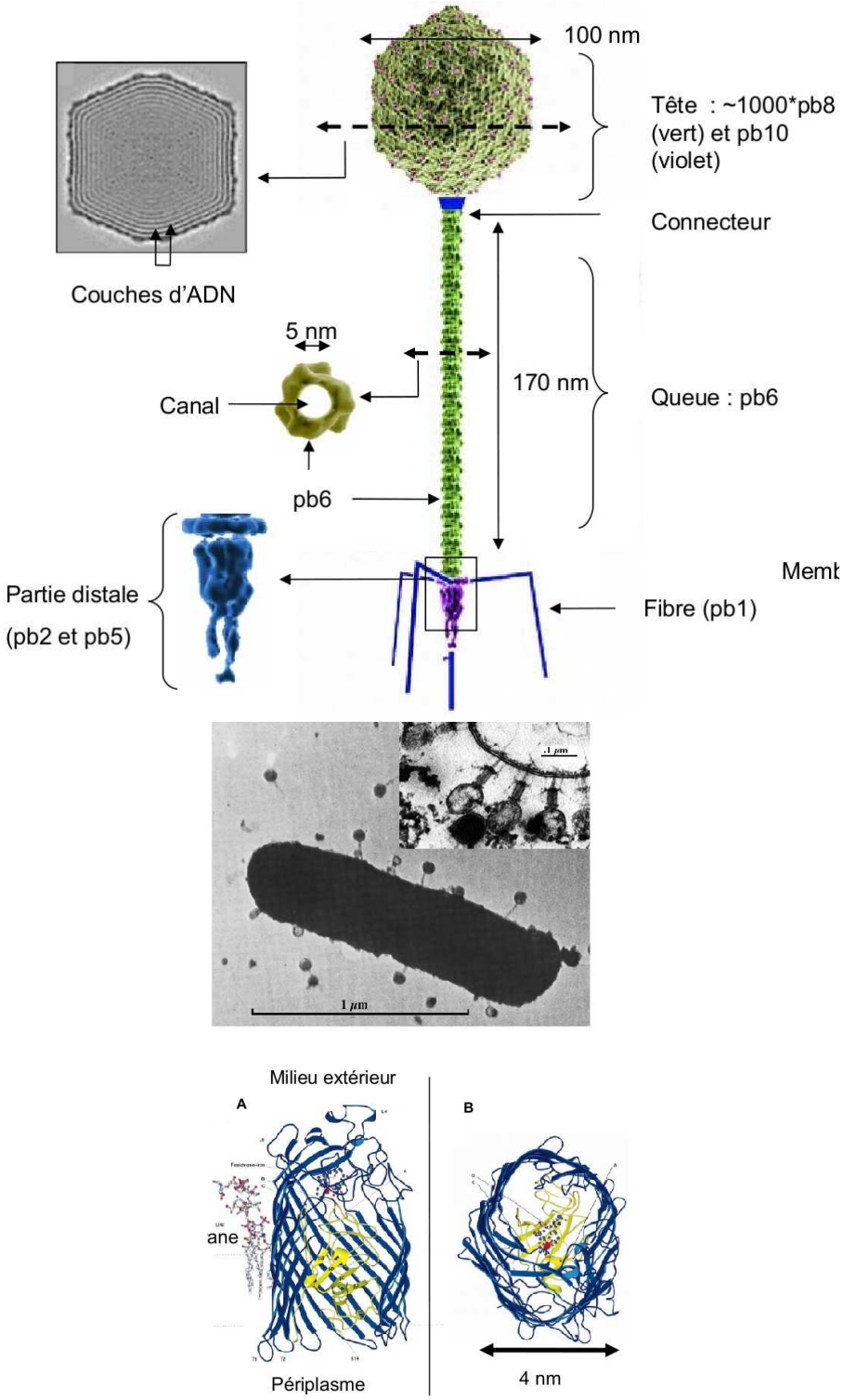



**Figure 7.2** – Structure de T5 et de sa protéine réceptrice FhuA (D'après Effantin [31] et Ferguson [38]). La structure du bactériophage T5 reconstituée par cryomicroscopie électronique est représentée en haut. Certaines de ses protéines structurales sont précisées. L'encart grisé représente une vue moyennée des couches d'ADNs visibles à l'intérieur de la capside. FhuA, le récepteur de T5, est une protéine de la membrane externe d'*Escherichia coli*. Sa structure est constituée d'un tonneau de feuillets $\beta$ antiparallèles, présentant de larges boucles du coté du milieu extérieur et de petites boucles périplasmiques. La partie N terminale de FhuA forme un "bouchon" obstruant ce tonneau.

## 7.3 Génome

Le génome de la souche sauvage de T5 a été entièrement séquencé [131].

### 7.3.1 Souches de T5

Nous avons utilisé plusieurs souches de T5 possédant des longueurs de génome variables et ayant des propriétés particulières. La souche sauvage (AY587007, 121752 pb) possède le génome le plus long. Nous n'utiliserons pas cette souche dans cette étude car nous lui préférons un mutant thermostable, T5st(0). Le mutant thermostable est plus robuste et plus facile à manipuler. Son génome est aussi plus court (114 kpb). Le génome de T5st(0) est connu (AY692264, 113238 pb) ; il a une délétion par rapport à la souche sauvage située entre 33.6 kb et 41.8 kb. Nous possédons un autre mutant, appelé T5amHA911, qui est un mutant conditionnel nickless (i.e. dont l'ADN ne présente pas de cassures simple brin) dérivé de la souche sauvage. Les propriétés de cette souche sont expliquées dans la partie 7.5.1. Le génome de T5amHA911 n'a pas été entièrement séquencé.

## 7.4 FhuA, protéine de la membrane externe d'*E. coli*, récepteur de T5

FhuA est une protéine de la membrane externe d'E. Coli. C'est une protéine membranaire en tonneau $\beta$ bouché par la partie N-terminale de la protéine. De longues boucles dépassent de la membrane du côté du milieu extérieur qui sont essentielles à la fixation du phage sur FhuA.

### 7.4.1 Fonction de FhuA chez *E. coli*

FhuA est un transporteur à haute affinité d'une petite molécule appelée ferrichrome. Le fer est indispensable au métabolisme de la bactérie, or, de manière générale, très peu de fer ferrique est disponible sous forme soluble dans le milieu extérieur. Pour subvenir à ses besoins, la bactérie sécrète un sidérophore, le ferrichrome, qui est un chélateur des ions ferriques $Fe^{3+}$. FhuA est un transporteur spécifique de haute affinité du ferrichrome. L'import actif et hautement spécifique du complexe ferrichrome-fer via FhuA permet donc à la bactérie de capturer le fer du milieu [49].

### 7.4.2 FhuA, récepteur du bactériophage T5

En plus de cette fonction physiologique, FhuA est la molécule réceptrice sur laquelle se fixe le bactériophage T5 *in vivo*[48, 50] La fixation de T5 sur FhuA a aussi été observée *in vitro*, avec la protéine FhuA purifiée, soit solubilisée en détergent [89, 13], soit reconstituée en

protéoliposome [100, 67, 66, 11]. Au niveau moléculaire, la protéine de queue distale pb2 de T5 est la protéine qui se fixe de manière irréversible à FhuA *in vivo* et *in vitro* [101].

Notons que FhuA n'est pas un canal. Inséré dans une bicouche lipidique, FhuA ne crée pas de courant électrophysiologique détectable, conformément à sa structure moléculaire en tonneau $\beta$ bouché. Néanmoins, un pore de haute conductance se forme si T5 est ajouté sur une membrane lipidique contenant FhuA [12, 127]. [2] L'ADN passe certainement à travers ce pore nouvellement créé, mais nous ne savons pas si le pore à ADN est la molécule de FhuA qui aurait subi un changement conformationnel, ou si T5 se sert uniquement de FhuA comme point d'ancrage, et utilise ses propres protéines pour traverser la membrane. A ce jour la deuxième hypothèse est la plus probable et pb2 (cf figure 7.2) est le meilleur candidat pour la formation d'un tel pore [11].

## 7.5 Particularités de T5

### 7.5.1 Des nicks codés génétiquement le long du génome.

L'ADN de T5 est parsemé de quelques coupures simples brins (c'est-à-dire qu'une des deux chaînes phosphatées de la double hélice d'ADN est clivée) à des positions clairement définies dans le génome. Ces interruptions simples brins sont appelées nicks. Ces nicks sont le résultat de l'action d'une enzyme codée sur le génome de T5. Il a été postulé que ces nicks aient un rôle pendant le processus d'éjection [83]. Pour étudier ce rôle, nous disposons d'une souche de T5, T5amHA911, qui est une souche mutée sur la nickase. [3] La nickase est la protéine responsable de la formation des nicks sur le génome de T5.

### 7.5.2 *In vivo*, un transfert de l'ADN pendant l'infection en deux étapes

Une autre particularité de T5 est le transfert de l'ADN en deux étapes *in vivo* [69, 70, 73, 71, 72, 120, 53, 77]. Durant une première étape, appelée FST pour "first step transfer", 8% du génome de T5 est transféré dans la bactérie. Ce transfert est passif car il ne dépend pas de l'énergie de la cellule. Une activité de synthèse protéique est décelée pendant cette étape. Les protéines A1 et A2 situées dans cette partie du génome sont notamment exprimées et sont nécessaires pour initier le "second step transfer", ou SST, à savoir la deuxième étape où les 92% du génome restant sont transférés dans la bactérie.

2. Bien sûr, T5 seul n'induit pas de pore.

3. Cette souche est particulière car la mutation est conditionnelle : selon la souche bactérienne utilisée pour reproduire les virus, la mutation s'exprimera ou non, c'est-à-dire que les particules virales auront ou non des nicks.

## 7.6 Informations supplémentaires

Des informations plus détaillées sur T5 (protéines structurales, position des nicks...) sont données dans l'annexe A.

# Chapitre 8

# Cinétique globale de l'éjection de l'ADN d'une population de phages.

Le mécanisme d'infection de plusieurs bactériophages, dont T5, a été étudié en détail du point de vue moléculaire. Chez T5, la reconnaissance de la bactérie hôte par le virus s'effectue grâce à une interaction spécifique entre une protéine du bout de la queue du bactériophage (pb5 pour T5) et une protéine de la membrane externe (FhuA pour T5). Cette interaction assure une spécificité de l'hôte [78] et, pour certains phages, elle suffit à initier le transfert de l'ADN dans le cytoplasme de la bactérie.

Les étapes initiales d'infection du bactériophage T5 ont ainsi pu être étudiées dans un système *in vitro* constitué uniquement des deux éléments strictement nécessaires : le bactériophage T5 et sa protéine réceptrice : FhuA. Ce système phage-récepteur est bien étudié depuis une quinzaine d'années, et il existe nombre d'études fonctionnelles et structurales sur ces deux éléments.

Dans ce système *in vitro*, le processus d'éjection peut se décomposer en une séquence de trois étapes (cf figure 5.1) : fixation du phage sur son récepteur, activation (ouverture du "canal" à ADN), éjection de l'ADN. Nous allons dans un premier temps caractériser la cinétique d'éjection de l'ADN de T5 à l'échelle d'une population de phages. Cette approche nous permettra d'étudier la cinétique de fixation de T5 sur son récepteur et de mettre en évidence, après l'étape de fixation du phage sur FhuA, l'existence d'une étape cinétiquement limitante dans le processus d'éjection.

## 8.1 Principe de la mesure

L'équipe de Lucienne Letellier (IBBMC, UMR 8619 CNRS-Université Paris-Sud 11, équipe de Virologie Bactérienne) nous a fourni les phages T5 ainsi que la protéine membranaire FhuA, tous deux purifiés et disponibles en grande quantité. Une expérience de cinétique globale consiste à mélanger ces deux constituants en solution puis à suivre la quantité d'ADN éjecté au cours du temps. Je présente succinctement deux techniques pour mesurer la quantité d'ADN

éjecté :

- Une première technique consiste à suivre la quantité de lumière diffusée par la solution de phages. Cette technique repose sur la constatation suivante : les phages diffusent fortement la lumière, car leur capside remplie d'ADN est très dense [1]. Les phages déplétés de tout ou partie de leur ADN diffusent, eux, beaucoup moins fortement la lumière. L'éjection des ADN se traduira ainsi par une diminution de la quantité de lumière diffusée. Cette méthode élégante, qui ne nécessite aucun ajout de marqueur dans la solution, a été utilisée dans de nombreuses études [24, 25, 82, 108].
- La deuxième technique consiste à suivre la quantité d'ADN éjecté par fluorescence. Nous ajoutons dans le mélange réactionnel des molécules fluorescentes qui se fixent spécifiquement sur l'ADN. Cette fixation exalte la fluorescence du marqueur, qui peut être jusqu'à 3000 fois supérieure sous sa forme liée que sous sa forme libre [2]. L'augmentation de fluorescence qui en résulte est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Enfin, il faut s'assurer que seul l'ADN éjecté soit marqué et non l'ADN restant dans les capsides. Diverses molécules ont été testées selon ce critère (voir protocole partie 15.2), et la molécule choisie, le Sybr Green I, est celle qui présente le meilleur rapport de marquage de l'ADN éjecté par rapport à l'ADN intracapside. Une fois les artefacts potentiels bien identifiés, cette méthode est facile, rapide à mettre en œuvre et complémentaire de la technique de diffusion de la lumière.

## 8.2 Conditions expérimentales

La cinétique d'éjection est mesurée à 37°C, sur une population d'environ $10^8$ phages à une concentration d'1pM. Les concentrations de FhuA varient de $2\mu M$ à 300pM. Il existe nombre d'artefacts dont il faut s'affranchir. Le protocole détaillé est présenté section 15.2.

## 8.3 Résultats

### 8.3.1 Cinétique typique

Le résultat d'une expérience typique d'éjection est représenté figure 8.1. L'éjection commence dès l'ajout du récepteur du bactériophage. A partir de ce moment, environ 30 minutes à 37 degrés sont nécessaires afin d'obtenir un plateau de fluorescence, signifiant que tous les phages "actifs" ont éjecté leur ADN. Les cinétiques sont normalisées par rapport à la quantité totale d'ADN éjecté 2 heures après le début de l'expérience, ce qui exclut de l'analyse les phages "inactifs" qui seront ignorés dans l'analyse qui suit. [3]

1. Les solutions concentrées de phages ($10^{13}$ particules par ml) sont d'ailleurs troubles, d'un blanc laiteux.
2. Voir le manuel de Molecular Probes sur invitrogen.com.
3. Pour l'expérience contrôle présentée figure 8.2, la normalisation est effectuée a posteriori : à la fin des 2 heures d'acquisition, FhuA est ajouté pour faire éjecter les phages. La courbe est alors normalisée par rapport à la fluorescence finale obtenue.

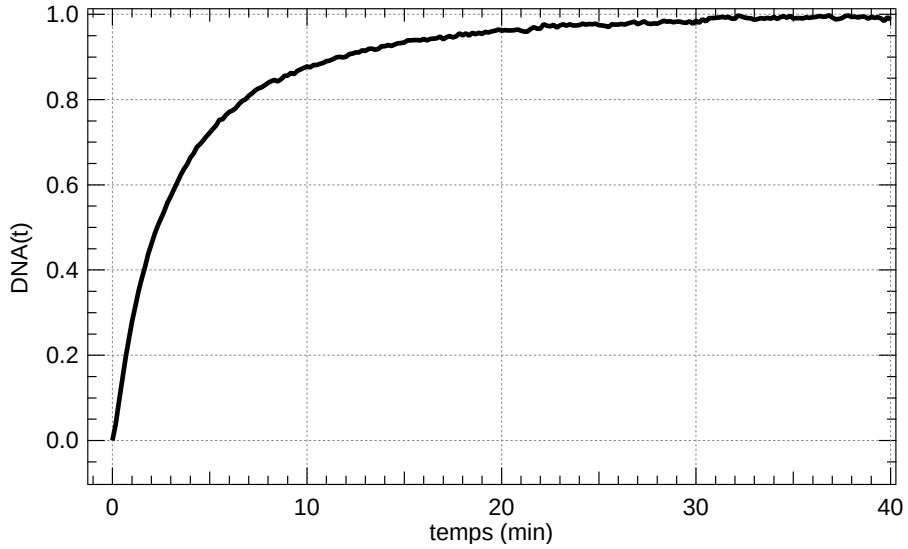



**Figure 8.1** – Cinétique d'éjection de l'ADN d'une population de phages T5 suivie par fluorimétrie après ajout de la molécule réceptrice FhuA à t=0. La concentration en FhuA est de 10nM et la température de 37°C. La quantité d'ADN éjecté est normalisée vis à vis de la fluorescence totale mesurée 2 heures après le début de l'éjection (i.e. lorsque le signal de fluorescence atteint un plateau).

### 8.3.2 Dépendance de la cinétique en fonction de la concentration en récepteur

En faisant varier la concentration de FhuA entre chaque expérience, nous pouvons modifier et étudier la cinétique de fixation du phage sur son récepteur en solution. Le processus d'éjection est constitué de trois étapes successives (fixation, activation, éjection). En utilisant une gamme de concentrations en FhuA suffisamment large, la cinétique globale sera, tour à tour, dominée par l'étape de fixation puis par une des deux autres étapes. Ainsi l'étude de la cinétique en fonction de [FhuA] nous permet d'extraire des informations sur la fixation de FhuA par T5.

Les cinétiques d'éjection ont été réalisées pour une gamme de concentrations en FhuA s'échelonnant de 300pM à 2$\mu$M. Les résultats sont résumés sur la figure 8.2. Cette gamme de concentrations permet de distinguer les deux régimes attendus, le seuil entre ces deux régimes se situant autour de [FhuA]=10nM.

- A faible concentration en FhuA, c'est-à-dire pour [FhuA]«10nM, la vitesse de réaction diminue lorsque [FhuA] diminue. C'est l'étape de fixation du phage sur son récepteur qui est cinétiquement déterminante.
- A forte concentration en FhuA, la cinétique tend vers une limite qui ne dépend pas de la concentration en récepteur, puisque l'on observe les mêmes courbes que ce soit pour [FhuA]=10nM, 80nM ou 2$\mu$M. Le temps de fixation de FhuA sur le phage est négligeable devant une autre étape du processus d'éjection, qui est soit l'étape d'ouverture du canal soit l'étape de translocation de l'ADN. Nous ne pouvons pas déduire laquelle de ces étapes est limitante à partir de ces données.

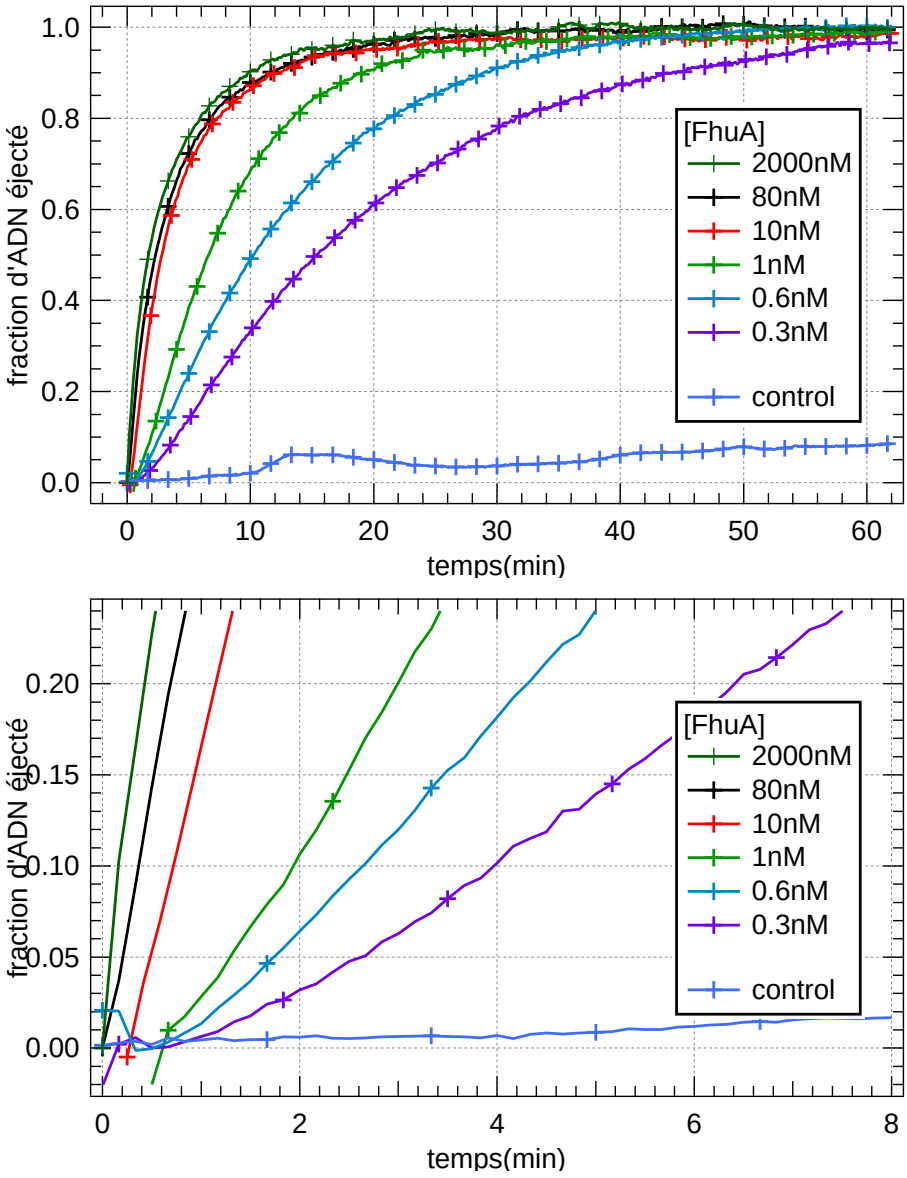



**Figure 8.2** – Cinétique du processus d'éjection de l'ADN d'une population de phages T5 St(0) pour différentes valeurs de [FhuA]. La cinétique est suivie par fluorimétrie à 37°C avec le marqueur d'ADN fluorescent SYBR Green I (1x). A t=0, l'éjection débute suite à l'ajout de FhuA dans la solution, sauf pour le témoin négatif, la courbe bleue, où FhuA est absent. La proportion d'ADN éjecté est calculée en faisant le rapport de la fluorescence mesurée sur la fluorescence finale, après soustraction d'une ligne de base correspondant à la fluorescence de FhuA et de quelques ADNs libres présents dans la préparation de phages avant l'ajout de FhuA. Six concentrations croissantes de FhuA sont utilisées : $0.3nM$, $0.6nM$, $1nM$, $10nM$, $80nM$ et $2\mu M$. A faible concentration, la cinétique est lente, dominée par l'étape de fixation du phage sur son récepteur tandis qu'à forte concentration la cinétique tend vers une courbe limite : les cinétiques à [FhuA]=10nM et [FhuA]=2000nM peuvent difficilement être distinguées malgré une augmentation de concentration en FhuA d'un facteur 200.

## 8.4 Schéma réactionnel du processus d'éjection

Afin de valider notre modèle en trois étapes, nous avons essayé d'ajuster les cinétiques sur un schéma réactionnel reproduisant les trois étapes de l'éjection.

$$\phi + FhuA \overset{\overbrace{\quad}^{fixation}}{\xrightarrow{k_b}} \phi FhuA \overset{\overbrace{\quad}^{activation}}{\xrightarrow{k_{op}}} \phi FhuA^* \overset{\overbrace{\quad}^{éjection}}{\xrightarrow{k_e}} \phi FhuA_e + DNA$$

Précisons les notations de ce schéma réactionnel :
- $DNA(t)$ est la quantité totale d'ADN éjecté, il s'agit de la quantité mesurée dans les expériences de fluorimétrie
- $\phi FhuA$ représente le complexe phage-récepteur
- $\phi FhuA^*$ représente le même complexe "activé", c'est-à-dire ayant sa protéine portale ouverte pour laisser passer l'ADN
- $\phi FhuA_e$ est le fantôme du phage, c'est-à-dire sa structure protéique sans ADN
- $k_b$ est la constante cinétique de fixation de FhuA
- $k_{op}$ est la constante réactionnelle d'activation du complexe phage-FhuA
- $k_e$ est une constante cinétique traduisant l'étape de translocation de l'ADN

$k_b$, $k_{op}$ et $k_e$ sont les constantes réactionnelles respectives des trois étapes de l'éjection. On suppose dans ce modèle que toutes les étapes sont irréversibles et que le phage ne se fixe que sur une molécule de FhuA [4].

### 8.4.1 Simplifications et solution analytique du schéma réactionnel

L'expression analytique de $DNA(t)$ correspond à une réaction en trois étapes. Il y a trois paramètres d'ajustement : $k_b$, $k_{op}$ et $k_e$, qui sont les constantes cinétiques de chacune de ces étapes. On note que la concentration de FhuA est connue dans les expériences. C'est un paramètre de contrôle. Afin de réduire le nombre de paramètres pour ajuster de manière pertinente nos expériences, nous avons effectué deux simplifications :
- La molécule de FhuA est toujours présente en large excès, puisque qu'au minimum, il y a 300 fois plus de molécules de FhuA que de phages [5]. On peut donc négliger la quantité de FhuA consommée lors de la réaction devant sa concentration initiale : $[FhuA](t) \approx [FhuA](0) = [FhuA]$ pour tout $t$. Pour une expérience réalisée à [FhuA] donné, la probabilité de rencontre entre le phage et FhuA reste constante et cette première étape peut être vue comme une étape monomoléculaire de constante cinétique $k_b[FhuA]$ [6] :
$$\phi \xrightarrow{k_b[FhuA]} \phi FhuA \xrightarrow{k_{op}} \phi FhuA^* \xrightarrow{k_e} \phi FhuA_e + DNA$$
- Il est impossible d'avoir une information sur la cinétique de formation de l'intermédiaire réactionnel $\phi FhuA^*$ en ne mesurant que $DNA(t)$. Par souci de simplicité, et en utilisant

4. A ce jour, c'est l'hypothèse la plus probable : T5 fixe FhuA par l'intermédiaire de sa protéine de queue pb5, (1 pb5 par phage) et pb5 se fixe dans un rapport 1 :1 à FhuA *in vitro* (Plancon et coll. [101].)

5. C'est le cas lorsque [$\phi$]=1pM et [FhuA]=300pM.

6. C'est la valeur de la concentration en FhuA qui importe dans la cinétique, et non le rapport entre le nombre de phages et le nombre de molécules de FhuA en solution.

un résultat qui sera justifié a posteriori, nous allons supposer que l'une de ces deux étapes est très rapide. Nous regroupons alors les deux dernières étapes en une seule étape de constante $k_{out}$. Suivant que l'étape limitante soit l'étape d'activation ou de translocation nous aurons respectivement $k_{out} = k_{op}$ ou $k_{out} = k_e$.

$$\phi \xrightarrow{k_b[FhuA]} \phi FhuA \xrightarrow{k_{out}} \phi FhuA_e + DNA$$

En utilisant de plus le fait que nous avons normalisé nos courbes, ( $\lim_{t\to\infty} DNA(t) = 1$ ), nous trouvons l'expression suivante pour $DNA(t)$ :

$$DNA(t) = 1 - \frac{k_{out}}{k_{out} - k_b[FhuA]} e^{-k_b[FhuA]t} - \frac{k_b[FhuA]}{k_b[FhuA] - k_{out}} e^{-k_{out}t} \tag{8.1}$$

Cette expression a deux paramètres d'ajustement : $k_b$ et $k_{out}$. Le premier traduit la facilité qu'a le phage à fixer FhuA et le deuxième nous donne un temps typique d'éjection de l'ADN une fois FhuA fixé.

## 8.5 Ajustement des données expérimentales

Nous avons réalisé un ajustement global des 5 courbes de la figure 8.2 selon l'expression 8.1. Il n'y a que 2 paramètres pour l'ensemble des courbes réalisées. La comparaison entre les données et l'ajustement est présentée figure 8.3. Le schéma réactionnel proposé permet de comprendre qualitativement l'essentiel des informations accessibles sur ces expériences. Il reproduit correctement la dépendance en $[FhuA]$ du processus d'éjection : le régime à basse concentration où l'étape de fixation est cinétiquement déterminante et le régime à forte concentration en FhuA où l'étape de fixation, quasi immédiate, est imperceptible devant les étapes suivantes du mécanisme. Du point de vue du schéma réactionnel, la frontière entre ces deux régimes se situe lorsque le temps caractéristique de fixation du récepteur $1/kb[FhuA]$, devient négligeable devient le temps caractéristique d'éjection à récepteur fixé $1/k_{out}$.

L'ajustement n'est pas parfait. En ce qui concerne les cinétiques à concentration saturante en FhuA, on peut voir un décalage net entre l'ajustement et la courbe mesurée pour les vingt derniers pourcents de l'éjection. Ce désaccord fait l'objet d'une discussion plus approfondie section 8.7.

Les paramètres donnant le meilleur ajustement sont :

$$k_b(37°C) = 3.10^6 M^{-1}.s^{-1}$$
$$k_{out}(37°C) = 4.5.10^{-3}.s^{-1}$$

La valeur de $k_{out}$ nous donne un ordre de grandeur du temps d'éjection de l'ADN sitôt FhuA fixé. Il faut environ $k_{out}^{-1} = 4$ minutes à 37°C pour que l'ADN soit éjecté après fixation du récepteur. Nous discuterons cette valeur dans la partie 8.6.3, après avoir précisé à quelle étape du mécanisme correspond cette constante.

La valeur de $k_b$ est typique d'une association spécifique protéine-protéine en solution [95]. Par exemple les constantes d'association entre anticorps et antigènes protéiques varient entre

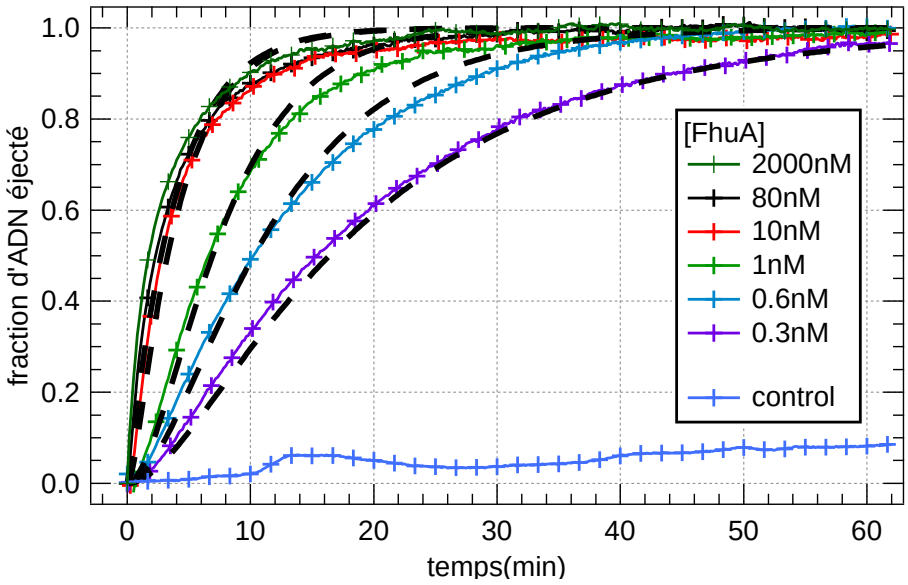



**Figure 8.3 –** Courbes expérimentales similaires à la figure 8.2. Voir la légende précédente pour le détail des courbes expérimentales. Les courbes en pointillés noirs sont le résultat de l'ajustement global de ces données selon l'expression 8.1 déduite partie 8.4.

0.5 et $5.10^6 M^{-1}.s^{-1}$.[7] Notons qu'une telle valeur est cohérente avec les résultats montrant la formation d'un complexe très stable (dénaturation à 85°C) entre FhuA et la protéine de queue pb5 de T5 *in vitro*[100, 101].

Il existe une limite ultime d'environ $7.10^9 M^{-1}.s^{-1}$ pour la constante d'association entre deux protéines de taille standard ($\approx 2nm$) (constante d'association de Smoluchowski [119], purement limitée par la diffusion). Cette valeur correspondrait à une situation où toutes les collisions entre pb5 et FhuA seraient réactives. Si l'on suppose que les collisions réactives sont celles où les surfaces de contact entre les 2 protéines sont bien orientées, une approche simple fixerait cette limite à $7.10^2 M^{-1}.s^{-1}$, plus de 1000 fois inférieure aux valeurs expérimentales ! Pour expliquer ce paradoxe, le travail théorique de Northrup et coll.[95] propose que lorsque deux protéines se rencontrent, elles restent longtemps à proximité l'une de l'autre, car elles sont piégées par l'eau qui les entoure. Les protéines disposent alors de beaucoup de temps pour "trouver" leurs surfaces complémentaires ; beaucoup plus en tout cas, que lors d'un simple choc entre deux molécules de gaz.

Les expériences de suivi par fluorimétrie d'éjection de l'ADN d'une population de phages T5 en fonction de [FhuA] ont éclairé deux points :
- la constante d'association de FhuA sur T5 en solution est de $3.10^6 M^{-1}.s^{-1}$, une valeur élevée typique d'une association spécifique protéine-protéine
- Il existe une cinétique d'éjection limite à saturation en FhuA ([FhuA]>10nM) dont le temps caractéristique est de $k_{out}^{-1} = 4$ minutes à 37°C.

7. Certaines associations protéiques sont plus rapides, comme la dimérisation de l'insuline $k \approx 10^8 M^{-1}.s^{-1}$, mais elles font alors intervenir des interactions coulombiennes fortes, et les constantes sont plus élevées à faible force ionique.

## 8.6 L'étape d'activation est l'étape limitante de la cinétique

On s'intéresse maintenant à la courbe obtenue à saturation de FhuA, afin de comprendre le rôle respectif des étapes d'activation et d'éjection d'ADN dans cette cinétique. Nous avons mis au point plusieurs expériences pour suivre l'éjection d'ADN à l'échelle du virus unique. Nous montrerons que l'une des étapes est limitante dans la cinétique d'éjection, entre l'étape d'activation de constante $k_{op}$ et l'étape d'éjection de constante $k_e$.

A l'échelle du virus unique nous pouvons aisément discriminer les deux hypothèses extrêmes suivantes :

- Soit l'étape d'éjection de l'ADN est limitante, c'est-à-dire que $k_{out} = k_e$. Suivant cette hypothèse, le canal à ADN s'ouvre immédiatement suite à la fixation de FhuA sur le phage et l'ADN est éjecté à une vitesse lente puisqu'environ 4 minutes sont nécessaires pour éjecter les 120kbp du génome. La vitesse d'éjection serait en moyenne de 150 paires de bases par seconde.
- Soit l'étape d'activation, d'ouverture du canal à ADN, est limitante. Suivant cette hypothèse, il existe un délai d'activation de l'ordre de quelques minutes, entre la fixation de FhuA et l'initiation de l'éjection du génome. L'éjection est alors rapide, de l'ordre de quelques secondes. C'est le cas où $k_{out} = k_{op}$.

Précisons ce que nous appelons étape d'activation. On la définit comme étant l'étape située entre la fixation de FhuA sur le phage[8] et l'apparition des premiers signaux de fluorescence dus à l'ADN éjecté. Les signaux fluorescents d'ADN sont suffisamment forts pour qu'il n'y ait pas d'ambiguïté sur ce point.

### 8.6.1 Dispositif expérimental

Dans le dispositif expérimental détaillé section 15.1, nous adsorbons des phages liés à FhuA[9] sur une surface de chambre de microscopie et nous suivons les ADNs éjectés par les phages, en microscopie de fluorescence.

### 8.6.2 Résultats

Les résultats de cette expérience sont conformes à la deuxième hypothèse (voir figure 8.4) : en virus unique, nous observons un délai variable pour chaque phage entre le début de l'expérience, c'est-à-dire la fixation de FhuA, et le commencement de l'éjection de l'ADN. Comparativement, plusieurs minutes peuvent s'écouler avant qu'un phage initie l'éjection de son ADN, tandis que sitôt l'éjection initiée, quelques secondes suffisent pour que tout l'ADN soit éjecté. L'étape cinétiquement limitante du processus d'éjection est donc l'étape d'activation, d'ouverture du canal à ADN. Ainsi, le paramètre $k_{out} = 4.5.10^{-3}s^{-1}$, mesuré dans les paragraphes précédents, est en fait la constante d'activation $k_{op}$. L'étape d'éjection de l'ADN,

8. Dans ces expériences, la fixation de FhuA sur les phages est effectuée avant le début de l'expérience, en incubant les phages et leur récepteur à 4°C. Cette méthode est justifiée après l'encadré.

9. La fixation de FhuA est effectuée avant d'adsorber les phages sur la surface, ce qui permet d'éliminer sa contribution sur la cinétique.

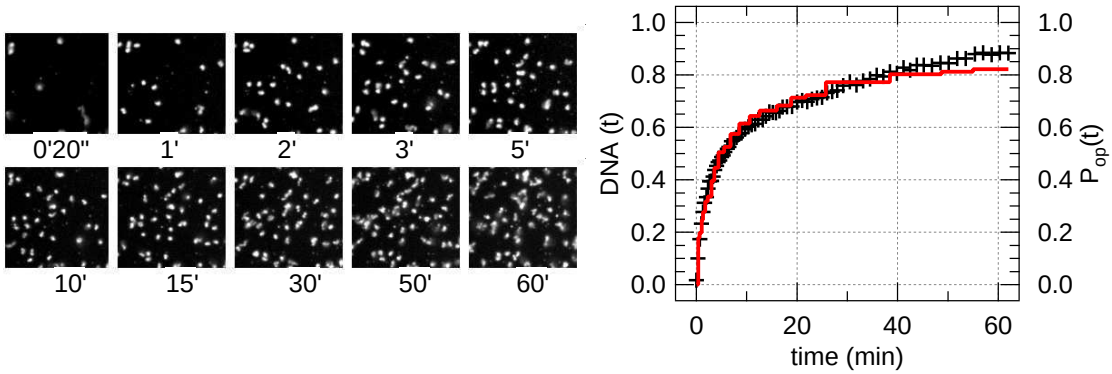



**Figure 8.4** – Comparaison entre les cinétiques de population mesurées par fluorimétrie (+) et la probabilité d'éjection par phage obtenue en expérience de virus unique (ligne) $P_{op}(t)$, à 24°C. Gauche : expérience en virus unique : prises de vue d'un champ d'observation typique au cours du temps. L'apparition au cours du temps des points fluorescents correspond à un évènement d'éjection d'ADN par un phage unique. Droite : la cinétique d'éjection d'ADN en population en concentration saturante en FhuA (+), recouvre la variation temporelle de la probabilité d'éjection d'ADN mesurée à l'échelle du phage unique (ligne rouge).

qui sera étudiée en détail dans les chapitres suivants, ne dure que 3 à 4 secondes, ce qui nous donne une valeur approximative pour $k_{re} \approx 0.2s^{-1}$.

### 8.6.3 Comparaison cinétique en population / cinétique en virus unique

Nous avons comparé quantitativement les résultats des expériences de molécules uniques aux résultats obtenus sur les populations de phages. L'étude de l'étape d'activation des phages est comparée aux cinétiques du processus d'éjection en solution. Le protocole de suivi d'éjection en phage unique, pour une longue période de temps, est détaillé section 15.1.3.2. L'éjection d'ADN a été suivie pour une population de 116 phages et la distribution des temps d'activation en a été déduite. Cette distribution est intégrée et elle est comparée à la cinétique d'éjection en population, mesurée dans les mêmes conditions que l'expérience en phage unique (même température et tampon). Les deux courbes se superposent bien sur la durée de l'expérience (cf figure 8.4). On confirme ainsi que l'étape cinétiquement limitante du processus d'éjection est l'étape d'activation, d'ouverture du canal à ADN.

Nos résultats apportent une vision globale de l'éjection de l'ADN du bactériophage T5 in vitro. Nous avons d'abord caractérisé chacune des 3 étapes de l'éjection de DNA : fixation de FhuA, activation et éjection de l'ADN, par leurs constantes cinétiques $k_b$, $k_{op}$, $k_{re}$. En combinant les résultats d'études en population et en virus unique, nous avons étudié chacune des étapes séparément et estimé quantitativement les valeurs de $k_b$, $k_{op}$, et $k_{re}$ :

$$\phi + FhuA \overset{fixation}{\underset{3.10^6 M^{-1}.s^{-1}}{\overset{k_b(37^\circ C)}{\longrightarrow}}} \phi FhuA \overset{activation}{\underset{4.5.10^{-3}s^{-1}}{\overset{k_{op}(37^\circ C)}{\longrightarrow}}} \phi FhuA^* \overset{éjection}{\underset{0.2s^{-1}}{\overset{k_e}{\longrightarrow}}} \phi FhuA_e + DNA$$

L'étape d'activation, d'ouverture du canal, dure environ 4 minutes à 37°C. Ce délai traduit

une barrière d'énergie relativement élevée. Une étude de Raspaud et coll.[108] a montré que cette barrière est de l'ordre de 40kT aussi bien chez SPP1 que $\lambda$ ou T5. Les auteurs suggèrent que cette valeur commune soit le reflet d'un optimum entre infectivité et stabilité des phages.

D'un point de vue expérimental, nous nous sommes servi de cette barrière énergétique pour contrôler l'initiation des événements d'éjection dans les expériences en virus unique, comme celle présentée figure 8.4. Nous incubons les phages et FhuA à 4°C avant le début de l'expérience. A cette température, la fixation entre T5 et FhuA se produit [101], mais l'étape d'activation est cinétiquement bloquée pendant l'incubation. Les premières éjections commencent après l'adsorption des phages sur la cellule de flux, lorsque qu'un tampon à température ambiante (24°C) est ajouté dans la cellule de flux pour rincer les phages non fixés.

## 8.7 Limites du schéma réactionnel et interprétation

### 8.7.1 T5st(0) : l'étape d'activation est multiexponentielle

Cette partie, plutôt technique, concerne l'interprétation de la déviation observée entre le schéma réactionnel proposé en 8.4 et les résultats expérimentaux. Cette partie intervient dans le contexte d'une étude [25] qui a montré que la cinétique d'éjection de T5, mesurée à concentration saturante en FhuA, n'est pas une simple exponentielle. Nous ne parlons pas ici du comportement non exponentiel dû à l'étape de fixation de FhuA, mais du comportement non exponentiel mesuré sur l'étape d'activation, à saturation en FhuA.

Si l'étape de fixation est très rapide, ($k_b[FhuA] \gg k_{op}$), elle peut être négligée et le schéma réactionnel se résume alors à l'étape d'activation de constante $k_{op}$ [10] :

$$\phi + FhuA \xrightarrow{k_{op}} \phi FhuA_e + DNA$$

Dans ces conditions, on s'attend à une croissance exponentielle simple de la forme $DNA(t) = 1 - e^{-k_{op}t}$. [11] Or si les courbes d'éjection obtenues à saturation en FhuA sont bien identiques, ([FhuA]=10nM, 80nM, et 2$\mu$M), elles ne sont pas des exponentielles simples, comme on peut le voir sur la figure 8.5. Il est nécessaire, afin obtenir un ajustement correct, d'introduire au moins un deuxième temps caractéristique, en accord avec le travail de Marta de Frutos et de ses collaborateurs [25]. [12] L'expression d'ajustement est de la forme :

$$DNA(t) = 1 - ae^{-k_{op1}t} - be^{-k_{op2}t}, a + b = 1$$

Comment interpréter cette cinétique ? La coexistence de 2 temps caractéristiques suggère qu'il existe deux voies parallèles conduisant à l'éjection de l'ADN. Chaque voie correspond à une succession d'évènements déclenchés par la fixation de FhuA sur la queue du phage qui conduit très probablement :

10. Puisque l'étape d'éjection d'ADN est aussi de durée négligeable.
11. A titre de vérification, l'expression 8.1 tend bien vers cette limite lorsque $kb[FhuA] >> k_{op}$.
12. Dans ce précédent travail, la cinétique est suivie par diffusion de la lumière, sans marquage de l'ADN. L'ajustement aux temps longs est toutefois légèrement différent (12 minutes au lieu de 9 minutes).

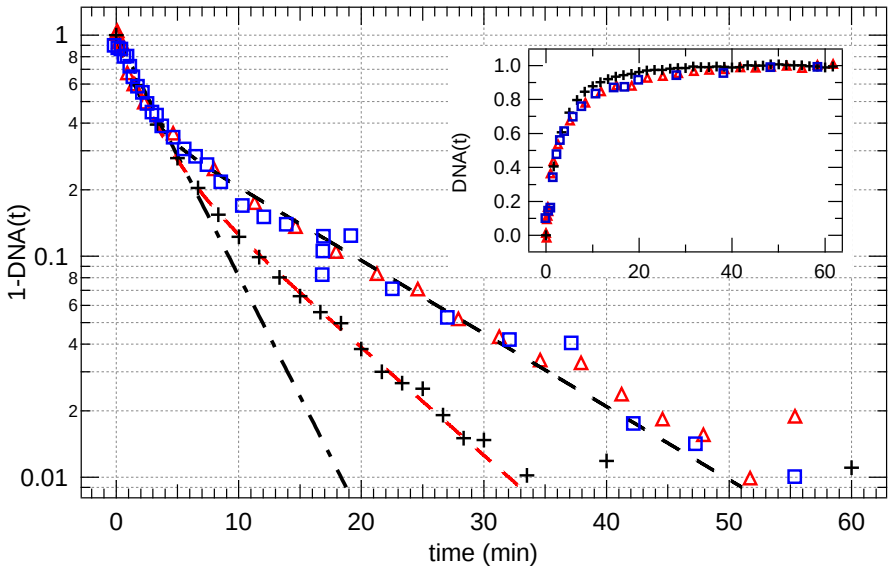



**Figure 8.5 –** Cinétique d'éjection en population de bactériophages T5st(0) (croix noires), T5amHA911$^{+}$ (carrés rouges) et T5amHA911$^{-}$ (triangles bleus) dans le régime de haute concentration en récepteurs FhuA à 37°C. La cinétique est normalisée selon la fluorescence finale. Les premières minutes de la cinétique sont bien ajustées par une exponentielle simple $DNA(t) = 1 - e^{-t/\tau}$ (courbe noire traits pointillés), mais une double exponentielle est nécessaire pour ajuster correctement les 20 derniers pourcents de T5st(0) (pointillés rouges) et T5amHA911 (pointillés noirs).

- A des changements conformationnels au niveau des protéines de l'extrémité de la queue de T5,
- à la transmission d'un signal jusqu'au connecteur via le réarrangement de certaines protéines de queue,
- à l'ouverture du connecteur,
- et à la translocation (rapide) de l'ADN.

Chacun de ces événements structuraux, hormis le dernier, peut être limitant dans l'étape d'activation. La probabilité de chaque voie d'activation est donnée par le poids de l'exponentielle correspondante (les facteurs $a$ et $b$ sont les poids correspondant aux phages pour la voie de constante $k_{op1}$ et $k_{op2}$ respectivement). Selon cette interprétation, la voie la plus courte, de constante $k_{op1}(37°C)^{-1}$= 2 min contribue pour environ 60% et la voie longue de constante $k_{op2}(37°C)^{-1}$= 9 min pour environ 40% des ouvertures. Nos résultats ne nous permettent pas de savoir si ces voies sont dues à des alternatives à l'intérieur de chaque phage (propriété intrinsèque du phage) ou si ces voies proviennent d'une hétérogénéité dans la population de phages. En faveur de cette dernière hypothèse, des hétérogénéités dans une population purifiée de phages T5 ont déjà été rapportées *in vivo* [55] : ainsi 20% des phages sont bloqués après le transport de l'ADN FST lors de l'infection.

### 8.7.2 Etude du mutant sans nick conditionnel de T5 : T5amHA911

Il a été suggéré [25] que les nicks présents le long du génome de T5 (voir section 7.5.1) soient responsables du comportement pluriexponentiel de la cinétique en population. Un modèle avait été proposé dans lequel l'éjection du génome de T5 se faisait par étapes successives

séparées par des pauses de plusieurs minutes. Ces blocages transitoires lors de l'éjection étaient supposés provenir des nicks.

Pour étayer cette hypothèse nous disposons d'un phage T5 mutant (T5amHA911), dont l'ADN est dépourvu de nicks (T5amHA911$^-$) mais dans lequel les nicks peuvent être réintroduits (T5amHA911$^+$) en les produisant dans la souche d'*E. coli* suppresseur (principe du mutant conditionnel ambre). Nous avons étudié la cinétique d'éjection en population des phages T5amHA911 afin de voir si le comportement pluri exponentiel était toujours présent ou non.

Plusieurs différences ont été trouvées entre T5st(0) et T5amHA911, mais pas celles qui étaient attendues.

Aucune différence n'a été trouvée entre T5amHA911$^-$ et T5amHA911$^+$, ce qui a exclu d'emblée le rôle des nicks dans la cinétique d'éjection ![13] La cinétique d'éjection est cependant très différente de celle de T5st(0). D'une part, la constante d'association de FhuA est plus faible : à [FhuA]=10nM, la cinétique est encore dominée par l'étape de fixation à FhuA (voir figure 8.6). L'affinité de cette souche pour FhuA est donc plus faible, approximativement d'un facteur 10. C'est un résultat étonnant puisque la différence majeure entre T5st(0) et T5amHA911 n'est censée provenir que des nicks !

L'association à FhuA est plus lente à la fois pour T5amHA911$^-$ et T5amHA911$^+$. Cette différence avec T5st(0) ne provient donc pas des nicks et il faut chercher une autre cause. Pascale Boulanger dans l'équipe de Lucienne Letellier, a séquencé les protéines de queue du phage T5amHA911 et a trouvé une autre mutation (non conditionnelle) que celle responsable de l'absence des nicks. L'association réduite pour FhuA s'explique ainsi probablement par la présence d'une mutation sur une protéine distale de queue distale de T5 : pb2 (voir figure 7.2).

#### 8.7.2.1 Une cinétique curieuse à haute concentration en FhuA

Un autre aspect curieux de T5amHA911 est qu'il semble exister une proportion de phages qui n'éjectent leur ADN qu'à très haute concentration en FhuA. Si l'on augmente petit à petit la concentration de FhuA, autour de 40nM, la cinétique semble tendre vers une valeur limite (figure 8.6, haut). Cependant, autour de 600nM, on observe à nouveau une croissance lente de la cinétique d'éjection, représentant environ 20% du signal total de fluorescence. Il est probable qu'il existe dans la préparation une proportion de phages qui n'éjectent qu'à très haute concentration en FhuA. Pour illustrer clairement ce point, nous avons réalisé une expérience d'éjection dans laquelle nous faisons d'abord éjecter les phages avec une concentration moyenne en FhuA. Puis, alors que la courbe semble se stabiliser, nous ajoutons une forte quantité de FhuA ; la fluorescence augment alors sensiblement. Nous pouvons expliquer cet effet par la coexistence de phages ayant une faible ou une forte affinité pour FhuA (figure 8.6, bas). Le contrôle réalisé avec T5st(0) montre que ceci est spécifique de T5amHA911. L'origine d'une telle hétérogénéité reste mystérieuse.

13. L'absence de nicks pour T5amHA911$^-$ et leur présence pour T5amHA911$^+$ ont été vérifiées sur gel (voir les figures supplémentaires de l'article à la fin du manuscrit).

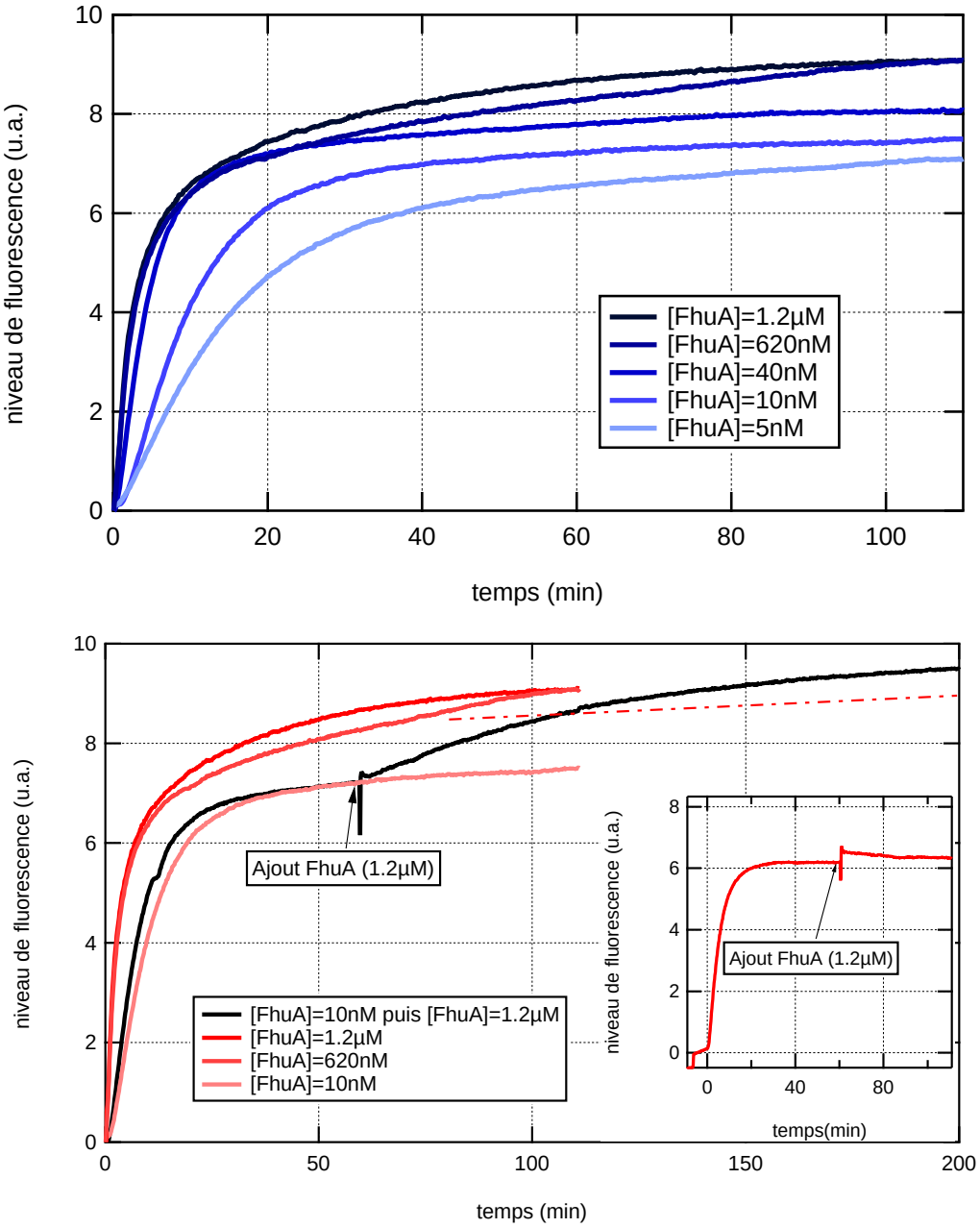



**Figure 8.6** – Cinétique d'éjection de l'ADN d'une population de T5amHA911. Haut : quantité d'ADN éjecté en fonction du temps et de la concentration en FhuA, pour des concentrations croissantes de 5nM à 1.2$\mu$M. Bas : expérience de double ajout montrant l'existence de phages faiblement et fortement sensibles à FhuA. La courbe noire d'éjection est initiée à 10nM, puis au bout d'une heure, la concentration en FhuA est augmentée à 1.2$\mu$M. L'offset de fluorescence créé suite à l'ajout de FhuA est soustrait de la courbe (voir 15.2.0.5). L'encart montre la même expérience pour la souche T5st(0).

### 8.7.3 Comparaison T5st(0)/T5amHA911

A [FhuA]=2$\mu M$, la cinétique d'éjection de T5amHA911 ne dépend plus de [FhuA], l'étape de fixation est à nouveau de durée négligeable devant le reste du processus d'éjection. Les deux cinétiques à saturation de FhuA sont alors similaires entre T5st(0) et T5amHA911 (figure 8.5). On retrouve un comportement pluriexponentiel, bien que le temps long soit légèrement plus long pour T5amHA911 que pour T5st(0).

La cinétique du processus d'éjection de T5 est pluriexponentielle. Pour expliquer cette cinétique, l'hypothèse la plus probable est que les multiples temps caractéristiques traduisent une hétérogénéité dans la population de T5. Cette hypothèse s'oppose aux modèles précédents qui proposaient un rôle majeur des nicks dans le comportement pluriexponentiel. Cette nouvelle hypothèse est soutenue par les résultats obtenus sur un mutant de T5 (T5amHA911), mutée sur la protéine de queue pb2. Nous pouvons clairement discerner au moins deux sous populations qui sont séparables selon leur capacité d'association à FhuA.

### 8.7.4 Perspectives

La mesure de la cinétique d'éjection en solution permet d'obtenir à la fois des informations sur l'affinité du phage pour son récepteur, de mesurer des temps d'activation et, chez T5, de mettre en évidence des hétérogénéités de population.

Actuellement, différentes études de cryo EM ont pour but de comprendre le processus d'activation de phages à travers leurs réarrangements structuraux ; pour SPP1 voir [23], pour P-SSP7 voir [80], et des études sont en cours pour T5. Dans le cas de T5 et de SPP1, pour lesquels les protéines réceptrices sont connues, la mesure de la cinétique d'activation sur une population de phages semble être une expérience se combinant bien avec l'étude de mutants structuraux de phages.

# Chapitre 9

# Physique du confinement de l'ADN dans la capside : théorie et expériences

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

L'ADN de T5 est fortement compacté dans la capside. C'est cette compaction qui est le moteur de l'éjection passive de l'ADN *in vitro*. Le confinement de l'ADN dans les capsides de phages a fait l'objet de nombreuses études théoriques et expérimentales[2] qui sont présentées dans ce chapitre. Notre travail expérimental sera présenté dans le chapitre suivant.

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

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

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

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

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

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

## 9.1 Positionnement physique du problème

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

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

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

## 9.2 Structure de l'ADN confiné dans la capside

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

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

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

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

### 9.2.1 Capside pleine $\rho \approx 0.5$

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

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

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

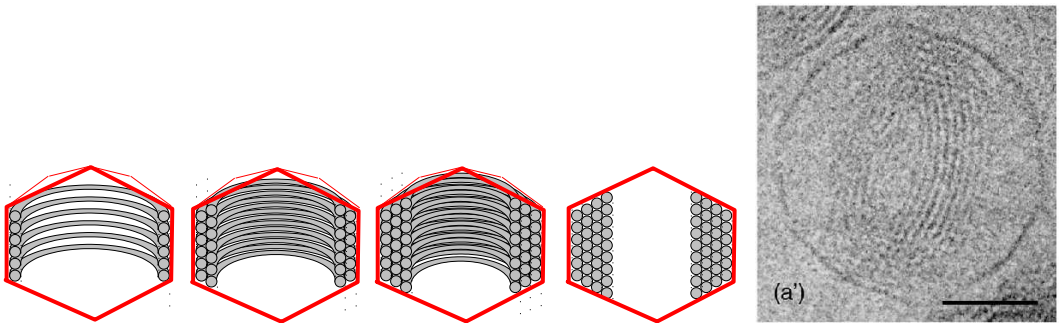



**Figure 9.1** – Remplissage "inverse spool", en bobine inverse. Photo droite : capside partiellement remplie par un tore d'ADN condensé par la spermine, micrographie reproduite depuis Leforestier et coll [75].

### 9.2.2 Capside partiellement remplie $0 < \rho < 0.5$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

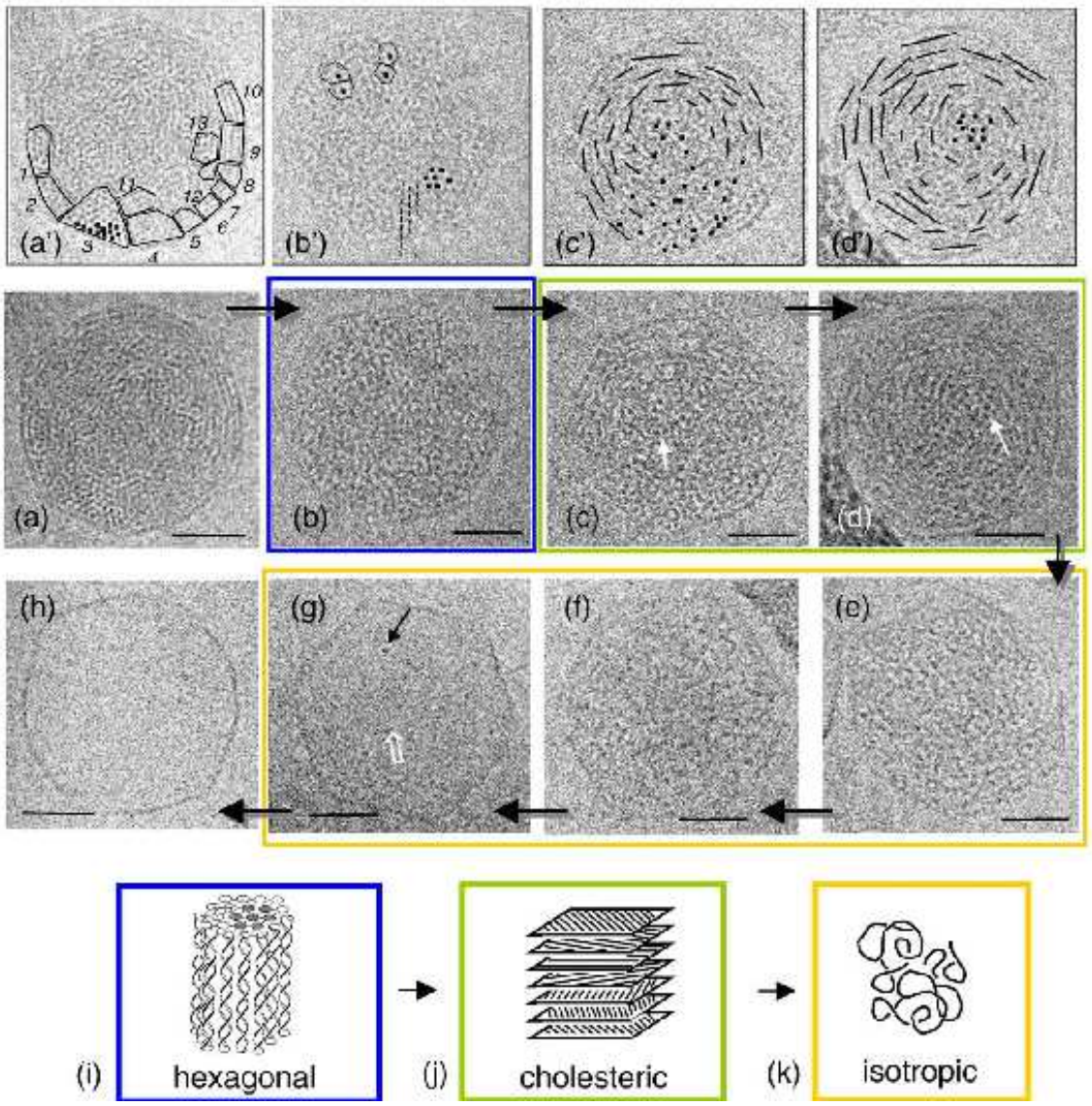



**Figure 9.2** – Variation de l'organisation de l'ADN à différents niveaux de remplissage de la capside. Les images sont rangées par fraction volumique décroissante. La capside pleine en (a) et vide en (h) encadre les états intermédiaires. Dans la capside pleine, l'ADN est rangé de manière hexagonale,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

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

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

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

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

.

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

### 9.3.1 Modèle semi-empirique

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

ignorés. [10]

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

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

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

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

J'ai choisi d'utiliser des données plus récentes, tirées de [122] (figure 9.4), qui sont faites sur une plus large gamme de distances interbrin [12]. Une explication théorique et un modèle de ces courbes sont fournis dans l'article de Strey et coll [122]. Sans rentrer dans le détail nous retiendrons trois éléments principaux :

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

10. T. Odijk propose une approche non empirique dans les deux travaux suivants : [96, 97].
11. Ces mesures prennent donc en compte nombre des effets complexes présentés en introduction.
12. donc de concentration en ADN
13. Les co-ions, tel que $Cl^-$ ou $SO_4^{2-}$ font aussi varier l'équation d'état, dans une moindre mesure.

- **A nature de sel fixée, deux régimes** sont visibles en fonction de la distance interbrin $d_i$ :
  - $d_i > 3nm$, il s'agit du régime où les répulsions électrostatiques type Debye-Hückel sont visibles [14]. L'écrantage électrostatique s'effectue suivant la longueur caractéristique de Debye $\lambda_D$ qui est **dépendante de la concentration $C$ en contre-ions**.
  - $d_i < 3nm$, ce régime est **indépendant de la concentration en contre-ions** (cf figure 9.4). Il s'agit du régime dit d'hydration où la nature discrète des molécules prend son importance, la longueur de décroissance caractéristique de ces forces est de 0.3nm.

#### 9.3.1.2 Application au cas des bactériophages

L'approche présentée ci-dessous est identique au travail des publications de Purohit et coll ([105, 104]), à deux exceptions près. Nous allons, pour notre modèle, calculer la distance interbrin de manière uniquement géométrique. Nous négligerons les effets de courbure [15], ce qui permet de calculer une énergie libre qui dépende exclusivement de la concentration en ADN intracapside, facilitant ainsi les comparaisons entre phages.

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

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

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

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

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

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

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

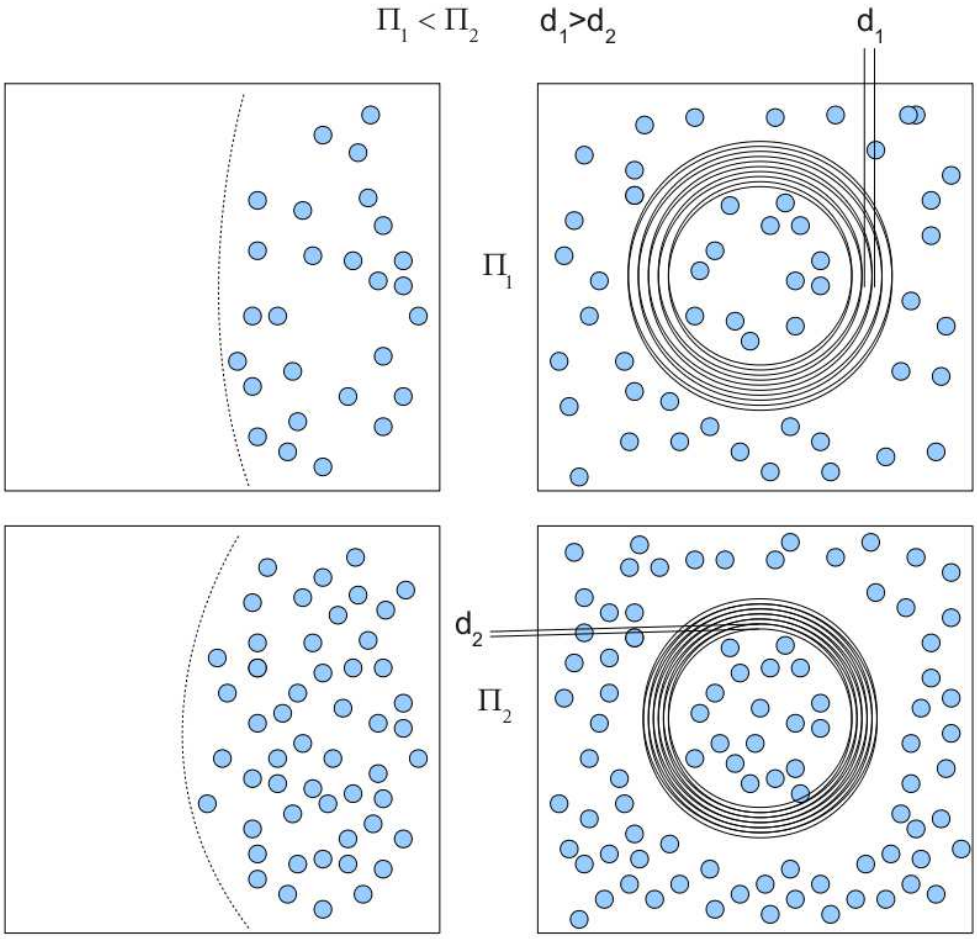



**Figure 9.3** – Principe de la mesure de l'équation d'état des condensats d'ADN. Gauche : une membrane semi-perméable isole les polymères de stress osmotique (ronds bleus) à droite de la cuve, mais laisse passer l'eau et les ions. Les polymères exercent une pression osmotique qui fait affluer l'eau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

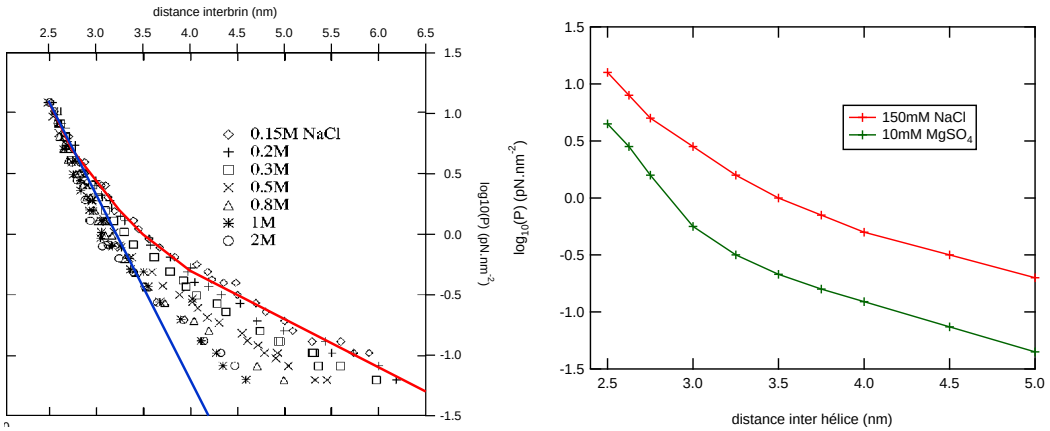



**Figure 9.4** – Equation d'état des condensats d'ADN. Les figures montrent la dépendance de l'espace interbrin de l'ADN en fonction de la pression osmotique appliquée. Gauche : la figure est reproduite de [122]. La courbe rouge correspond à l'ajustement empirique utilisé pour les expériences en présence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

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

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

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

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

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

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

Alors l'énergie libre peut s'intégrer en :

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

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

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

On peut exprimer $d_i$ en fonction de la fraction volumique en ADN $\rho$ :

$$\rho = \frac{V_{ADN}}{V_{capside}} = \frac{sL}{V_{capside}} => \frac{V_{capside}}{L} = \frac{s}{\rho}$$

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

$$d_i^2 = \frac{2}{\sqrt{3}}\frac{V_{capside}}{L} = \frac{2}{\sqrt{3}}\frac{s}{\rho}$$
$$d_i = \sqrt{\frac{2}{\sqrt{3}}\frac{s}{\rho}} = \frac{\alpha}{\sqrt{\rho}} \tag{9.1}$$

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

On exprime l'énergie libre $F$, en fonction de $\rho$ :

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

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

$$f(\rho) = \sqrt{3}\Pi_0\frac{d}{d\rho}((l_h^2\rho + l_h\alpha\sqrt{\rho})e^{-\frac{\alpha}{l_h\sqrt{\rho}}})$$

$$f(\rho) = \sqrt{3}\Pi_0(l_h^2 + \frac{l_h\alpha}{\sqrt{\rho}} + \frac{\alpha^2}{2\rho})e^{-\frac{\alpha}{l_h\sqrt{\rho}}} \tag{9.2}$$

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

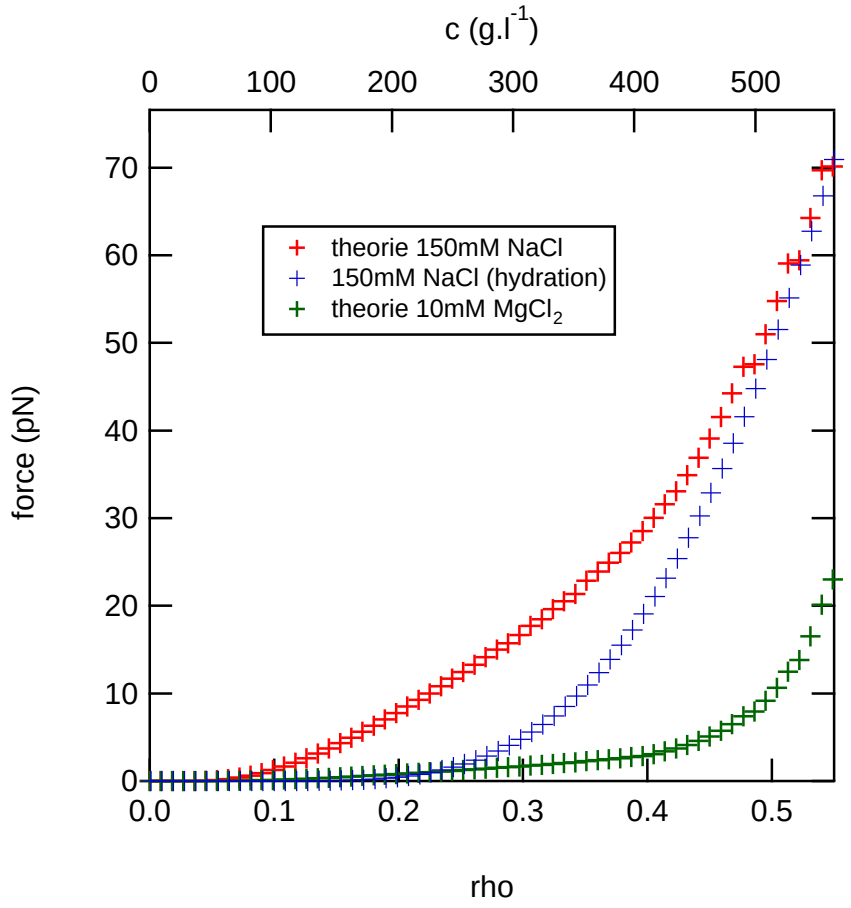



**Figure 9.5** – Force théorique exercée par l'ADN en fonction de la fraction volumique en ADN et de la concentration massique. Deux conditions expérimentales sont étudiées : 150mM NaCl et 10mM $MgSO_4$ en rouge et en vert respectivement. La courbe bleue montre le résultat de l'équation 9.2, qui ne coïncide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

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

#### 9.3.1.3 Contribution de la rigidité de courbure.

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

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

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

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

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

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

## 9.4 Expériences antérieures, état de l'art

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

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

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

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

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

Nous pouvons directement comparer la théorie du paragraphe précédent à ces mesures expérimentales. En traduisant les longueurs des ADNs encapsidés en terme de fraction volumique, grâce aux données du tableau 9.1, j'ai rassemblé sur un même graphe les mesures disponibles sur le phage phi29 et le phage lambda (figure 9.6). Concernant phi29, les données sont extraites de la publication de Fuller et coll ([40]) où sont comparées les forces internes pour différents types de solutions ($NaCl$ / $MgCl_2$ / $Co^{3+}$). Pour lambda, l'étude disponible est aussi de Fuller et coll ([41]), mais les données ne sont réalisées qu'en présence d'ions divalents.

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

### 9.4.2 Inhibition d'éjection par pression osmotique

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

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

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

18. Si l'on chercher à obtenir un meilleur accord dans ce régime, il faut prendre en compte la différence dans la longueur de Debye, puisque les mesures sur les condensats sont à 150mM NaCl tandis que l'encapsidation est effectuée à 100mM NaCl $1mMMgSO_4$. De plus, il est probable que dans ce régime l'empilement ne soit pas parfaitement hexagonal compact, augmentant la valeur du paramètre $\alpha$ liant $d_i$ et $\rho$. [26]

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

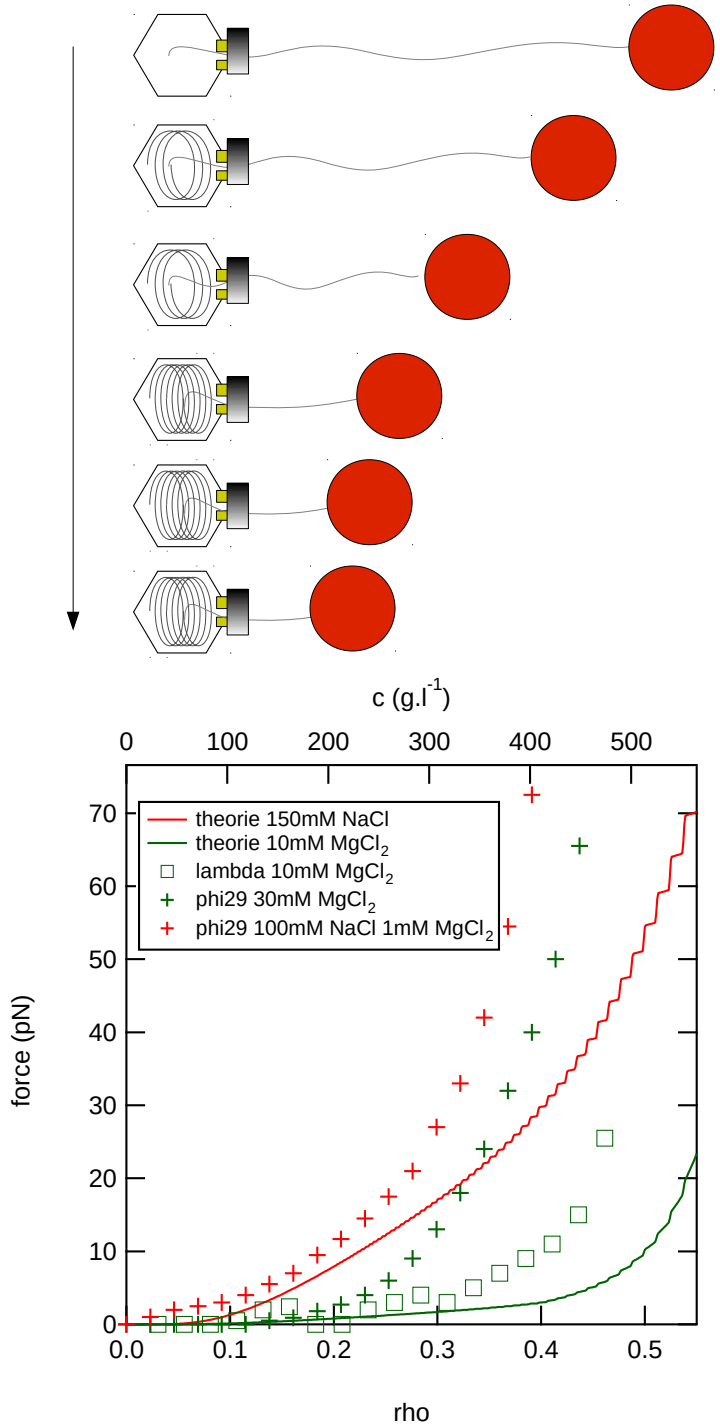



**Figure 9.6** – Comparaison théorie / expériences d'encapsidation. Haut : schéma de principe des expériences d'encapsidation. Une capside est fixée sur la surface d'une bille (non représentée) à l'aide d'anticorps spécifiques de la capside. Une extrémité de l'ADN est attachée à la capside via la terminase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

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

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

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

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

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

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

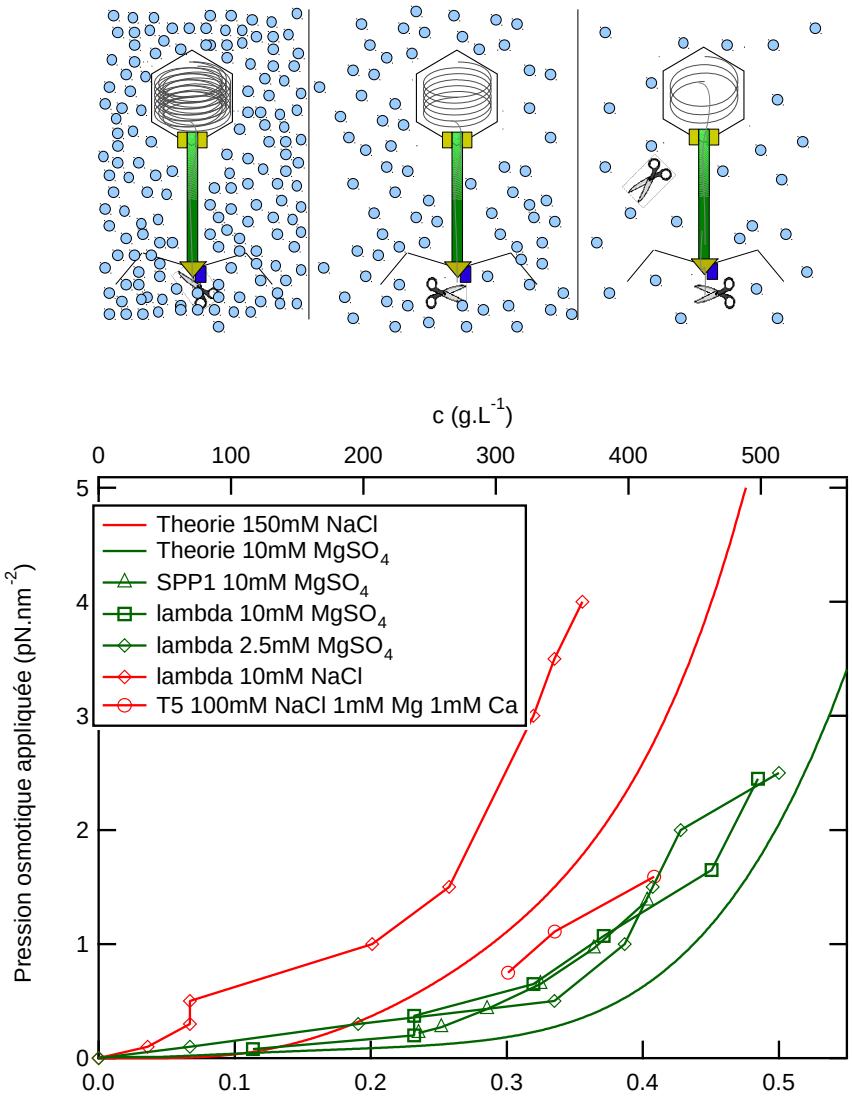



**Figure 9.7** – Haut : principe des expériences de suppression osmotique. Une quantité d'ADN plus ou moins grande est éjectée de la capside du phage en fonction de la pression osmotique externe. L'ADN éjecté est dégradé par des nucléases ajoutées au milieu. La mesure de la quantité d'ADN restante dans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

## 9.5 Conclusion

Selon la théorie et les expériences à la fois d'encapsidation et de suppression osmotique, il se dégage une idée logique : **plus la fraction volumique d'ADN dans la capside $\rho$ est grande, plus la force interne exercée par l'ADN est grande**. Le milieu dans lequel baigne le phage influe énormément sur cette force, la **pression osmotique externe de la solution** ainsi que la **concentration** et le **type de contre-ions** présents dans la solution sont les facteurs les plus importants. La force est ainsi réduite en présence de contre-ions monovalents par rapport aux contre-ions divalents.
Toutefois, même en prenant en compte ces paramètres dans le modèle, il semble manquer un élément essentiel pour expliquer quantitativement la valeur de la force interne. Je propose que cet ingrédient soit la **frustration de l'ADN** dans la capside, qui est totalement négligée par le modèle semi-empirique. L'énergie libre de l'ADN serait dominée par les défauts cristallins de l'ADN entre nanodomaines hexagonaux aux hautes fractions volumiques dans les capsides de phage.

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

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

# Chapitre 10

# Cinétique de translocation du génome

Le chapitre précédent a permis de présenter les idées générales et les expériences qui concernent le confinement d'ADN dans les bactériophages. Vont être maintenant présentés les résultats expérimentaux obtenus au cours de mon travail sur la cinétique d'éjection de l'ADN de T5 (la troisième étape dans le schéma 5.1). Historiquement, le phage T5 a été le premier phage pour lequel la cinétique de cette étape a été étudiée [83] *in vitro*. Ces expériences ont ensuite été réalisées sur le phage lambda ([46] pour le premier travail sur lambda). L'importance biologique de cette étape est soulignée en introduction du chapitre 9 et dans le chapitre 12.

Notre étude intervient pour compléter à la fois la compréhension des étapes initiales du processus d'éjection et celle du confinement de l'ADN dans les capsides, en y ajoutant un aspect dynamique. En effet, les expériences de suppression osmotique sont réalisées à l'équilibre, les expériences d'encapsidation sont probablement quasi-statiques, alors que l'étape de translocation est sans doute hors équilibre.

L'idée générale de ces mesures est de suivre la quantité d'ADN éjecté hors de la capside en fonction du temps. Le schéma de principe est montré figure 10.1. Etant donné que cette étape est très rapide devant l'étape d'activation du phage, sa dynamique est masquée dans les expériences de fluorimétrie en solution par l'étape d'activation, qui est cinétiquement limitante. Il est nécessaire, pour l'étudier, de réaliser des expériences en molécule unique.

Selon une vision naïve du phénomène, on peut penser que la vitesse d'éjection est simplement proportionnelle à la force exercée par l'ADN dans la capside. Je décris dans la section suivante les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse, résultats qui infirment cette idée.

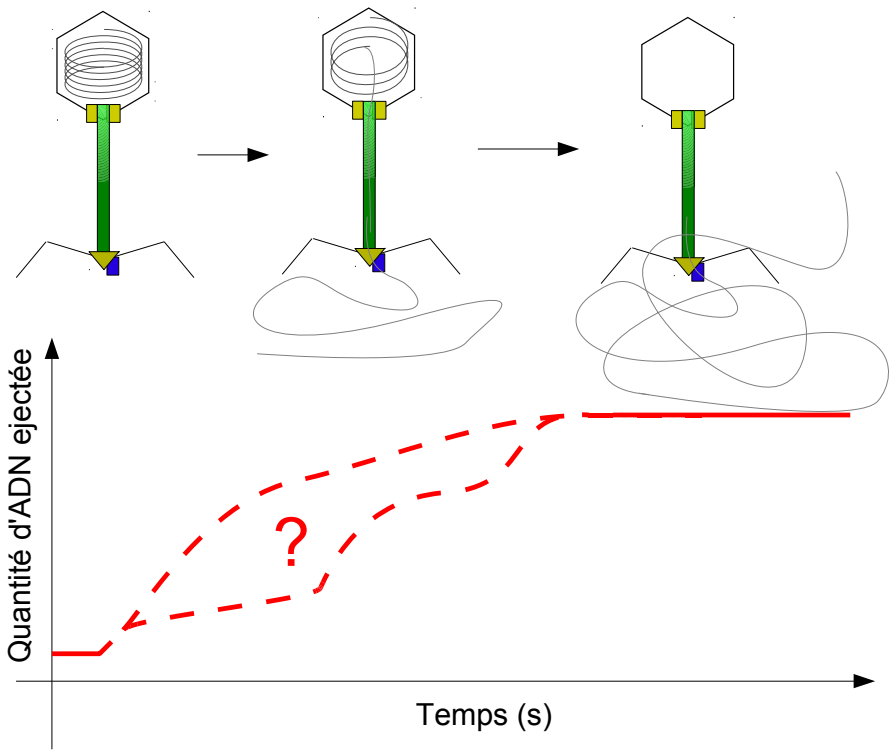



**Figure 10.1** – Ejection de l'ADN du phage. Lorsque le canal à ADN est ouvert, la pression interne au phage expulse l'ADN. Cet ADN est expulsé à une vitesse finie qui est mesurée dans les cinétiques d'éjection. Deux profils possibles de cinétiques sont montrés en pointillés.

## 10.1 Résultats expérimentaux : une éjection d'ADN rapide, non monotone

Nous avons mesuré la vitesse d'éjection d'ADNs issus de phages uniques en suivant le protocole élaboré et présenté section 15.1. Brièvement, de la même manière que pour les expériences en solution, nous suivons la quantité d'ADN éjecté au cours du temps à l'aide d'une molécule fluorescente qui marque uniquement l'ADN situé hors de la capside. Sous microscope, il est possible d'obtenir une résolution suffisante pour distinguer les phages uniques. Des films d'éjection d'ADN de phages sont alors réalisés [1], où il est possible de quantifier la fluorescence totale de chaque molécule d'ADN au cours du temps. Cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN éjecté par chaque phage. Chaque mesure est normalisée par rapport au signal de fluorescence final, lorsque le phage a éjecté tout son ADN. Les mesures sont réalisées sous un léger flux ($53s^{-1}$) qui étire l'ADN sortant des capsides. Cet étirement permet de garder les ADNs dans le plan de focalisation de l'objectif. La mesure de la longueur d'ADN éjecté permet de s'assurer que tout le génome est sorti lorsque l'on effectue la normalisation. La validité de cette approche pour le suivi de l'éjection est détaillée dans la section protocole 15.1.3.1. [2]

Les mesures sont effectuées dans une solution tampon constituée majoritairement d'ions monovalents (tampon phage : 100mM NaCl, 1mM $MgSO_4$, 1mM $CaCl_2$), en l'absence d'agents stressants osmotiques. La souche de T5 utilisée est la souche thermostable T5st(0) (114kbp).

La figure 10.2 montre la cinétique d'éjection pour 4 phages T5st(0). On peut extraire de ces courbes la vitesse d'éjection de l'ADN en fonction de la quantité d'ADN éjecté ; un exemple de calcul de vitesse est présenté sur la figure 10.3 [3]. La moyenne de ces vitesses sur l'ensemble des éjections (N=70) est représentée figure 10.4 (haut). On peut déduire à partir de la vitesse moyenne une cinétique de translocation "moyenne" qui est comparée aux traces typiques des 70 éjections étudiées, figure 10.4 (bas).

Conformément aux observations du chapitre 8, l'éjection est très rapide puisqu'elle ne dure que 3 à 4 secondes, soit une vitesse typique de l'ordre de la dizaine de kpb par seconde. Remarquons la variation non monotone de la vitesse d'éjection. Elle atteint un maximum lorsque qu'environ 30 % de l'ADN est éjecté, puis diminue graduellement. Ce comportement contredit l'idée selon laquelle la vitesse d'éjection serait la plus grande lorsque la force exercée par l'ADN est la plus grande, c'est-à-dire au début de l'éjection. C'est l'objet de la discussion qui suit.

## 10.2 Effet de la valence des contre-ions

Nous avons réalisé quelques mesures de cinétique d'éjection de l'ADN de T5 en présence d'ions divalents. [4] Les cinétiques d'éjection étudiées dans une solution contenant 10mM de $MgSO_4$ et toujours tamponnée avec 10mM de Tris-HCl (Tampon phage divalent, cf annexe

1. Les films sont pris à 62 images par seconde.
2. Notamment une discussion concernant la vitesse de fixation des molécules fluorescentes sur l'ADN.
3. Voir la section protocole pour le détail de l'analyse.
4. T5 nécessite toujours un minimum d'ions divalents, 1mM de $Ca^{2+}$ et 1mM de $Mg^{2+}$.

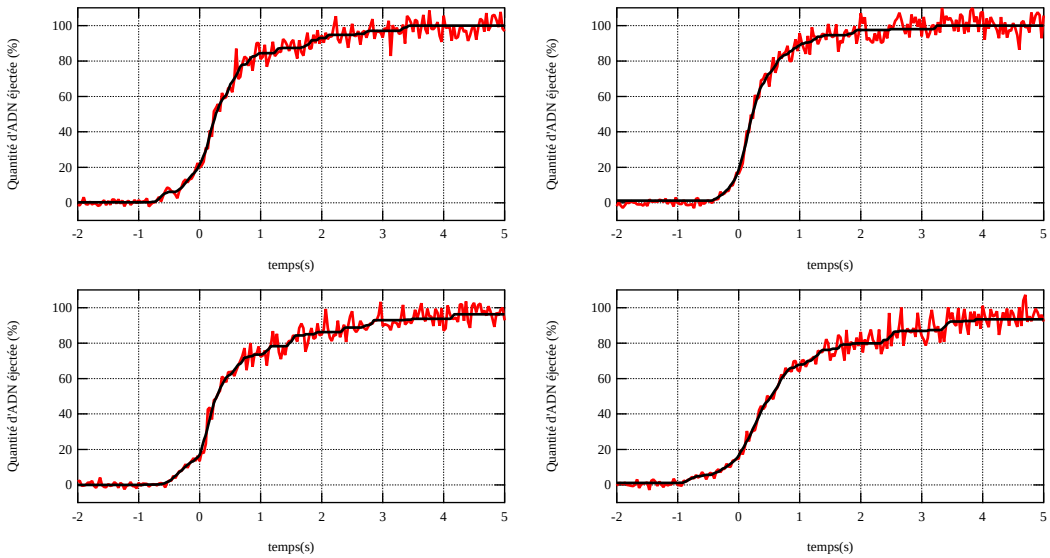



**Figure 10.2** – 4 courbes typiques de cinétique de translocation d'ADN obtenues pour le phage T5st(0) selon le protocole 15.1.3.1. A t=0, l'ADN commence à sortir du phage. L'étape de translocation d'ADN ne dure que quelques secondes. Le signal brut est en rouge et le signal filtré en noir.

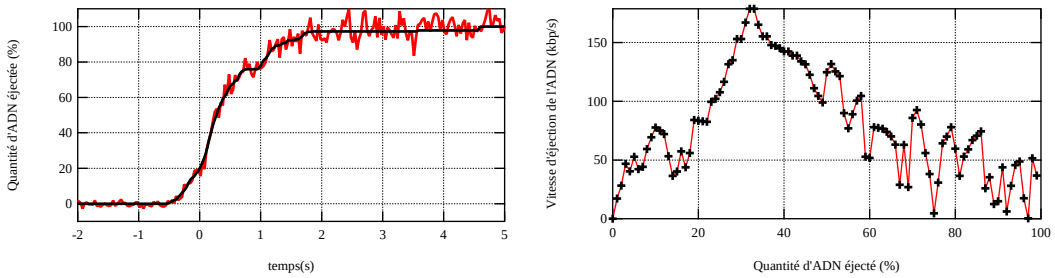



**Figure 10.3** – Cinétique typique de translocation d'ADN. Le signal brut est en rouge et le signal filtré en noir. La vitesse d'éjection déduite du signal filtré est représentée à droite.

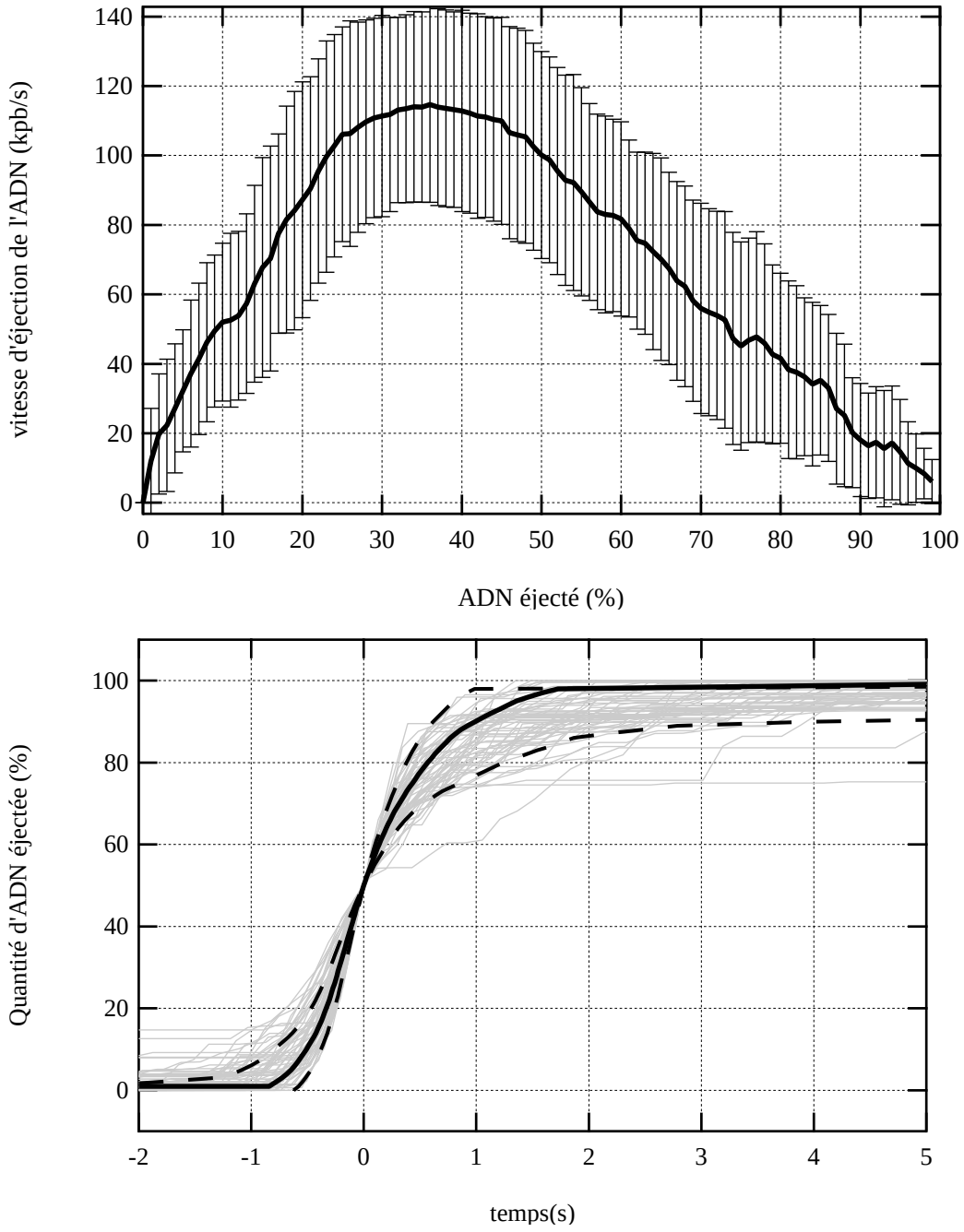



**Figure 10.4 –** Haut : vitesse moyenne de translocation d'ADN en fonction de la quantité d'ADN éjecté et écart type calculé à partir des 70 translocations étudiées. Bas : Noir : courbes de translocation calculées à partir de la moyenne des vitesses sur l'ensemble des éjections. En pointillés sont représentées les courbes d'éjection frontières obtenues respectivement à partir de la vitesse moyenne + l'écart type et la vitesse moyenne - l'écart type. Grisé : les 70 éjections observées expérimentalement, après filtrage. Toutes les éjections sont synchronisées de manière à ce qu'à t=0, 50% de l'ADN soit éjecté.

B.3) sont montrées figure 10.5. Nous disposons malheureusement de trop peu de données pour faire une statistique satisfaisante (N=5 éjections). Néanmoins la qualité des courbes obtenues et leur reproductibilité apparente est suffisante pour voir que la vitesse d'éjection est beaucoup plus lente qu'en présence d'ions monovalents, conformément à la théorie qui prédit une force interne plus faible (conclusion du chapitre précédent 9.5 et figure 9.5). Dans ces conditions de salinité, il faut environ 30 secondes pour éjecter l'ADN, alors qu'avec les ions monovalents 3 secondes suffisent. La courbe, vitesse d'éjection en fonction de la quantité d'ADN éjecté, a le même profil qu'en présence d'ions monovalents, à ceci près que la vitesse est environ 10 fois inférieure.

## 10.3 Influence des nicks de T5 sur l'étape d'éjection

### 10.3.1 Le modèle : un nick - une pause ?

Une particularité de T5 est l'existence de nicks codés génétiquement le long de son génome (voir partie 7.5.1 et le tableau en annexe A). Il a été suggéré que ces nicks puissent avoir un rôle physiologique important dans le cycle de vie de T5[25, 83]. Notamment, il a été postulé que le nick situé autour de 8% du génome puisse être à l'origine de la pause observée *in vivo* entre l'éjection de l'ADN FST et celle de l'ADN SST.

Une idée à l'origine de ces expériences d'éjection *in vitro* est que les nicks présents le long de l'ADN puissent induire des pauses transitoires lors de l'éjection de l'ADN. Dans le modèle "un nick-une pause", les nicks créent des points de blocage qui stoppent temporairement la translocation rapide de l'ADN. [5] L'arrêt induit par le nick situé à 8% du génome pourrait alors expliquer l'éjection de l'ADN en deux étapes observée *in vivo* (FST-SST).

Dans ce travail de thèse nous avons testé ce modèle en utilisant un mutant conditionnel présentant des nicks (T5amHA911$^+$) ou non (T5amHA911$^-$) selon la souche d'*E coli* utilisée pour le produire. [6]

### 10.3.2 Cinétique comparée T5st(0) / mutant nickless T5amHA911

Aucune différence notoire n'est observée entre les trois phages T5st(0), T5amHA911$^+$ et T5amHA911$^-$. De manière générale, l'éjection de l'ADN est continue et sans pause, à l'échelle de notre résolution temporelle (≈0.1s). Des différences évidentes sont observées, comme l'éjection d'un ADN 8% plus long pour T5amHA911, mais rien qui soit relié à l'absence ou à la présence de nicks. De courtes pauses, de l'ordre de la seconde sont visibles dans 10% des cas (voir figure 10.7 pour T5st(0)) indépendamment de la présence ou de l'absence de nicks, puisque des pauses sont observées dans certains cas pour T5amHA911$^-$. Dans l'éjection *in vitro* les nicks jouent un rôle mineur ou inexistant. Cela signifie aussi que la flexibilité locale

5. En supposant que les blocages ont des temps caractéristiques différents, ce modèle permet d'expliquer la cinétique d'éjection pluriexponentielle observée en population.

6. Le rôle de ses nicks est inconnu ; néanmoins leur absence n'est pas létale, comme le prouve la possibilité de faire croître T5amHA911$^-$.

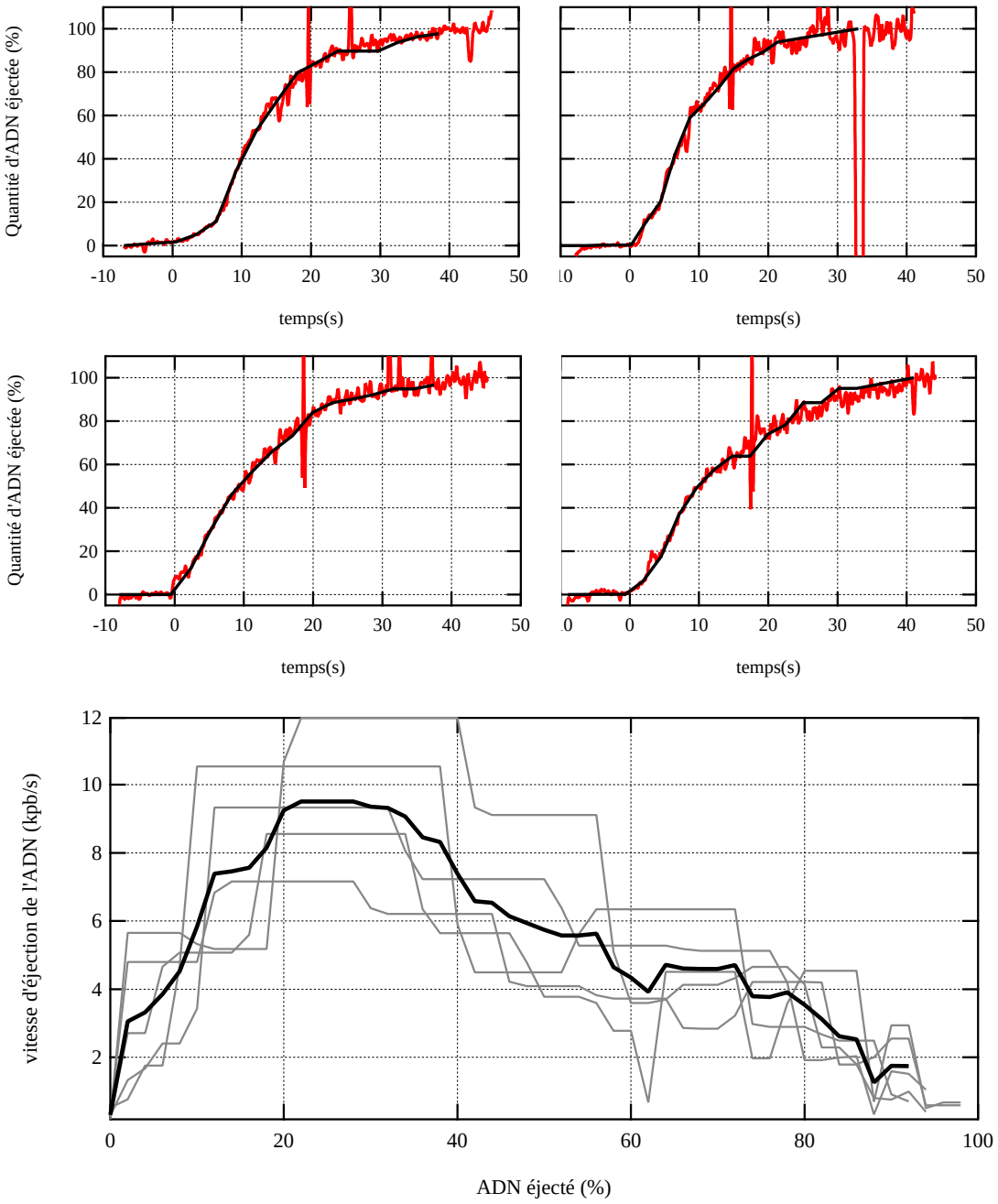



**Figure 10.5** – Cinétique d'éjection d'ADN des phages T5st(0) en présence de 10mM $MgSO_4$. Haut 4 courbes d'éjection d'ADN. Les courbes sont synchronisées de manière à ce que l'éjection débute à t=0. Bas : La courbe noire est la moyenne sur les 5 cinétiques d'éjection étudiées (courbes grises), de la vitesse d'éjection en fonction de l'ADN éjecté.

de l'ADN ne joue pas un rôle important dans l'éjection. Le rôle de ces nicks *in vivo* reste donc une question ouverte.

Indépendamment des nicks, notons tout de même qu'il est troublant que les pauses observées sur T5st(0) (N=7, $\approx$ 10% des éjections) soient localisées à 10% de l'ADN éjecté (figure 10.7). Nous n'avons pas d'explication pour cette localisation.

## 10.4 Discussion

Le nombre de Reynolds de l'écoulement de l'ADN est extrêmement bas ($R_e \approx 10^{-10}$). La vitesse est donc proportionnelle à la force motrice $f_{ej}$ d'éjection exercée localement par l'ADN dans la capside sur l'ADN hors de la capside. La mobilité $\mu$ est le coefficient de proportionnalité reliant cette force à la vitesse d'éjection $v_{ej}$ :

$$v_{ej} = \mu f_{ej}$$

$\mu$ traduit la mobilité locale de l'ADN à la sortie de la capside. Cette mobilité est constante, elle n'a pas de raison de varier avec la décompaction de l'ADN puisqu'elle traduit les propriétés hydrodynamiques extrêmement locales qui règnent à la sortie de la queue du phage.

Nous pouvons d'ors et déjà exclure l'idée selon laquelle $f_{ej}$ est égale à la force quasistatique $f_{quasistatique}$, force exercée à l'équilibre et calculée dans le chapitre 9 (et partie 9.3.1). Cette idée supposerait une variation monotone décroissante de la vitesse avec la quantité d'ADN éjecté, or la vitesse est faible lorsque l'éjection commence, elle atteint un maximum de $115 kbp.s^{-1}$ lorsque le tiers de l'ADN a été éjecté puis la vitesse d'éjection diminue graduellement jusqu'à devenir nulle à la fin de l'éjection.

### 10.4.1 Mobilité effective de l'ADN dans la capside

L'approche utilisée par P. Grayson [45, 46] traduit le comportement non monotone de la cinétique d'éjection par une mobilité effective variable de l'ADN. Dans cette approche, l'auteur suppose que la force d'éjection est égale à la force quasistatique, et relie ces deux variables par une mobilité effective $\mu_{eff}$ de l'ADN. $\mu_{eff}$ peut être calculée en divisant la vitesse d'éjection $v_{ej}$ par la force $f_{quasistatique}$ :

$$v_{ej} = \mu f_{ej} = \mu_{eff} f_{quasistatique}$$

$$\mu_{eff} = \frac{v_{ej}}{f_{quasistatique}}$$

La mobilité effective n'est pas une propriété locale comme $\mu$, mais une propriété globale qui englobe toute une série de phénomènes se produisant dans la capside :

- dynamique de reptation de l'ADN
- interaction entre l'ADN et la surface de la capside
- résistance hydrodynamique entre l'ADN et la queue
- résistance hydrodynamique due au mouvement relatif de glissement entre brins parallèles d'ADN

– résistance hydrodynamique liée à l'entrée d'eau dans la capside[7]

En suivant cette démarche, nous allons traduire les courbes vitesse d'éjection / quantité d'ADN éjecté en terme de mobilité effective de l'ADN. Pour cela, il faut diviser la vitesse d'éjection par la force d'éjection quasistatique à condition saline fixée. La force interne de l'ADN dans la capside n'est pas bien connue, puisque qu'aucune expérience d'encapsidation n'a pu être réalisée sur T5. Quant aux expériences de suppression osmotique sur T5 [74], elles montrent des résultats étranges, dont il est difficile d'obtenir des informations quantitatives. Nous allons néanmoins estimer cette force de deux manières différences, en supposant que $f_{quasistatique}$ ne dépende que de la fraction volumique en ADN :

– Force théorique : nous choisissons la force calculée dans le modèle semi empirique (figure 9.5)
– Force empirique : nous supposons que la force est identique à la force interne mesurée sur phi29 [40], à fraction volumique égale (figure 9.6).

Le premier cas sous estime la force interne (voir discussion paragraphe 9.5), tandis que le deuxième cas la surestime probablement (voir la différence entre la théorie, phi29 et lambda figure 9.6). Nous obtiendrons ainsi un intervalle raisonnable pour la mobilité effective de l'ADN dans la capside. Le résultat est montré figure 10.6, pour les conditions salines correspondant au tampon phage constitué majoritairement de contre-ions monovalents (voir annexe B) et pour le buffer constitué majoritairement d'ions divalents (10mM $MgSO_4$). En présence d'ions divalents, le calcul est effectué uniquement par rapport à la théorie à titre indicatif, mais il faut rester prudent sur son interprétation étant donnée la très forte incertitude sur les données de force à faible $\rho$ et la faible statistique sur les vitesses.

De manière générale, la mobilité effective est plus faible aux fortes concentrations en ADN dans la capside qu'aux faibles. Elle augmente d'un facteur 100 entre une capside pleine et une capside mi-pleine. Etant données les incertitudes sur la mesure de la mobilité en présence de $MgSO_4$, il est difficile de conclure sur les différences de mobilité observées selon le type de contre-ion. Dans les deux cas, on note une fraction volumique frontière $\rho \approx 0.35$, au delà de laquelle $\mu_{eff}$ diminue très fortement avec la concentration. Les valeurs obtenues à faible concentration en ADN ($\rho$<0.15) sont sujettes à d'énormes incertitudes : les forces sont faibles, les vitesses aussi. Ce qui nous rapproche d'une division de 0 par 0. Dans ce régime, le modèle théorique n'est pas valable car l'ADN est dans une configuration isotrope [75]. Ainsi le résultat obtenu en divisant la vitesse par la force empirique donne probablement une meilleure estimation. La mobilité effective pourrait ainsi tendre vers une constante aux faibles concentrations en ADN ($\approx$ 10kpb/s/pN).

Les données de cinétique d'éjection obtenues sur T5 sont semblables à celles obtenues sur le phage lambda [46, 45, 132]. Les vitesses d'éjection et les mobilités effectives sont du même ordre de grandeur, avec des valeurs comprises entre 1 et $10 kbp.s^{-1}.pN^{-1}$. Afin de mieux comparer T5 et lambda, il faudrait réaliser les expériences et traiter les données de manière similaire, ce qui n'a pas encore été fait.

7. Au cours de l'éjection, l'eau doit s'infiltrer dans la capside pour remplacer le volume d'ADN éjecté. La résistance hydrodynamique de l'entrée d'eau sera variable selon la perméabilité, la porosité de la capside. Dans le cas extrême où la capside serait totalement imperméable, l'eau doit se frayer un chemin à travers la queue du phage.

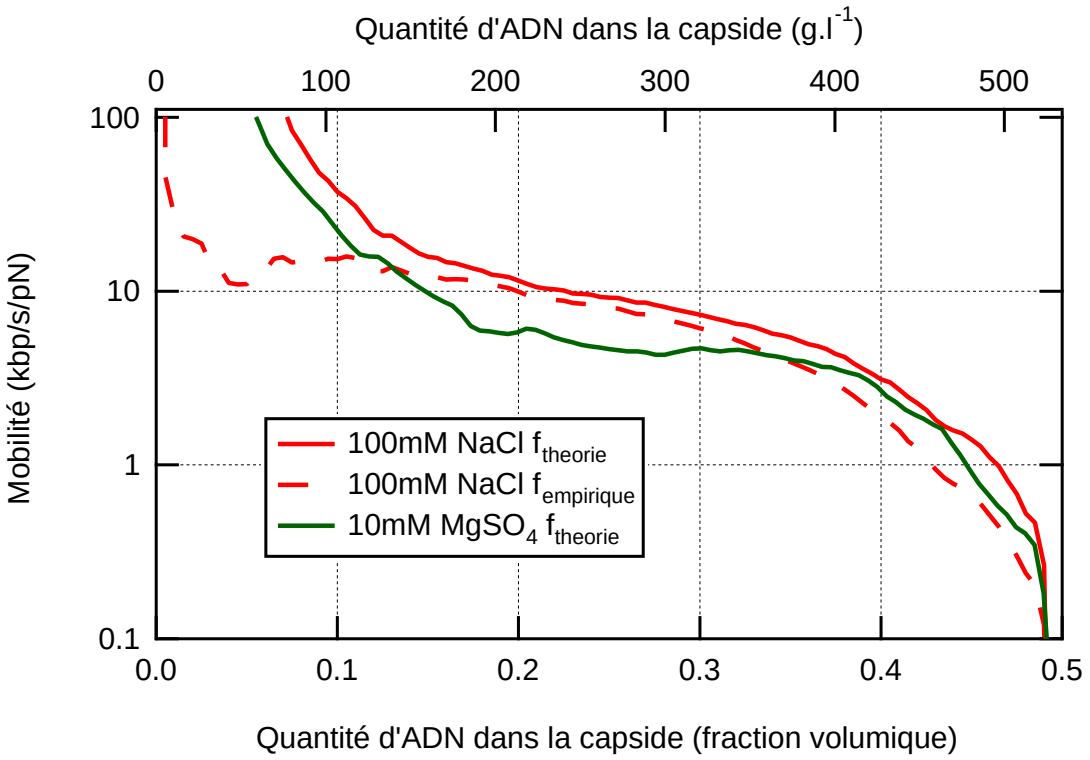



**Figure 10.6** – Mobilité de l'ADN du phage T5 dans sa capside en fonction de la fraction volumique en ADN dans la capside. Voir texte pour les informations 10.4.1.

### 10.4.2 Interprétation de la mobilité effective

Il est difficile d'interpréter le coefficient $\mu_{eff}$. Nous retiendrons que la variation de la mobilité effective (faible au début de l'éjection et qui augmente avec la décompaction de l'ADN), peut se comprendre en supposant que l'éjection est freinée par les interactions hydrodynamiques entre brins d'ADN dans la capside. [8]

Un modèle quantitatif de la mobilité effective a été proposé par P. Grayson en supposant des interactions hydrodynamiques de type milieu continu entre les brins d'ADN dans la capside. Cependant, ces modèles prédisent des valeurs de mobilité effectives $\approx 100$ fois supérieures à ce qui est mesuré [45]. D'autres facteurs doivent être pris en compte pour expliquer le fait que l'éjection soit beaucoup plus lente que celle prédite par les effets hydrodynamiques.

### 10.4.3 Une dynamique d'éjection hors équilibre ?

Afin d'expliquer que la force d'éjection $f_{ej}$ n'est pas égale à la force quasistatique $f_{quasistatique}$, nous proposons que la dynamique d'éjection de l'ADN *in vitro* relève d'un processus hors équili-

8. Une hypothèse alternative repose sur l'idée que la dynamique d'éjection est limitée par la capacité de l'eau à pénétrer la phase cristalline d'ADN. L'eau doit en effet s'infiltrer à travers la capside de phage et à travers l'ADN pour remplacer le volume d'ADN éjecté. Cette infiltration sera plus facile dans une phase d'ADN lâche que dans un cristal fortement condensée. La variation de la mobilité effective traduirait alors la modification de la "porosité" de l'ADN dans la capside. Cependant nous n'avons pas de moyen facile d'estimer cet effet.

bre. L'éjection de l'ADN s'effectue à "grande vitesse". En comparaison, les vitesses dans les expériences d'encapsidation sont $\approx$ 100 fois inférieures, et sont donc probablement quasistatiques. Les expériences de suppression osmotique mesurent directement des propriétés à l'équilibre.

Il est donc possible que lors de l'éjection, l'ADN n'ait pas le temps de visiter l'espace des conformations possibles à chaque fraction volumique. La dynamique pourrait alors être dominée :

- soit par la reptation de l'ADN,
- par la relaxation des nanodomaines d'ADN [75] (comportement collectif),
- par la dynamique des transitions de phases. Par exemple le passage d'un état cristallin à un état liquide cristallin lors de la transition entre un réseau hexagonal 3D à 2D est peut-être responsable de la faible vitesse initiale de l'éjection. Le seuil de croissance de la mobilité effective à $\rho = 0.35$, pourrait s'accorder avec cette hypothèse. [9]

Tous ces effets peuvent réduire $f_{ej}$ par rapport à $f_{quasistatique}$, s'ils s'effectuent plus lentement que le temps caractéristique de l'éjection.

Dans 10% des éjections observées, des pauses sont décelables (voir figure 10.7), la plus longue pause observée étant de 1 minute. Ces pauses ne peuvent être expliquées qu'en terme de dynamique hors équilibre, par exemple si la relaxation de l'ADN est bloquée.

A titre indicatif, une série d'expériences réalisées en présence d'une plus grande quantité de molécules fluorescentes intercalantes (concentration de Sybr Green I multipliée par 10) montre une augmentation drastique du nombre de ces pauses (voir figure 10.8). Bien que nous ne puissions pas expliquer l'origine exacte du phénomène, il est curieux de noter que ces pauses surviennent essentiellement au début de l'éjection, et qu'à partir de 60% d'ADN éjecté, la courbe vitesse d'éjection/quantité d'ADN éjecté se superpose aux expériences précédentes. Nous pensons qu'à de telles concentrations de Sybr Green I une faible quantité de molécules diffuse dans la capside et gêne la relaxation de l'ADN ; à partir du moment où le réseau d'ADN est suffisamment lâche, alors la dynamique de relaxation de l'ADN redevient identique à ce qui est observé en faible concentration de Sybr Green I.

## 10.5 Une éjection en boucle

Plus de 90% des éjections étudiées ont la forme décrite figure 10.9. Une molécule d'ADN courte ayant une fluorescence intense apparaît. Après une durée extrêmement variable, de quelques secondes à plusieurs heures selon les phages, la longueur de l'ADN double [10] et l'intensité de fluorescence par unité de longueur diminue. Mais l'intensité de fluorescence intégrée reste constante (figure 10.9). Cette observation s'explique bien si l'on suppose que la molécule d'ADN sort en boucle.

Au début de la translocation, l'extrémité de l'ADN reste attachée sur le phage. Au fur et

9. Une simulation numérique récente a montré que la mobilité de l'ADN dans la capside est très fortement réduite pour des fractions volumiques supérieures à 0.35 [99]. Les auteurs interprètent leur résultat en terme de transition vitreuse. Cette fraction volumique frontière s'accorde bien avec nos résultats expérimentaux.

10. En réalité, elle est plus que multipliée par 2 car la force appliquée par le flux augmente avec la longueur d'ADN étendue.

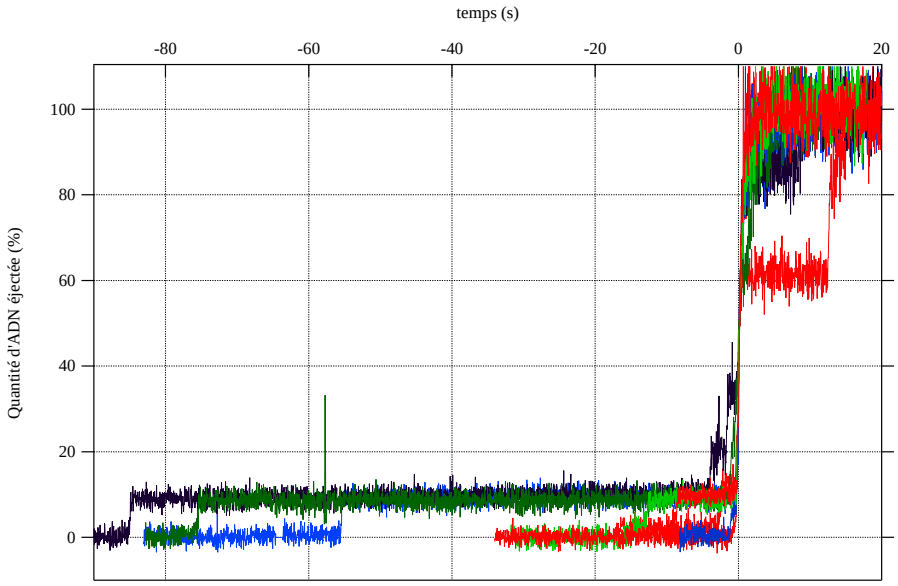



**Figure 10.7** – Cinétiques de translocation avec pauses. Les pauses se situent préférentiellement autour de 10% d'ADN éjecté. Quelques pauses autour de 5% d'ADN éjecté sont aussi décelables. La pause la plus longue observée est représentée sur le schéma. Toutes les éjections sont synchronisées de manière à ce qu'à t=0, 50% de l'ADN soit éjecté.

à mesure que le phage expulse son ADN, une boucle se forme et s'allonge rapidement. Une fois la translocation terminée, l'autre extrémité du génome reste accrochée au phage, ce qui nous permet d'observer une boucle de longueur bien définie. Il arrive parfois qu'une des deux extrémités de l'ADN se détache, la molécule d'ADN s'allonge alors entièrement dans le flux du buffer.

L'éjection en boucle est confirmée par la visualisation directe de la boucle d'ADN dans les films à 30 images par secondes au grossissement maximum (objectif 100x). Certaines fluctuations la font alors apparaître distinctement (figure 10.9).

Notons que cette éjection en boucle est aussi observée dans une étude récente sur le phage $\lambda$ [132]. Les auteurs de l'étude proposent que l'éjection en boucle ait un rôle physiologique qui est d'aider à la cyclisation du génome lors de l'infection. [11] En effet l'ADN du phage lambda présente deux courts fragments d'ADN simple brin complémentaires aux extrémités de son génome. Dans la capside, l'ADN est linéaire, mais grâce à ces bouts complémentaires, il se cyclise en quelques minutes *in vivo*, lors de l'infection.

Plusieurs travaux ont cherché à comprendre cette cinétique de cyclisation. Notamment, il a été montré que sous sa forme globulaire, l'ADN de lambda se cyclise beaucoup plus lentement qu'*in vivo*. Si l'ADN est condensé par la spermine, la réaction de cyclisation s'accélère drastiquement et devient compatible avec les valeurs *in vivo*[56, 57]. Les éjections en boucle qui ont été observées suggèrent que la réaction de cyclisation puisse aussi être accélérée par

11. L'hypothèse d'un artefact lié à la surface de la cellule de flux a été évoquée, mais les données combinées sur T5 et lambda rendent cette hypothèse moins probable : l'éjection en boucle est observée sur 3 chimies de surface différentes, dont une qui lie spécifiquement le phage $\lambda$. Toutes les éjections de T5 et environ 50% des éjections de $\lambda$ sont en boucle.

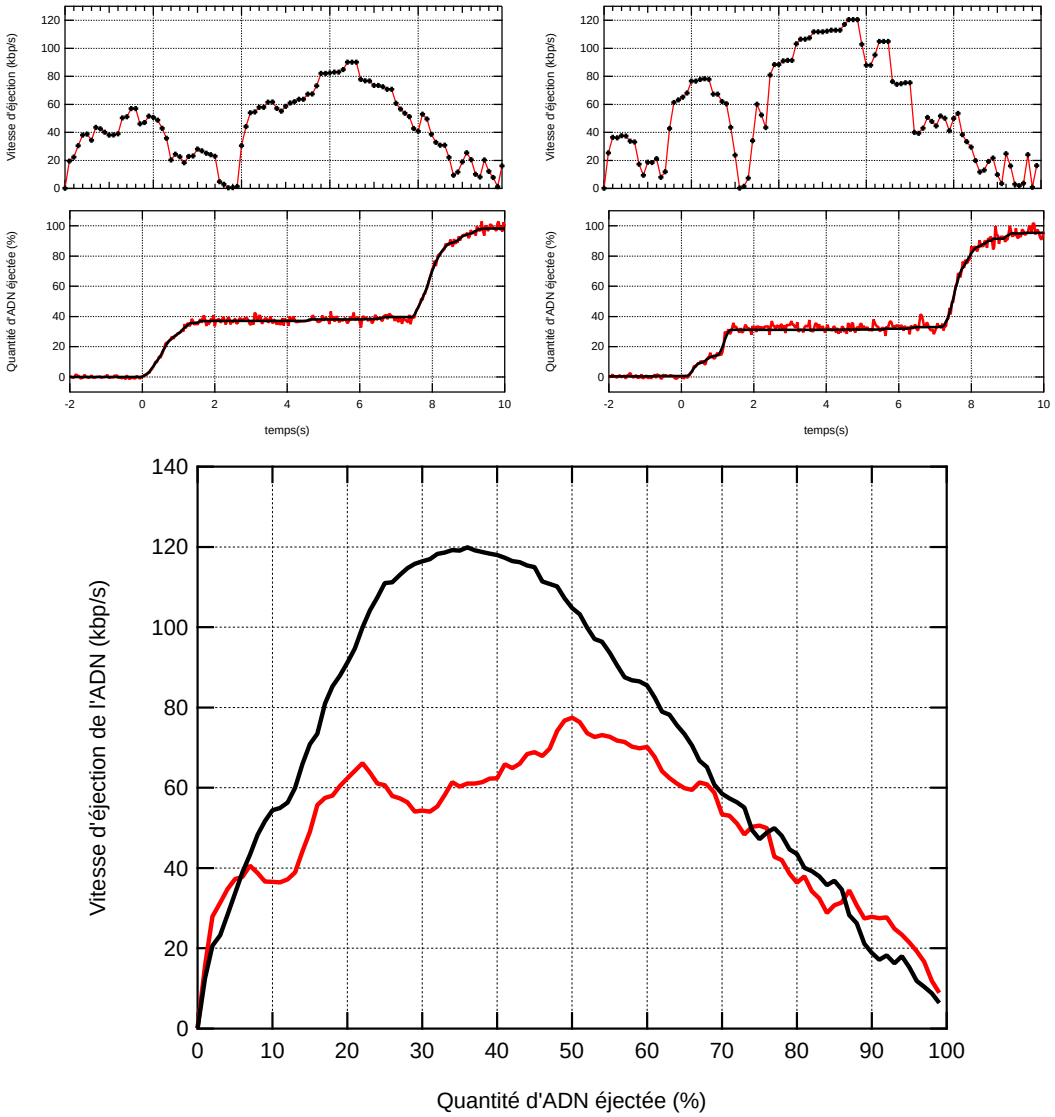



**Figure 10.8** – Cinétiques d'éjection en présence de Sybr Green I 10x. Haut : 2 courbes typiques d'éjection avec des pauses et calcul de la vitesse d'éjection associée. Bas : Moyenne, sur tous les évènements étudiés, de la vitesse d'éjection en fonction de la quantité d'ADN éjecté : en haute concentration en intercalant (N=62, courbe rouge), et en basse concentration (N=70, courbe noire, identique à la figure 10.4).

la proximité des extrémités du génome.

Nous ne pouvons évoquer un tel rôle physiologique pour T5, puisque son génome ne se cyclise pas lors de l'infection. Néanmoins l'éjection en boucle est peut-être un mécanisme de protection de l'extrémité du génome, le temps de l'infection.

## 10.6 Conclusion

Nous avons détaillé dans ce chapitre la dynamique de l'éjection de l'ADN *in vitro* pour T5. Elle révèle que l'ADN est faiblement mobile aux fortes concentrations volumiques d'ADN dans la capside, c'est-à-dire pour $\rho > 0.35$. Ce comportement est général puisqu'il est observé à la fois en présence de contre-ions monovalents, divalents, ainsi que pour un autre phage, le phage lambda [45, 132].
Nous proposons que la dynamique de l'éjection de l'ADN soit essentiellement un processus hors équilibre. Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer la baisse de mobilité aux fortes concentrations en ADN (reptation, transitions de phase, dynamique des nanodomaines d'ADN). L'observation de courtes pauses dans le processus d'éjection vient en appui de cette hypothèse.

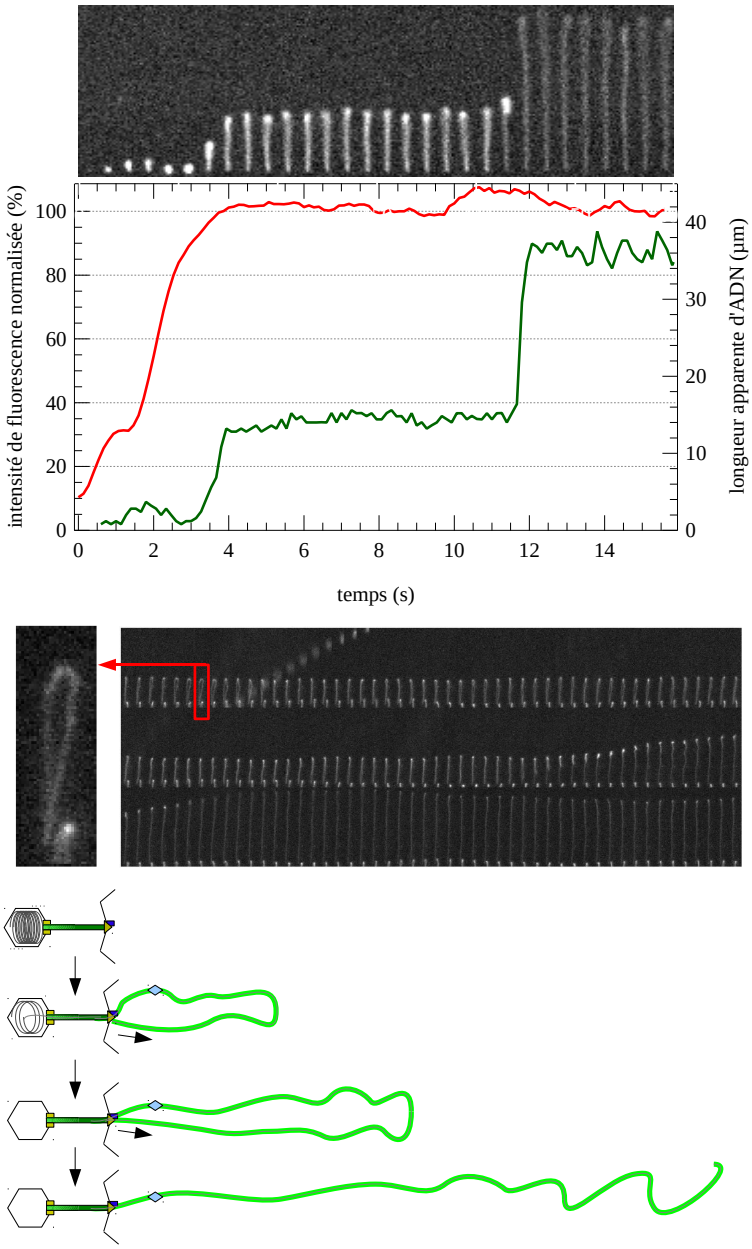



**Figure 10.9 –** Translocation du génome de T5 en boucle. Haut : kymographe montrant une translocation typique. A t=0 l'ADN commence à sortir du phage. L'intensité de fluorescence intégrée augmente alors rapidement (courbe rouge), pour atteindre un plateau à t=4s. La longueur apparente d'ADN (courbe verte) passe de 14$\mu$m à 36$\mu$m à t=12s, bien que l'intensité intégrée reste constante. Milieu : kymographe pris à 30 images par seconde montrant la boucle d'ADN et son allongement progressif dans le flux. Zoom : photo d'un instant où la boucle d'ADN peut être distinguée. Bas : modèle d'éjection en boucle ; l'extrémité de la molécule d'ADN s'accroche sur la surface pendant que l'ADN continue de sortir de la capside. Après détachement d'une des extrémités d'ADN la molécule s'étend totalement.

# Chapitre 11

# L' "infection" à travers une membrane lipidique : vers un système *in vitro* plus réaliste

Dans les chapitres 8 et 10 nous avons étudié le processus d'éjection de l'ADN *in vitro* provoqué par l'interaction du phage avec son récepteur membranaire purifié sous forme soluble. L'interaction entre le phage et son récepteur se produit donc dans un environnement différent de celui rencontré *in vivo* où la protéine est insérée dans la membrane externe d'*E. Coli*. Sans aller jusqu'à recréer un environnement aussi complexe que celui rencontré *in vivo* par T5, nous allons complexifier notre système *in vitro* en suivant le passage de l'ADN à travers une bicouche lipidique[1] dans laquelle FhuA a été introduite. De précédentes études ont montré la faisabilité de cette approche puisqu'il est possible de voir, par cryo EM, que T5 transfère spontanément son génome dans des protéoliposomes[2] contenant FhuA [100, 67, 66, 11]. Dans un registre différent, deux études d'électrophysiologie réalisées sur des membranes lipidiques planaires ont permis de montrer que, mis séparément, ni FhuA ni T5 ne créent de pores à travers la bicouche. Or, si des phages T5 sont ajoutés sur une membrane lipidique contenant FhuA, des pores de haute conductance (0.1nS à 1nS dans une solution à 100mM KCl) se forment, prouvant l'action combinée de T5 sur FhuA [12, 127].

## 11.1 Objectifs

Nous souhaitons détailler le mécanisme évoqué plus haut. Les études de cryo EM montrent que l'ADN est transféré dans les protéoliposomes contenant FhuA. Les études d'électrophysiologie confirment la formation d'un pore à travers la membrane ; il est raisonnable de penser que l'ADN de T5 traverse la membrane via ce pore. Des questions restent posées sur ce mécanisme : à quel moment ce pore est-il formé ? Lors de la fixation du phage sur FhuA ? Lors de l'éjection de l'ADN, après l'étape d'activation ? Ou bien entre ces deux évènements ? Imagi-

1. Pour la description de la structure des lipides et d'une bicouche lipidique, se référer à la partie 13.1 dans la partie protocole.
2. C'est-à-dire des vésicules lipidiques contenant des protéines membranaires.

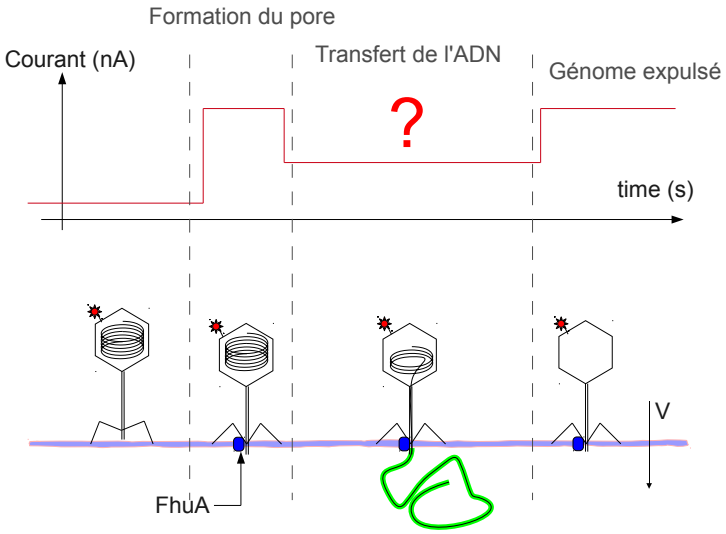



**Figure 11.1** – Un scénario possible pour le processus d'éjection à travers la membrane lipidique. T5 forme un pore dans la membrane (augmentation du courant) qui se bouche sous l'effet de l'éjection de l'ADN (diminution du courant et visualisation de l'ADN par fluorescence). Lorsque tout l'ADN est éjecté, la conductance du pore augmente à nouveau.

nons qu'un tel pore s'ouvre dans la bicouche lipidique et que l'ADN passe à travers ce pore. A cause de la présence de l'ADN, on s'attend à ce que le pore se bouche transitoirement, donc à une réduction du courant électrique. Comment expliquer que les études précédentes ne fassent pas état de telles fermetures transitoires ?

Pour répondre à ce paradoxe apparent, nous avons réalisé un montage permettant la mesure du courant électrique à travers une membrane et la visualisation simultanée de l'ADN éjecté par microscopie de fluorescence. L'analyse de ces deux signaux devrait permettre de mieux comprendre le processus. Un scénario probable est montré figure 11.1.

En outre, ce montage doit permettre de répondre à d'autres questions : la cinétique d'éjection est-elle la même en solution et à travers une membrane ? Peut-on reconstituer l'éjection caractéristique *in vivo* en 2 étapes (voir partie 7.5.2) ? Peut-on mimer la membrane externe en co-reconstituant la protéine avec des lipides et du lipopolysaccharide (LPS) et observer un effet sur la cinétique de fixation de T5 ? [3] Enfin nous pouvons, en théorie, étudier l'influence de certaines conditions asymétriques rencontrées par le phage lors de l'infection (potentiel membranaire, concentrations salines et agents condensants).

Ce projet a été effectué essentiellement pendant les 6 derniers mois de la thèse. Nous présentons dans cette partie les résultats expérimentaux qui concernent la mise au point du système d'éjection en membrane et du montage expérimental.

3. Le LPS est un lipide spécial lié de manière covalente à des sucres. Il est présent en grande quantité sur le feuillet externe de la membrane externe des bactéries gram- comme *E. Coli*. Des travaux (dont [51]) ont montré qu'il avait une forte influence sur la fixation de T5.

### 11.1.1 Membranes lipidiques : vocabulaire

Je désigne par vésicules unilamellaires, des membranes lipidiques fermées ($\approx$ sphériques) constituées d'une seule bicouche. Ces vésicules sont classées selon leur taille. Les "petites" vésicules unilamellaires (SUVs pour small unilamellar vesicles) ont un diamètre compris entre 40 et 100 nm. Les vésicules unilamellaires "géantes" (GUVs pour giant unilamellar vesicles) ont un diamètre compris entre 2 et 100 $\mu$m ; étant donnée leur grande taille, ces dernières sont particulièrement adaptées à la microscopie de fluorescence.

Les membranes lipidiques planes sont ouvertes. Elles sont attachées et donc délimitées par un orifice de taille micrométrique (de 1 à 200$\mu$m) qui sépare deux compartiments appelés cis et trans. Par l'ajout d'électrodes, le courant électrique passant à travers cette membrane peut être mesuré. De telles membranes sont généralement peintes sur l'orifice (BLMs pour black lipid membranes), comme celles que nous utilisons dans les expériences de translocation d'ADN à travers l'alpha hémolysine.

La méthode que nous utilisons pour former une membrane plane à partir d'une vésicule lipidique géante est détaillée dans la section 13.5.

## 11.2 Premiers déboires expérimentaux

L'idée la plus naturelle pour réaliser une expérience combinant optique et électrophysiologie aurait été de se baser sur le montage utilisé pour la translocation de molécules d'ADN à travers le pore de l'alpha hémolysine et qui permet d'observer la membrane lipidique tout en mesurant le courant électrique à travers le pore (voir 13.4). Cependant, tous nos essais furent infructueux. Voici un résumé des problèmes rencontrés :

Les membranes lipidiques peintes (BLMs) ne peuvent être formées avec des protéines. Il faut insérer FhuA après la formation de la bicouche. Or, la solution stock de FhuA contient du détergent. Le détergent permet de maintenir l'activité de FhuA mais il risque aussi de déstabiliser la bicouche. On ne peut donc pas se contenter d'ajouter la protéine en solution et d'attendre son insertion comme pour l'alpha hémolysine. Il est nécessaire d'effectuer une étape intermédiaire de reconstitution de FhuA dans de petits protéoliposomes, qui seront alors fusionnés avec la membrane peinte. La reconstitution de FhuA dans les petits protéoliposomes est relativement aisée (voir protocole 15.5.1), mais la fusion de ces protéoliposomes avec la membrane n'est pas facile. Différentes "ingrédients", comme l'ajout de calcium dans la solution tampon, l'application d'une différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane couplée à l'agitation de la solution dans les compartiments cis et trans[4] font partie de la recette pour faciliter les fusions. Mais FhuA n'est pas un pore ! Aucune activité n'est décelable pendant ces éventuelles fusions. Il faut ajouter T5 avant d'espérer obtenir des signaux électriques d'ouverture de canaux. Parmi nos essais, nous avons bien observé quelques signaux électriques, mais ils n'étaient pas suffisamment reproductibles, et ils étaient non corrélés à des signaux de fluorescence. Il était donc impossible d'en tirer des conclusions satisfaisantes.

Ce type d'étude en bicouche lipidique plane semble particulièrement difficile. Les auteurs

4. Il est très difficile de réaliser une agitation efficace dans notre dispositif.

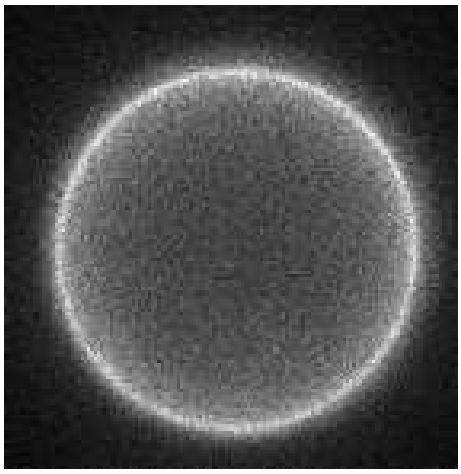


**Figure 11.2 –** Vésicule unilamellaire géante contenant FhuA (lipides DPhPC, m(FhuA)/m(DPhPC)=1%, protocole 15.5.2). La fluorescence de la vésicule provient des protéines membranaires FhuA qui ont été marquées par l'Alexa-568 (protocole 15.4).

de la deuxième étude sur T5 et FhuA [127] remarquent d'ailleurs qu'ils n'ont pas été capables de reproduire les expériences dans les conditions publiées auparavant [12].

Nous avons travaillé en parallèle sur la reconstitution des protéines FhuA dans des vésicules lipidiques géantes (GUVs). Ce système a montré des résultats reproductibles et convaincants. Les parties 11.3, 11.4.1 et 11.4.2 décrivent la reconstitution de FhuA dans les vésicules, ainsi que les études prouvant la fonctionnalité de FhuA, au moins en tant que récepteur de T5. La partie 11.5 décrit nos efforts pour réaliser des mesures de courant électrique et de fluorescence à l'aide de ces vésicules.

## 11.3 Reconstitution de FhuA en vésicule unilamellaire géante

Pour la formation de vésicules géantes avec FhuA, nous suivons la méthode publiée par Girard et coll [42]. Nous reconstituons d'abord FhuA en SUV (protocole 15.5.1) avant de former des GUVs par électroformation à partir de ces petites vésicules (protocole 15.5.2). FhuA a été marqué de manière fluorescente (protocole 15.4) afin de vérifier l'incorporation des protéines dans les vésicules. Sur la figure 11.2, nous voyons une vésicule produite avec ce protocole. La fluorescence observée provient des protéines insérées dans la membrane, la fluorescence homogène traduit la présence d'une grande quantité de protéines, conformément au protocole, bien qu'une quantification plus précise ne soit pas aisée.

## 11.4 Activité de FhuA dans les vésicules géantes

L'obtention de ces vésicules est une première étape, il faut vérifier la fonctionnalité des protéines dans les membranes.

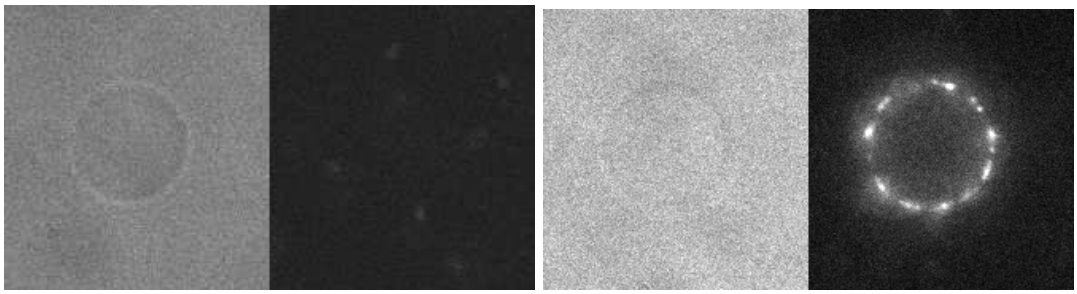


**Figure 11.3** – Spécificité de la fixation de T5 sur les vésicules contenant FhuA. Les vésicules ne sont pas fluorescentes. Seuls les phages sont marqués selon le protocole 15.3.1. Le tampon utilisé est le tampon phage et les phages sont concentrés à $10^9$ virus/mL dans la chambre. Gauche : vésicule lipidique EggPC sans FhuA (EggPC, cf protocole 14), visualisée en transmission et en fluorescence. Quelques points fluorescents (des phages marqués) diffusent rapidement en solution. Droite : vésicule lipidique EggPC+FhuA (1% m(FhuA)/m(EggPC), cf protocole 15.5.2), visualisée en transmission et en fluorescence. Les points fluorescents (phages) apparaissent fixés à la surface de la vésicule et diffusent sur celle-ci plus lentement qu'en solution.

### 11.4.1 Fixation spécifique des phages sur les vésicules géantes

Nous avons marqué les phages de manière fluorescente (protocole 15.3) et vérifié leur fixation spécifique sur les vésicules FhuA. Les phages ($10^9$ particules par mL) sont mis en présence de vésicules et sont introduits dans la chambre d'observation. A peine 30 secondes sont nécessaires pour voir apparaître de nombreux phages fluorescents diffusant à la surface des vésicules FhuA. En l'absence de FhuA, des phages fluorescents sont discernables en solution, diffusant beaucoup plus rapidement que sur la membrane, mais ils ne se fixent pas sur les vésicules (figure 11.3).

### 11.4.2 Insertion de l'ADN dans des vésicules géantes contenant FhuA

Nous constatons que la fixation des phages sur la membrane s'effectue en moins d'une minute lorsqu'ils sont introduits dans la chambre à la concentration de $10^9$ phages/mL. Si nous attendons plus longtemps (de quelques minutes à une heure), il est possible de voir des molécules d'ADN fluctuant à l'intérieur des vésicules (figure 11.4), signe du transfert de l'ADN à travers la membrane lipidique. [5] Il est intéressant de voir que, bien qu'ils fluctuent, les ADNs restent proches de la membrane. On est tenté de penser que le génome reste attaché par ses deux extrémités au phage, de la même manière que ce qui a été observé dans les expériences du chapitre précédent (10.5).

### 11.4.3 Perte d'activité de FhuA liée à sa reconstitution en GUV

Les résultats évoqués plus haut apparaissent satisfaisants qualitativement, mais il y a un problème quantitatif. En effet, FhuA est présent en très grande quantité dans la membrane,

5. Les ADNs dans la vésicule sont relativement bien marqués, le Yo-Pro-I parvient à passer à travers la membrane lipidique.

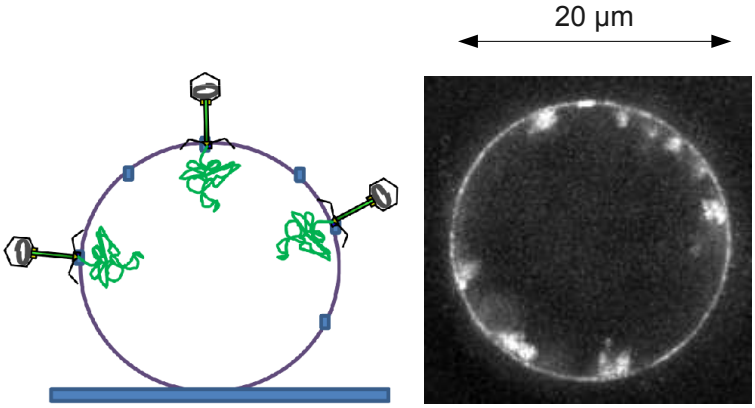



**Figure 11.4** – Visualisation par microscopie de fluorescence de l'ADN transféré dans une vésicule géante contenant FhuA (EggPC+FhuA (1% m(FhuA)/m(EggPC)). Droite : photo (projection maximale de fluorescence d'un film de 10 secondes) montrant $\approx$ 7 ADNs transférés et fluctuant à l'intérieur de la vésicule. Le tampon utilisé est le tampon phage + 1$\mu$M de Yo-Pro I qui diffuse à travers le vésicule et marque les ADNs éjectés. Les phages sont concentrés à $10^9$ virus/mL dans la chambre. La membrane lipidique apparait fluorescente car le Yo-Pro a commencé à diffuser dans les phages attachés à la surface de la vésicule qui n'ont pas éjecté leur ADN. Gauche : représentation schématique de la photo de droite.

comme le montre le marquage homogène de la vésicule fluorescente (figure 11.2). En comparaison, les phages qui se fixent sur la membrane sont très peu nombreux. Un calcul approximatif suggère qu'un phage se fixe pour environ 800 molécules de FhuA reconstituées pour les vésicules EggPC [6]. Ce n'est pas un problème cinétique puisque la fixation des phages sur les vésicules est très rapide (quelques minutes). Une heure d'attente supplémentaire ne montre pas une augmentation significative du nombre de phages fixés.

Certes, on s'attend à ce que FhuA s'oriente de manière équiprobable dans un sens ou dans l'autre dans la membrane, et donc à une perte d'activité d'un facteur 2. Mais comment expliquer un facteur 800 ? Plusieurs hypothèses sont possibles :

- Perte d'activité liée au marquage fluorescent de FhuA
- Perte d'activité liée à la reconstitution de FhuA dans les SUVs
- Perte d'activité liée à l'électroformation des GUVs FhuA

Nous avons testé l'activité des molécules de FhuA après leur marquage fluorescent (voir section 15.4) ; si perte d'activité il y a, elle est au maximum d'un facteur 4. La perte d'activité liée à la reconstitution dans les SUVs est, elle aussi, peu probable. [7] Le plus probable est que l'activité de FhuA soit perdue pendant l'électroformation des vésicules géantes (protocole 15.5.2). En

6. Le rapport massique de FhuA par rapport aux lipides est de 1%. Or M(FhuA)=80kg/mol et M(lipides)$\approx$0.8kg/mol. En nombre de molécules, il y a donc 10 000 fois plus de lipides que de protéines. Un lipide occupe une surface environ égale à $0.5nm^2$ dans une membrane lipidique. En divisant par 2 pour tenir compte de la double couche, cela signifie qu'il y a une molécule de FhuA pour une surface membranaire de $2500nm^2 = 2,5.10^{-3}\mu m^2$. Pour une surface d'un micron carré, cela fait 200 molécules de FhuA actives (sens d'insertion aléatoire). En supposant qu'un phage se fixe sur une molécule de FhuA, il devrait y avoir 200 phages par micron carré. Or nous observons environ 10 phages sur une surface de 40 micromètres carré. Il y a donc une différence d'un facteur 800 (200*40/10) avec l'activité attendue. L'activité est encore inférieure pour les vésicules DPhPC (facteur 3-4 par rapport à EggPC).

7. Cette méthode est très utilisée. Les études de cryo EM montrent une quantité de phages adsorbés très grande par vésicule.

effet, la concentration en sel est très basse pendant l'électroformation ([NaCl]<1mM), ce qui peut déstabiliser les protéines de manière générale, donc FhuA.

Nous avons aussi observé une influence du type de lipide utilisé pour la reconstitution. FhuA a du mal à s'insérer dans les lipides DPhPC, qui sont des lipides classiques utilisés pour former des membranes lipidiques peintes. Les lipides EggPC sont plus faciles à utiliser pour les reconstitutions, mais ils sont moins robustes pour l'électrophysiologie. L'effet du type de lipide est probablement secondaire par rapport au problème de salinité pendant l'électroformation.

Pour confirmer cette hypothèse, il faudra essayer d'électroformer les vésicules à plus haute concentration en sel. Le rendement de formation des vésicules sera probablement moins bon, mais il existe maintenant plusieurs protocoles publiés [103, 90] montrant que l'électroformation de vésicules à des concentrations de sel relativement élevées est possible.

## 11.5 Réalisation d'un dispositif de mesure optique et électrophysiologique à partir de vésicules unilamellaires géantes (GUVs)

Malgré cette perte d'activité, le dispositif en GUV a été le seul permettant l'observation de la fixation de T5 sur une membrane lipidique. Nous avons donc essayé de former des membranes planes à partir de ces vésicules pour mesurer le courant électrique pendant la fixation du phage et l'éjection de l'ADN à travers la membrane.

Le principe de la technique est illustré figure 11.5. La mise au point de cette technique a constitué une partie importante de la thèse. Elle est détaillée dans la partie protocole (13.5). Grâce à cette méthode, nous pouvons donc obtenir, à partir de vésicules géantes, des membranes de 10 microns de diamètre ayant une résistance électrique de plusieurs centaines de MΩ.

### 11.5.1 Mesure de la diffusion des phages sur une membrane

Nous pouvons voir, grâce à notre dispositif et au marquage fluorescent des phages (protocoles 15.3), des particules virales attachées à la membrane plane et diffusant librement sur celle ci. [8] La figure 11.6 montre une photo de la membrane où l'on peut voir trois phages fluorescents sur la membrane lipidique ainsi que l'augmentation de l'espace visité par les phages au cours du temps.

Le suivi des trajectoires de diffusion des phages sur la membrane a permi de trouver un coefficient de diffusion $D$ égal à $2.6 + -0.3 \mu m^2.s^{-1}$. Ce coefficient a été trouvé en ajustant $< (\overrightarrow{P}(t) - \overrightarrow{P}(t-\tau))^2 >_t$ par la droite $D\tau$, où $\overrightarrow{P}(t)$ est la position d'un phage sur la membrane

8. La diffusion des phages est beaucoup plus faible lorsqu'ils sont attachés à la membrane que lorsqu'ils diffusent en solution. Ce résultat s'explique par le fait que la diffusion est limitée non pas par les phages, mais par la diffusion des protéines insérées dans la membrane. C'est la viscosité de la bicouche lipidique qui limite la diffusion des protéines.

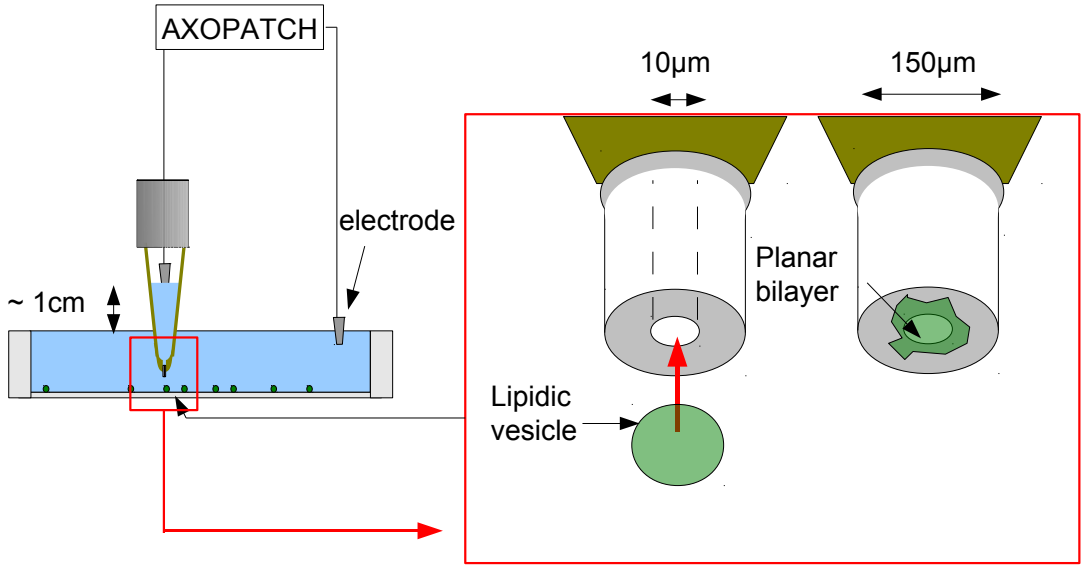



**Figure 11.5** – Principe de la formation de membranes dans le montage expérimental. Des vésicules géantes sont réparties à la surface de la chambre de microscopie. Une pipette verticale est déplacée au dessus d'une de ces vésicules. Droite : lorsque la vésicule rentre en contact avec le capillaire, elle éclate et recouvre la pipette. Deux électrodes et un amplificateur permettent de suivre le courant électrique à travers la pipette. Cette configuration permet aussi de suivre le processus au microscope.

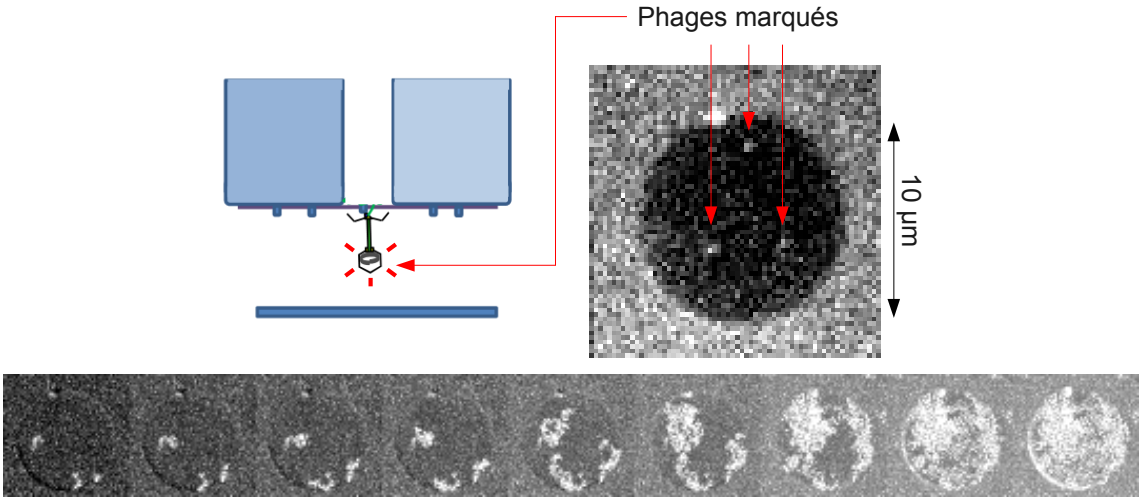



**Figure 11.6 –** Visualisation de la diffusion de trois phages sur une membrane plane (diamètre = 10 microns). La membrane plane est formée sur un capillaire selon le protocole 13.5 (tampon phage + 1$\mu$M Yo-Pro I + protection à la caséine pour augmenter la stabilité de la bicouche) à l'aide de vésicules géantes contenant FhuA (lipides DPhPC, m(FhuA)/m(DPhPC)=1%, protocole 15.5.2). Les phages T5st(0), marqués à l'aide de Yo-Pro I (protocole 15.3.1), sont ajoutés dans la chambre de microscopie à la concentration de $10^9$ particules par ml.

à l'instant $t$. Le coefficient de diffusion des protéines membranaires dans les membranes EggPC est d'environ $4\mu m^2.s^{-1}$ à 20°C et il est quasi indépendant de la taille de la protéine membranaire [107]. Dans notre cas le coefficient de diffusion est plus petit. On peut invoquer deux raisons pour expliquer cette différence :

- les lipides utilisés ne sont pas des lipides EggPC mais des DPhPC
- la protéine membranaire FhuA reste reliée au phage qui 'freine' sa diffusion. Le phage peut être assimilé à une sphère de 50nm de rayon. Le coefficient de diffusion de cette sphère seule est d'approximativement $kT/(6\pi\eta r) \approx 4\mu m^2.s^{-1}$.

Des expériences complémentaires de FRAP [9] sur FhuA pourraient permettre d'éclaircir la contribution due à FhuA de celle due au virus.

Notons aussi que l'observation de la présence de trois phages fixés illustre la faible activité de FhuA dans la membrane. En effet, une grande quantité de FhuA est insérée dans la membrane (fluorescence homogène des protéines FhuA marquées). Cependant, seuls 3 phages s'accrochent à la membrane. Pourtant, la quantité estimée de molécules de FhuA sur cette membrane plane de 10 microns est estimée à 10 000.

### 11.5.2 Suivi de l'éjection

Malgré la difficulté inhérente à la faible activité des FhuA, nous avons pu observer une éjection d'ADN par fluorescence en suivant simultanément le courant électrique à travers la membrane.

Le suivi de l'éjection de l'ADN du phage est montré figure 11.7. Nous observons une

9. Fluorescence Recovery After Photobleaching.

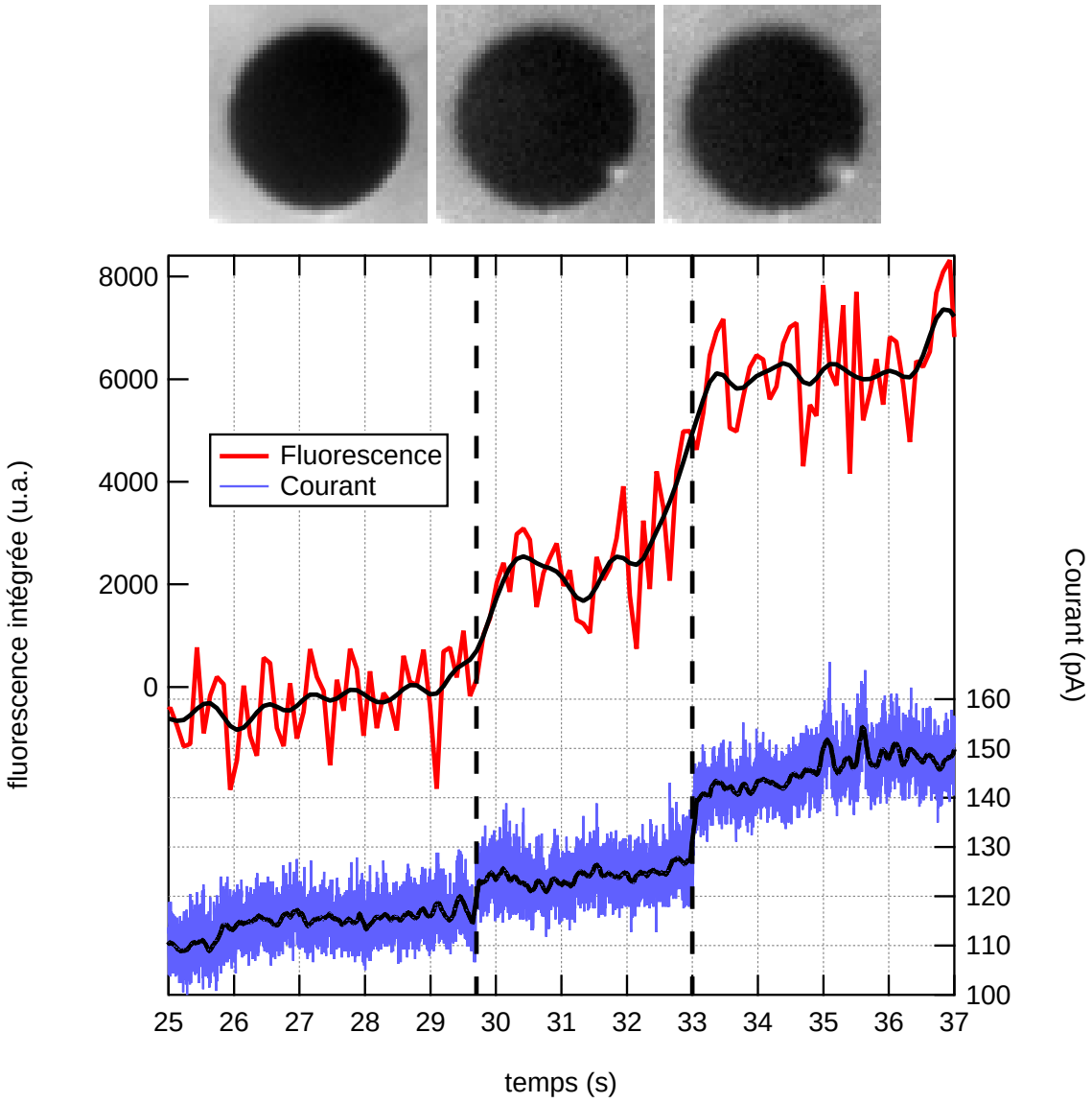



**Figure 11.7** – Suivi par fluorescence et électrophysiologie d'une éjection de l'ADN d'un phage unique sur une membrane plane de 10 microns de diamètre. 20mV sont appliqués de part et d'autre de la membrane. Le tampon utilisé est le tampon phage + 1$\mu$M Yo-Pro I pour marquer l'ADN éjecté (point fluorescent apparaissant sur la circonférence de la membrane). La membrane plane est formée sur un capillaire selon le protocole 13.5, sans protection à la caséine, à l'aide de vésicules géantes contenant FhuA marqué à l'Alexa (lipides DPhPC, m(FhuA)/m(DPhPC)=1%, protocole 15.5.2, protocole de marquage de FhuA : cf partie 15.4). Les phages T5st(0) sont ajoutés dans la chambre de microscopie après formation de la membrane plane à la concentration de $10^9$ particules par mL.

augmentation de fluorescence concomitante à un accroissement de courant électrique. En trois secondes, la fluorescence augmente jusqu'à une valeur limite et, lorsque cette valeur est atteinte, le courant augmente à nouveau brusquement. Cette observation est cohérente avec l'ouverture d'un canal permettant l'éjection immédiate de l'ADN (et un passage partiel du courant) puis à la libération du canal suite à l'expulsion complète de l'ADN (cf figure 11.1 dans le cas où le pic de formation du pore serait imperceptible). La valeur du saut total de courant (environ 30pA à 20mV à 100mM NaCl) est en accord avec les études précédentes d'électrophysiologie, et le délai de trois secondes nécessaire à l'éjection de l'ADN dans le tampon phage est en accord avec les mesures du chapitre 10.

Indéniablement, ce résultat reste à confirmer. Le problème majeur pour répéter ce résultat provient, dans l'état actuel des choses, de la faible efficacité de reconstitution de FhuA en vésicule géante.

# Chapitre 12

# Discussion

## 12.1 Principaux résultats

Voici un résumé des principaux résultats de nos études *in vitro* :

- En solution, la fixation de FhuA sur T5 s'effectue de manière irréversible avec une constante d'association typique d'une interaction spécifique protéine-protéine ($3.10^6 M^{-1}.s-1$).
- Après la fixation de FhuA, il existe une étape d'activation qui est cinétiquement limitante *in vitro*. Elle dure environ 4 minutes à 37°C.
- L'étape d'éjection de l'ADN est continue et rapide, d'une durée de quelques secondes. Sa cinétique est contrôlée par la pression intracapside, comme l'atteste l'influence de la nature des contre-ions (3 secondes en présence de contre-ions monovalents majoritaires, 30 secondes en présence d'ions divalents uniquement). La vitesse d'éjection n'est pas monotone. Elle est lente lorsque la fraction volumique d'ADN dans la capside est élevée.
- T5 éjecte son ADN en boucle hors de la capside.
- L'éjection de l'ADN n'est pas modifiée par la présence ou l'absence de nicks *in vitro*.
- Le processus d'éjection peut être reconstituée à travers une membrane et, qualitativement, on retrouve les mêmes résultats que pour le processus d'éjection en solution : la fixation des phages sur la membrane est irréversible et rapide, l'étape d'activation est lente, et l'éjection de l'ADN rapide.
- A travers une membrane, l'ADN est éjecté mais il reste à proximité de la membrane. Il reste probablement accroché au phage de la même manière que ce qui est observé sans membrane.
- Probablement, un pore se forme à travers la membrane de manière concomitante à l'initiation de l'éjection de l'ADN.

Les nicks ne semblent pas jouer de rôle important dans l'éjection de l'ADN *in vitro*. Du point de vue du cycle de T5 *in vivo*, les expériences *in vitro* n'ont pas permis de révéler l'origine de l'éjection en deux étapes de T5. L'injection en deux étapes et le rôle des nicks ne sont probablement pas corrélés et le rôle des nicks reste incompris. La nickase a été identifiée sur le génome de T5. Sa caractérisation fonctionnelle *in vitro* est en cours (P. Boulanger et M. de Frutos) qui devrait permettre d'appréhender son rôle *in vivo*.

## 12.2 Rôle biologique de la pression intracapside

Ce travail s'inscrit dans une série de travaux qui ont montré l'importance et l'intérêt biologique de la compaction de l'ADN dans les capsides de phages et de la pression qui en résulte. Le rôle de la pression intracapside a pu être montré *in vivo*, notamment son influence en ce qui concerne la stabilité et l'infectivité des bactériophages.

La pression a un rôle dans la **stabilité** des phages :

- De Paepe et coll. ont montré que la mécanique de la capside et de sa pression interne explique en grande partie la stabilité des phages [98]. A titre d'illustration, les virus sont plus stables dans le temps lorsque, à capside identique, leur génome est plus petit (la capside est moins dense). C'est probablement la raison pour laquelle le mutant T5st(0) est "thermostable". Il présente une délétion génétique importante qui réduit sa pression intracapside ce qui explique en partie sa robustesse.
- Les phages ayant des longs génomes, comme T5, requièrent la présence d'un minimum d'ions $Mg^{2+}$ pour leur stabilité, ce qui est peut-être dû à la réduction de la pression intracapside qui en résulte.

La pression intracapside a un rôle dans l'**infectivité** des phages :

- Chez le phage lambda, l'étude de Feiss et coll.[37] a montré qu'il existe une limite supérieure à la quantité d'ADN pouvant être encapsidée, au delà de laquelle les virus ne peuvent être produits, faute d'encapsidation efficace. La taille de la capside étant fixe, on s'attend effectivement à ce résultat. Mais les auteurs ont montré, de plus, que pour des génomes trop courts, il existe un seuil très net où des particules virales sont produites mais ne sont pas infectieuses et ce, indépendamment de l'absence de gènes nécessaires à la reproduction du virus. L'hypothèse la plus probable est que l'infection n'a pas lieu car la pression intracapside est insuffisante pour éjecter le génome. Les auteurs trouvent une diminution nette de l'infectivité à partir de $\rho < 0.37$ et une absence d'infectivité pour $\rho < 0.34$. Le milieu de culture utilisé est riche en magnésium (10mM) ; on peut donc s'attendre à ce que ces fractions volumiques correspondent à des pressions de l'ordre de 5 atmosphères.
- Une étude récente de suivi d'infection à l'échelle de bactéries uniques [62] montre une diminution de l'infectivité avec la baisse de la pression intracapside, soit par ajout d'agents condensants (spermine), soit par diminution de la taille du génome. Les effets mis en évidence dans cette étude sont très faibles comparativement aux données de Feiss [37]. Probablement, l'ordre de grandeur des pressions testées n'est pas aussi large que dans l'étude précédente. Le suivi à l'échelle de bactéries uniques permet toutefois d'observer des effets intrigants, comme un nombre important de cellules qui arrêtent de croître sans pour autant être lysées. Ces cellules seraient passées inaperçues avec d'autres méthodes.

Ce rôle de la pression a aussi été contesté. Par exemple, il est démontré, dans le cas du bactériophage T7, que le transfert du génome dans le cytoplasme est un processus lent ($\approx 100 pb.s^{-1}$) et actif. Le génome est "tiré" par une ARN polymérase[88].

Les mécanismes actifs et passifs ne sont pas incompatibles. Une possibilité pour combiner ces deux mécanismes est de supposer que la pression n'est nécessaire qu'à l'initiation de l'infection. Sitôt qu'une portion d'ADN suffisamment grande est présente dans le cytoplasme, un phénomène actif tel que celui existant pour T7 peut prendre le relais. C'est d'ailleurs

aussi le cas pour T5 : l'entrée de l'ADN FST est passive et celle de l'ADN SST est active. [1] Indépendamment d'un mécanisme actif, il a aussi été suggéré que l'environnement cellulaire crée une pression osmotique qui pourrait condenser spontanément l'ADN, de la même manière que ce qui est décrit dans les expériences *in vitro* section 9.3.1.1. Cette condensation pourrait être un moteur pour la fin du transfert du génome [58].

P Grayson et I. Molineux ont aussi proposé un modèle de "chasse d'eau" ("toilet flush model"), dans lequel l'ADN du phage serait "aspiré" hydrodynamiquement par un flux d'eau passant à travers le pore d'infection.[44, 45] [2]

Malgré l'observation de capsides extrêmement denses chez tous les phages caudés, qui laisserait supposer un mécanisme "universel" d'infection, il n'y a pas, pour le moment, de consensus général sur ce sujet. Si la physique de l'ADN condensée est la même pour tous les phages, il n'est pas dit que cela se traduise par un mécanisme d'infection "universel" des phages caudés. Finalement les différents phages montrent des mécanismes d'infection assez variés, et l'on peut s'attendre à ce que cette diversité croisse avec le nombre d'études sur les phages, étant donné que les études sont centrées sur un petit nombre de phages modèles qui sont loin de refléter toute la diversité du vivant.

### 12.2.1 Perspectives *in vitro*

Concernant T5, la reconstitution du processus d'éjection de l'ADN à travers une membrane et son suivi par microscopie de fluorescence ouvre des perspectives intéressantes *in vitro*.

Dans un premier temps il s'agit de terminer les études déjà évoquées dans cette thèse, après avoir augmenté l'efficacité de reconstitution de FhuA :

- Le pore membranaire s'ouvre t'il bien lors de l'éjection de l'ADN (et non lors de l'association de T5 à FhuA) ?
- L'ADN reste-t-il lié au phage ? Est-il éjecté en boucle ?
- La cinétique d'association, d'activation et d'éjection est-elle différente dans une membrane de celle nous avons observée en solution ?
- Le potentiel membranaire influe-t-il fortement sur l'éjection ?

Plusieurs nouvelles questions se posent qui portent sur la mécanique de fixation, d'activation et d'éjection. Notamment en ce qui concerne la reconstitution d'un environnement qui se rapprocherait d'une enveloppe bactérienne.

- **Influence du LPS**. Un prolongement naturel du montage serait l'étude de l'influence du LPS (et des différents type de LPS) sur la fixation de T5. Est-il possible d'observer une fixation temporaire réversible du phage sur la membrane, en absence de FhuA ? Le LPS accélère-t-il l'association entre T5 et FhuA ?
- **Influence de la double bicouche** Je suggère deux expériences pour reconstituer la double membrane de l'enveloppe d'*E coli*.
  - Il est notoire que l'on peut former des vésicules multilamellaires lorsque l'on fabrique

1. Le transfert de l'ADN de T7, ainsi que le transfert de l'ADN SST de T5 n'ont pas lieu si la bactérie est desénergisée.

2. la bactérie E coli n'est pas en équilibre osmotique avec l'extérieur. L'eau afflue à travers les pores, simplement lors de la croissance de la bactérie. L'idée développée est que, lorsqu'un pore est créé, l'eau afflue à travers ce pore car le phage n'est pas à l'équilibre osmotique. Ce flux crée une force qui pourrait avoir le même ordre de grandeur que la force osmotique.

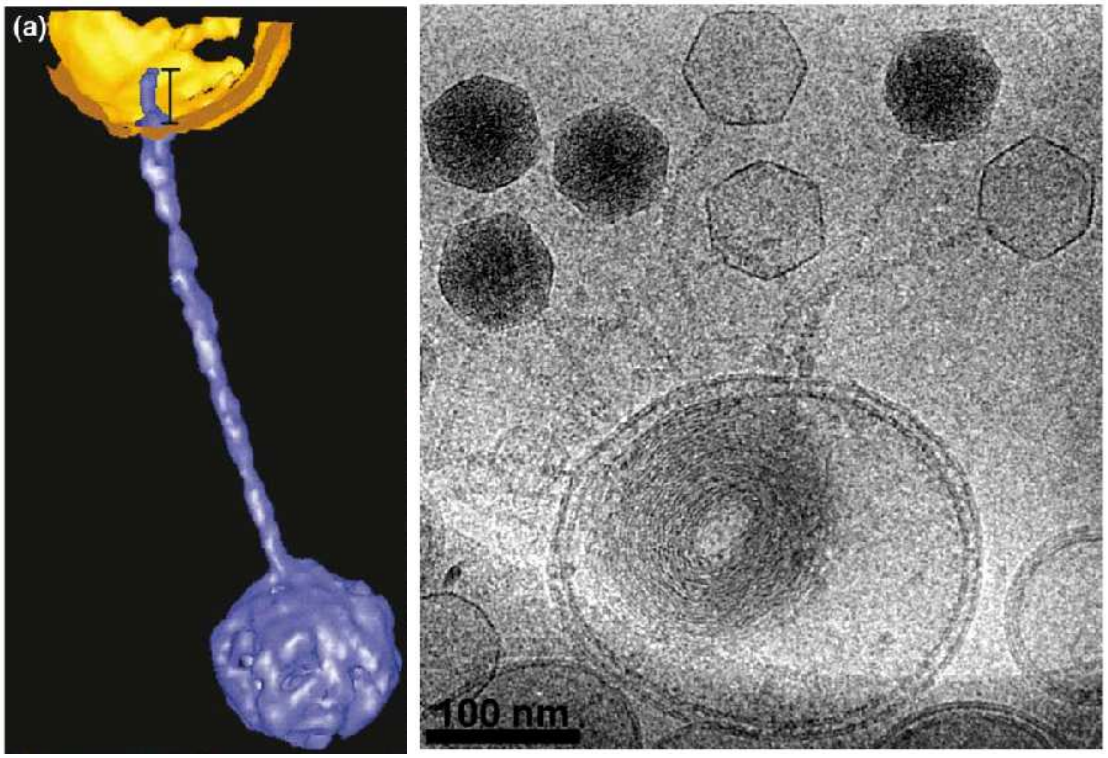



**Figure 12.1** – Gauche : phage T5 (violet) traversant la membrane lipidique du protéoliposome FhuA (jaune), une protrusion de 23 nm dépasse de la membrane lipidique. Droite : plusieurs phages injectent leur ADN à travers deux membranes lipidiques séparées de 10nm. Adapté de [11].

des GUVs. Habituellement nous cherchons à les éviter. Ici, il serait au contraire intéressant de les caractériser (par exemple en quantifiant la quantité de lipides par fluorescence) afin de voir si l'éjection peut avoir lieu à travers ces vésicules plurilamellaires.

– Je suggère une expérience plus complexe qui permettrait de contrôler la distance entre deux membranes. Il est possible de tirer des tubes de membranes à partir de vésicules géantes et de contrôler le rayon de ces tubes. Il doit être possible de voir l'éjection de l'ADN dans les tubes de grand rayon. Peut être qu'il existe un rayon seuil à partir duquel le phage transpercerait le tube de part en part de la membrane et éjecterait l'ADN en dehors du tube. En guise d'illustration, nous pouvons voir sur la figure 12.1, des données de cryo EM issues de [11] qui montrent à la fois une protrusion de 24 nm dans la vésicule formée par la partie distale de la queue du phage et plusieurs phages capables d'injecter leur ADN à travers deux bicouches espacées de 10nm. .

## 12.3 Et *in vivo* ?

L'étude de l'infection par les phages *in vivo* est un sujet extrêmement vaste. Le développement de technique de marquage de phages uniques ainsi que la possibilité de suivre la croissance d'une population de bactéries à l'échelle de la bactérie unique pourrait permettre de révéler certains aspects insoupçonnés de l'infection. Les bactéries ont une organisation et une structure complexe. Leur morphogénèse fait l'objet de nombreux travaux ([84] pour une revue). A

titre d'exemple un travail d'Edgar et coll. montre que l'infection d'*E coli* par le phage lambda s'effectue préférentiellement aux pôles cellulaires [30]. Ce lien entre architecture cellulaire et infection fait partie des nombreuses questions qui restent en suspens.

# Troisième partie

# Protocoles

# Chapitre 13

# Protocoles formation de bicouches planes

Je présente dans ce chapitre deux méthodes de fabrication de bicouches lipidiques planes. La première méthode, présentée dans la partie 13.4, est la technique classique de formation par "peignage" découverte par Mueller et coll. [91] en 1962. La deuxième technique, présentée dans la partie 13.5, est une méthode originale de formation de membrane plane à partir de vésicules lipidiques géantes. Cette méthode a été développée pendant la thèse.

## 13.1 Structure des bicouches lipidiques

Les bicouches lipidiques sont constituées de lipides qui sont des molécules amphiphiles possédant une partie hydrophile, la tête polaire, et une partie hydrophobe formée d'une ou plusieurs chaînes carbonées. En solution aqueuse, les parties hydrophobes sont insolubles. La molécule se place de manière à orienter sa partie hydrophile vers le milieu aqueux et de façon à protéger les chaînes hydrophobes de l'eau pour minimiser l'énergie du système. Les lipides que nous utilisons s'arrangent sous forme de bicouches car ils ont une géométrie quasi cylindrique (voir figure 13.1). L'épaisseur de la bicouche varie de 5 à 7nm. L'aire occupée par la tête polaire est de l'ordre de $0.5nm^2$.

## 13.2 Lipides utilisés

– **L-$\alpha$-PhosphatidylCholine (Egg, Chicken : EggPC)**. Les phosphatidylcholines sont les constituants majeurs des membranes biologiques. Ces lipides sont formés à partir d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux acides gras. Ils sont facilement purifiables à partir d'œufs ou de soja. Les lipides extraits ne sont pas homogènes. Ils varient par la longueur de leurs chaînes carbonées (de 14 à 22 carbones) ainsi que par leur degré d'insaturation (de 0 à 4 insaturations par lipide). Le lipide prédominant ($\approx$ 30%) de ce mélange est montré figure 13.1. Ces lipides forment une membrane fluide à température ambiante.

– **DiPhytanoyl-PhosphoCholine (synthetic : DPhPC)**. Nous utilisons surtout les lipides DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) pour former des bicouches lipidiques planes. Ces lipides ont un double avantage. D'une part, il est possible de les obtenir par synthèse chimique de manière extrêmement pure. D'autre part ils sont entièrement saturés ce qui leur confère une grande résistance à l'oxydation. Les groupements méthyls greffés le long de leur chaîne carbonée (cf figure 13.1) leur permettent de garder une fluidité membranaire à température ambiante [79, 64].

Nous nous fournissons chez Sigma-Aldrich pour les lipides EggPC (ref n°P3556) et chez Avanti Polar Lipids pour les lipides DPhPC (ref n°850356P).

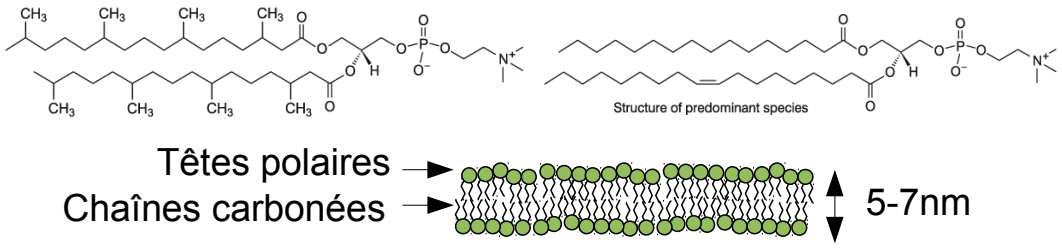



**Figure 13.1** – Structures chimiques des lipides DPhPC (gauche) et de l'espèce prédominante des EggPC (droite) reproduits du site d'Avanti Polar Lipids. Bas : représentation schématique des lipides ordonnés dans une membrane.

## 13.3 Indications générales pour la manipulation des lipides

Les lipides sont souvent livrés et conservés dans des solvants organiques (hexane, chloroforme). Les micropipettes et les cônes en plastique habituellement utilisés pour les solutions aqueuses ne sont pas adaptés à la manipulation de ces solvants car ils dissolvent le plastique. Voici quelques conseils généraux pour la manipulation de lipides en solvant organique :

– Utiliser des micropipettes en verre, comme les pipettes Hamilton. Leurs pointes métalliques résistent aux solvants organiques.
– Manipuler avec des gants et sous hôte, car le chloroforme et l'hexane sont des solvants volatiles.
– Les pipettes en verre Hamilton doivent être rincées avant et après usage plusieurs fois au chloroforme pour éviter les contaminations.

## 13.4 Fabrication de bicouches peintes (figure 13.2)

Nous utilisons ce protocole pour former des bicouches lipidiques planes dans les expériences de nanopores avec l'$\alpha$-hémolysine. Le terme approprié pour désigner de telles bicouches est "membrane de lipides noires" (ou BLM pour "Black Lipid Membrane" en anglais). Nous utilisons exclusivement les lipides DPhPC dans ces expériences.

### 13.4.1 Préparation des aliquots de lipides

Les lipides DPhPC sont resuspendus dans le chloroforme à 8mg/ml. Nous préparons une centaine d'aliquots de 50$\mu L$ (0.4mg/aliquot) de la solution de lipides dans de petits tubes en verre (6mm de diamètre * 30mm de long). Le chloroforme est évaporé en laissant les tubes sous hôte pendant la nuit. Les aliquots de lipides secs sont bouchés à l'aide de parafilm et conservés au congélateur (-20°C) quelques mois.

### 13.4.2 Protocole de fabrication

- **Préparation des cellules en Teflon**. Nous disposons de plusieurs cellules en Teflon pouvant être fixées sur un microscope (figure 13.2). Un orifice conique de 30$\mu$m de diamètre sépare le compartiment cis (haut) du compartiment trans (bas). Avant chaque expérience la cellule est rincée abondamment à l'eau distillée, à l'éthanol, puis séchée sous flux d'air.[1] Pour fermer le compartiment trans, une lamelle de verre est fixée sous la cellule de Teflon à l'aide d'un polymère réticulant en 5 minutes (Kwik-Cast, World Precision Instruments, en vert sur la figure 13.2).
- **Préparation des lipides**. Sortir deux aliquots de lipides du congélateur. Ajouter 100$\mu L$ d'hexane dans l'un, et 15$\mu L$ d'hexadécène dans l'autre. Agiter pour bien dissoudre les deux aliquots.
- **Prétraitement de surface**. Afin de former une membrane lipidique stable sur l'orifice de 30$\mu$m, il est nécessaire de déposer et sécher des lipides sur le Teflon. L'orifice est rincé à l'hexane pur puis 3$\mu L$ de la solution de lipides dilués dans l'hexane sont déposés sur l'orifice de la cellule. Ces 3 microlitres sont séchés sous flux d'air pendant 1 minute. Cette opération est répétée trois fois puis la cellule est mise à sécher sous flux d'air pendant 20 minutes afin d'enlever le maximum d'hexane.
- **Remplissage de la cellule de Teflon**. La solution tampon est ajoutée dans le compartiment trans de la cellule. Lorsque la solution déborde dans le compartiment cis, ce compartiment est rempli.
- **Ajout des électrodes**. Deux électrodes d'argent Ag/AgCl (WPI) sont connectées à chaque compartiment et à l'amplificateur (Axon Axopatch 200B). Le courant observé est très grand ou saturé puisque les deux compartiments sont en contact électrique.
- **Fabrication de la BLM par "bullage"**. Le bout d'une pointe de pipette est trempé dans l'aliquot de lipides + hexadécène. L'excès de solution est enlevé en essuyant la pointe sur un Kimwipe. A l'aide de cette pointe, une bulle d'air est déposée sur l'orifice central de la chambre. Plusieurs bulles et plusieurs pointes sont souvent nécessaires avant d'obtenir une bicouche. Le courant électrique se bloque lorsqu'une bicouche est formée (résistance supérieure à 10$G\Omega$). L'observation au microscope permet de confirmer la présence de la bicouche : souvent, un bourrelet de lipides est visible autour de la membrane (voir figure 13.2).[2]

Avec cette méthode, les membranes sont stables de quelques minutes à quelques heures et, à 1M KCl, leur résistance est de l'ordre de 100 $G\Omega$.

1. La cellule est conservée dans un bécher rempli d'acide nitrique à 20%, afin d'enlever les traces de molécules organiques après chaque expérience.

2. Il arrive parfois que l'on mette trop de lipides et que la chute de courant soit due à un tas de lipides. La visualisation au microscope permet de s'assurer de la présence d'une bicouche.

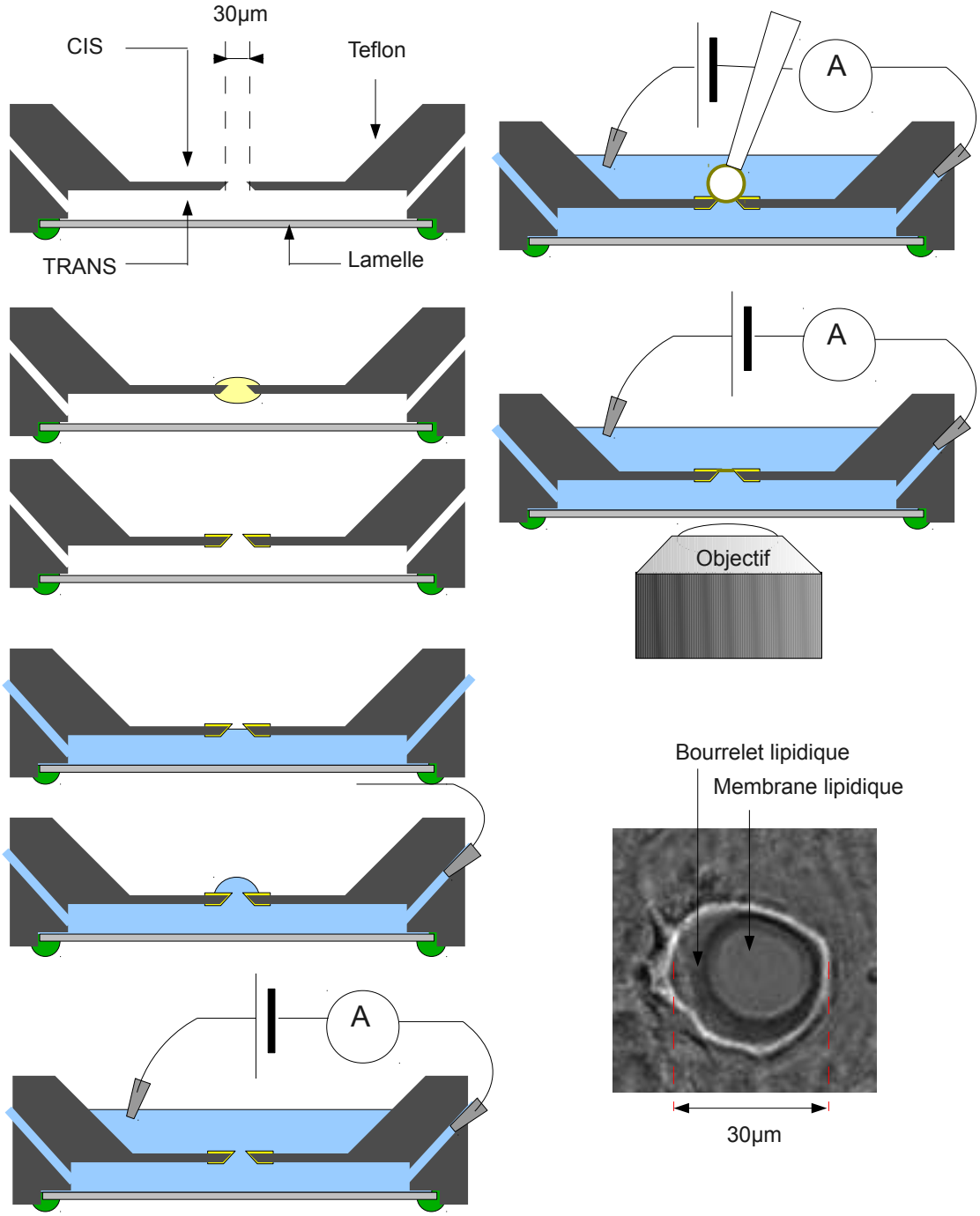



**Figure 13.2** – Formation d'une BLM, voir paragraphe 13.4.2 pour le détail des étapes.

## 13.5 Formation de membranes planes à partir de vésicules unilamellaires géantes (GUVs)

Nous présentons dans cette partie une méthode que nous avons développée pour former des bicouches lipidiques planes à partir de vésicules géantes, en vue de réaliser des études couplant détection optique et électronique. Après avoir présenté le principe de la méthode et sa réalisation expérimentale, nous faisons une étude de la stabilité de la bicouche. Nous détaillons le mécanisme de rupture de la membrane et recensons quelques paramètres (type de lipide, tension membranaire) influant sur la stabilité de la bicouche.

### 13.5.1 Motivation

Dans le chapitre 11, nous avons cherché à caractériser l'activité électrique membranaire consécutive à l'interaction entre le bactériophage T5 et FhuA. Nous avons réussi à reconstituer les interactions spécifiques T5-FhuA dans les vésicules géantes, et non avec les membranes peintes fabriquées selon le protocole 13.4. En effet, il est difficile dans le protocole précédent d'introduire de grandes quantités de protéines membranaires dans la bicouche. Par contre, nous sommes capables d'introduire une grande quantité de FhuA dans les vésicules lipidiques géantes (voir partie 11.2). D'où l'idée de former des membranes planes à partir de ces vésicules géantes contenant FhuA.

### 13.5.2 Principe

Les vésicules lipidiques s'étalent sur le verre. L'interaction verre-lipide est si forte que les vésicules s'ouvrent spontanément et forment des bicouches supportées par le verre. [3] Si le verre est troué, une vésicule suffisamment grande peut éventuellement recouvrir le trou et former une membrane plane électriquement isolante (voir figure 13.3). La membrane plane recouvre le trou et est reliée à la membrane supportée par le verre. Une ligne triple marque la frontière entre la membrane plane et la membrane supportée. [4]

Expérimentalement, nous recréons cette configuration en attachant une pipette perpendiculairement à la chambre de microscopie. Les vésicules lipidiques géantes sédimentent au fond de la chambre de microcopie. A l'aide de micromanipulateurs, nous repérons une vésicule géante de taille adéquate et nous plaçons la surface de la pipette au dessus de celle-ci. Nous approchons ensuite la vésicule de la pipette et lorsqu'elles entrent en contact, la vésicule éclate et forme une membrane recouvrant le trou de la pipette (voir figure 13.4).

3. Les pipettes en verre sont couramment utilisées pour faire du patch-clamp de cellules eucaroytes. Une membrane cellulaire est beaucoup plus robuste qu'une vésicule lipidique ; c'est pour cette raison que les cellules maintiennent leur intégrité physique dans les expériences de patch clamp.

4. Il existe une entreprise qui développe commercialement cette technique (Nanion Technologies GmbH, www.nanion.de). Cependant il est très difficile d'adapter leur montage expérimental comme nous le souhaitions, et de plus, la taille maximale des membranes planes avec leur dispositif est trop faible (2 microns).

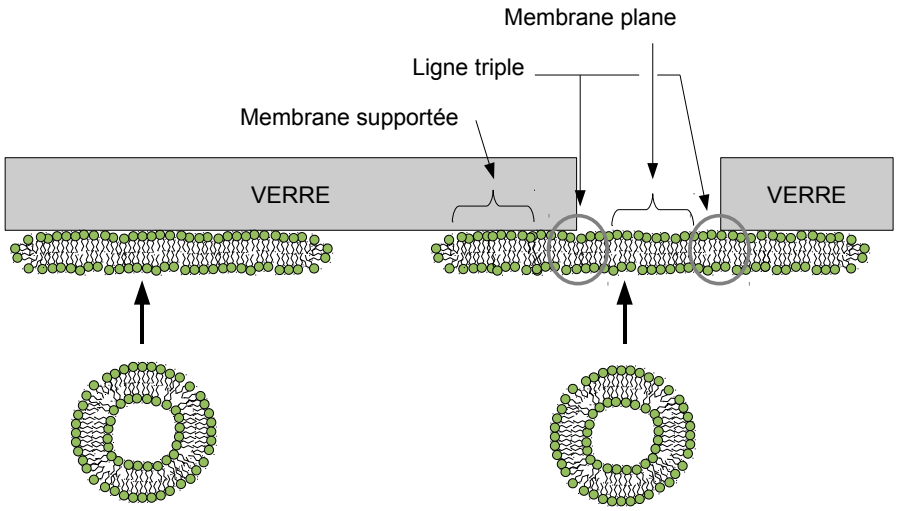



**Figure 13.3** – Principe de formation de la membrane plane sur le verre. Lorsqu'une vésicule lipidique rentre en contact avec le verre, elle s'ouvre et forme une bicouche supportée. Une membrane plane se formera s'il existe un trou dans le verre qui soit plus petit que le rayon de la vésicule.

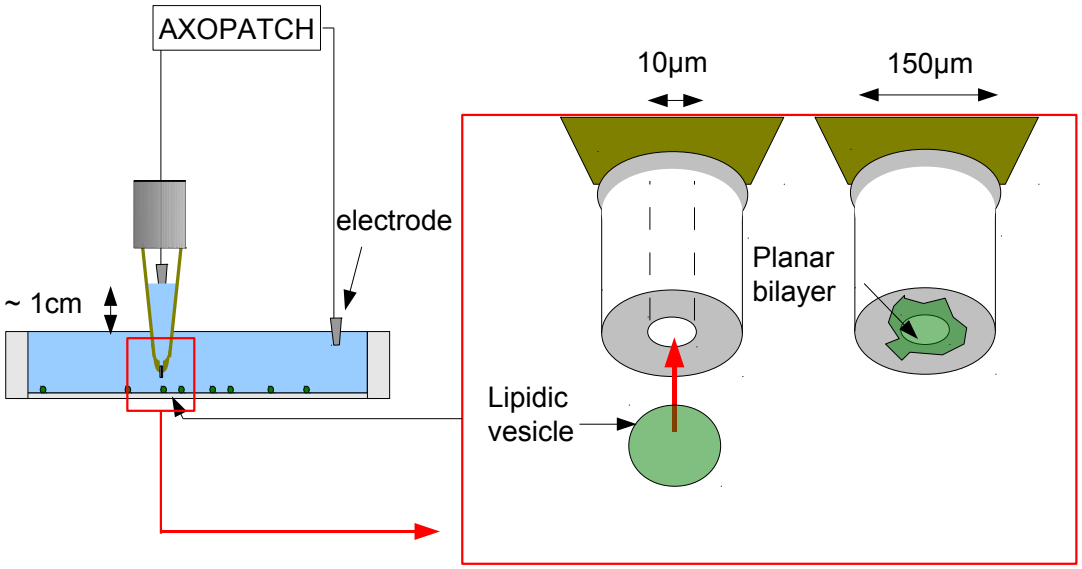



**Figure 13.4** – Principe de la formation de membranes dans le montage expérimental. Des vésicules géantes sont réparties à la surface de la chambre de microscopie. Une pipette verticale est déplacée au dessus d'une de ces vésicules. Droite : lorsque la vésicule rentre en contact avec le capillaire, elle éclate et recouvre la pipette. Deux électrodes et un amplificateur permettent de suivre le courant électrique à travers la pipette. Cette configuration permet aussi de suivre le processus au microscope.

### 13.5.3 Choix techniques

- Afin d'augmenter la probabilité de rencontre entre les phages et les molécules actives de FhuA, nous souhaitons obtenir une membrane plane de grande taille (diamètre supérieur à 5 microns), comparativement aux membranes de patch clamp classiques (entre 1 et 2 microns).
- Pour être certain de visualiser toutes les éjections et toutes les fixations, il est nécessaire de garder toute la membrane en focus au long de l'expérience. La membrane doit donc être parallèle à l'objectif.

Habituellement, dans les expériences de patch clamp, les pipettes sont fabriquées à partir de capillaires en verre relativement larges (1mm). Ces capillaires sont chauffés et étirés de manière à les amincir pour leur donner la géométrie voulue.

Avec cette méthode, il est très difficile de satisfaire ces trois contraintes :
- diamètre interne de la pipette (qui définit le diamètre de la membrane) supérieur à 5 microns,
- planéité de l'extrémité de la pipette (pour que toute la membrane reste en focus),
- faible résistance électrique (quelques $M\Omega$ à 100mM KCl).

Nous avons fabriqué un nouveau type de pipette pour répondre à ces contraintes. Le fournisseur Polymicro propose différents capillaires fins, dont le diamètre interne varie entre de 2 et 40 microns[5] pour un diamètre externe de 150 microns. Nos pipettes sont fabriquées en attachant de petites portions cylindriques de ces capillaires, typiquement d'une longueur égale au millimètre, au bout de pointes de pipettes en plastiques.

### 13.5.4 Réalisation

#### 13.5.4.1 Fabrication de GUV

Pour le détail de la fabrication des vésicules géantes, se référer aux parties 14 et 15.5.2. Les vésicules peuvent être de composition variée. Nous avons utilisé des vésicules EggPC ou DPhPC, en présence ou en absence de protéines membranaires. Pour faciliter la manipulation et la visualisation, il faut marquer les vésicules de manière fluorescente, soit en utilisant des lipides marqués, soit en utilisant des protéines membranaires marquées. La taille des vésicules est importante. Pour parvenir à recouvrir le trou du capillaire, il faut obtenir des vésicules dont le diamètre soit au moins 3 à 4 fois supérieur au diamètre interne du capillaire.

#### 13.5.4.2 Solution tampon

Nous avons utilisé le tampon phage dans ces expériences. Nous pouvons utiliser tout autre tampon qui respecte les deux critères suivants : la solution tampon doit être de même osmolarité que la solution utilisée pour faire pousser les vésicules lipidiques ;[6] la solution tampon ne

5. Les diamètres disponibles sont de 2, 5, 10, 15, 20, 30 et 40 microns.
6. La mesure de l'osmolarité pour ces deux solutions est mesurée à l'aide d'un osmomètre (environ 220 mOsm pour le tampon phage).

doit pas contenir de molécules susceptibles d'empêcher l'adhésion entre le verre et la vésicule. Notamment, il ne faut pas de protéines en solution, car elles risquent de passiver le verre du capillaire. Si nécessaire, les protéines peuvent être ajoutées dans la solution après formation de la bicouche.

#### 13.5.4.3 Chambre de microscopie

Nous disposons de plusieurs chambres de microcopie rondes, de 25 mm de diamètre et de 5mm de haut. Une lamelle de verre est fixée sous la chambre à l'aide de Kwik-Cast. Le verre est ensuite traité à la caséine pour éviter que les vésicules qui sédimentent n'éclatent à la surface du verre : une solution de caséine à 1mg/ml est déposée sur le verre pendant 30 secondes puis la lamelle est rincée abondamment à l'eau distillée et séchée sous flux d'air. [7] Environ 1mL de solution tampon est ajouté pour remplir la chambre.

#### 13.5.4.4 Fabrication de la pipette-capillaire

Les pipettes peuvent être préparées en série à l'avance et conservées plusieurs jours. Elles sont fabriquées à l'aide de cônes de micropipettes et de capillaires. Nous avons construit un dispositif de micromanipulation qui permet d'aligner correctement le capillaire dans un cône de pipette (photos de droite figure 13.5).

Le capillaire (Polymicro, TSP010150, 150$\mu$m OD, 10$\mu$m ID) est maintenu à l'aide de connectiques adaptées (Idex : F-330 (Nut, Fingertight), F-238, (Tubing sleeve, Microtight), P-659 (Adapter)) [8]. Les capillaires ont à leur surface une couche de polyimide protectrice qui doit être enlevée localement à l'aide d'un briquet. Nous avons aussi besoin d'une fine aiguille, de diamètre légèrement supérieur au capillaire, pour préformer le trou dans le cône de pipette. La même connectique est utilisée pour attacher cette aiguille. [9]

Une fois ces préparatifs accomplis, effectuer les étapes suivantes sous loupe binoculaire en se référant à la figure 13.5 [10] :

- Fixer un cône de pipette et l'aiguille métallique dans le dispositif de micromanipulation.
- Aligner la pointe de métal en face du cône de pipette (vis Y et Z) puis faire rentrer de 5mm environ l'aiguille dans le cone de pipette (vis X).
- (1) Brûler l'aiguille à l'aide d'un briquet de manière à faire fondre partiellement le cône autour de l'aiguille.
- (2) Lorsque le plastique est figé, retirer l'aiguille.
- (3) Placer le capillaire dans le trou préformé et refaire brûler le capillaire de manière à fondre partiellement le plastique autour du capillaire. [11]
- (4) Mettre légèrement sous tension le capillaire à l'aide de la vis micrométrique X.

7. S'il reste de la caséine en trop grande quantité, elle viendra se coller sur la pipette et empêchera l'éclatement des vésicules.
8. fournisseur en France : Cluzeau Info Labo
9. On peut se procurer de telles aiguilles (165 $\mu$m de diamètre) dans des magasins d'acupuncture.
10. Avec de l'entraînement, une pipette peut être fabriquée en quelques minutes.
11. Attention de ne pas boucher le capillaire.

- (5) Créer une encoche sur le capillaire à l'aide d'une pointe de diamant.
- (6) Tirer le capillaire à l'aide de la vis micrométrique X : le capillaire casse net au niveau de l'encoche.

La section obtenue est plane à l'échelle de quelques micromètres (voir la photo de droite figure 13.5). En général, une petite brèche se forme dans le sens de propagation de la fissure (voir photo du milieu figure 13.5). Cette brèche fait moins de un micron de haut. Elle ne gêne ni pour l'optique, ni pour la stabilité de la bicouche. [12]

La longueur du capillaire est de l'ordre du millimètre. Les résistances R typiques des pipettes dans le tampon phage (100mM NaCl) sont, en fonction du diamètre interne ID du capillaire :

- ID = 20$\mu$m, R=3M$\Omega$
- ID = 10$\mu$m, R=10M$\Omega$
- ID = 5$\mu$m, R=40M$\Omega$

Le canal du capillaire domine la résistance de la pipette. Conformément à sa géométrie cylindrique, le courant ionique est proportionnel au carré du diamètre interne du capillaire. A ces concentrations ioniques, il n'est pas conseillé de former des bicouches plus petites que 5 microns, car la résistance devient trop élevée.

#### 13.5.4.5 Montage expérimental (figure 13.6)

**Dispositif de micromanipulation de la pipette et de la chambre d'observation.** La pipette est remplie avec environ 100 $\mu$L de tampon. Elle est ensuite attachée au microscope via un dispositif de micromanipulation qui permet de contrôler sa position en x, y et z. Si besoin, il est possible de corriger la planéité de la surface du capillaire par rapport à la surface de verre dans une gamme de +- 3 degrés. La platine de microscopie est motorisée en x-y. La hauteur de la chambre par rapport à la pipette est réglable par un dispositif piezo électrique sur une plage de 100 microns. Ces degrés de liberté permettent de positionner la pipette au dessus de la vésicule sélectionnée puis d'approcher doucement la vésicule de la surface du capillaire.

**Contrôle de la pression dans la pipette.** La surface libre du tampon dans la pipette dépasse de 1cm environ la surface libre du tampon dans la chambre. Il y a donc une différence de pression hydrostatique entre les deux compartiments qui se traduit par un flux de solution à la sortie de la pipette. Ce flux est extrêmement gênant puisqu'il repousse les vésicules de la pipette lorsque l'on s'en approche. Pour remédier à ce problème, une dépression contrôlée est créée dans la pipette à l'aide d'un appareil Fluigent (MFCS-4N, 25mbar). [13]

La différence de pression n'est pas la même d'une expérience à l'autre (variation de la forme du ménisque, de la quantité de tampon...). Il faut donc étalonner la différence de pression au début de chaque expérience, avant d'approcher les vésicules. Pour visualiser le flux, des billes de latex de trois microns sont insérées dans la chambre. Elles sédimentent et parsèment sa surface. Lorsque le capillaire est à proximité des ces billes, les billes se déplacent suivant le flux de solution. Il est alors possible de régler la dépression afin de diminuer au maximum ce flux.

12. Nous avons vérifié que le point de départ des cassures de membranes, comme celle visible figure 13.9, n'est pas corrélé à cette brèche.
13. La précision de l'appareil est de 10$\mu$bar, équivalent à une hauteur d'eau de 100 micromètres

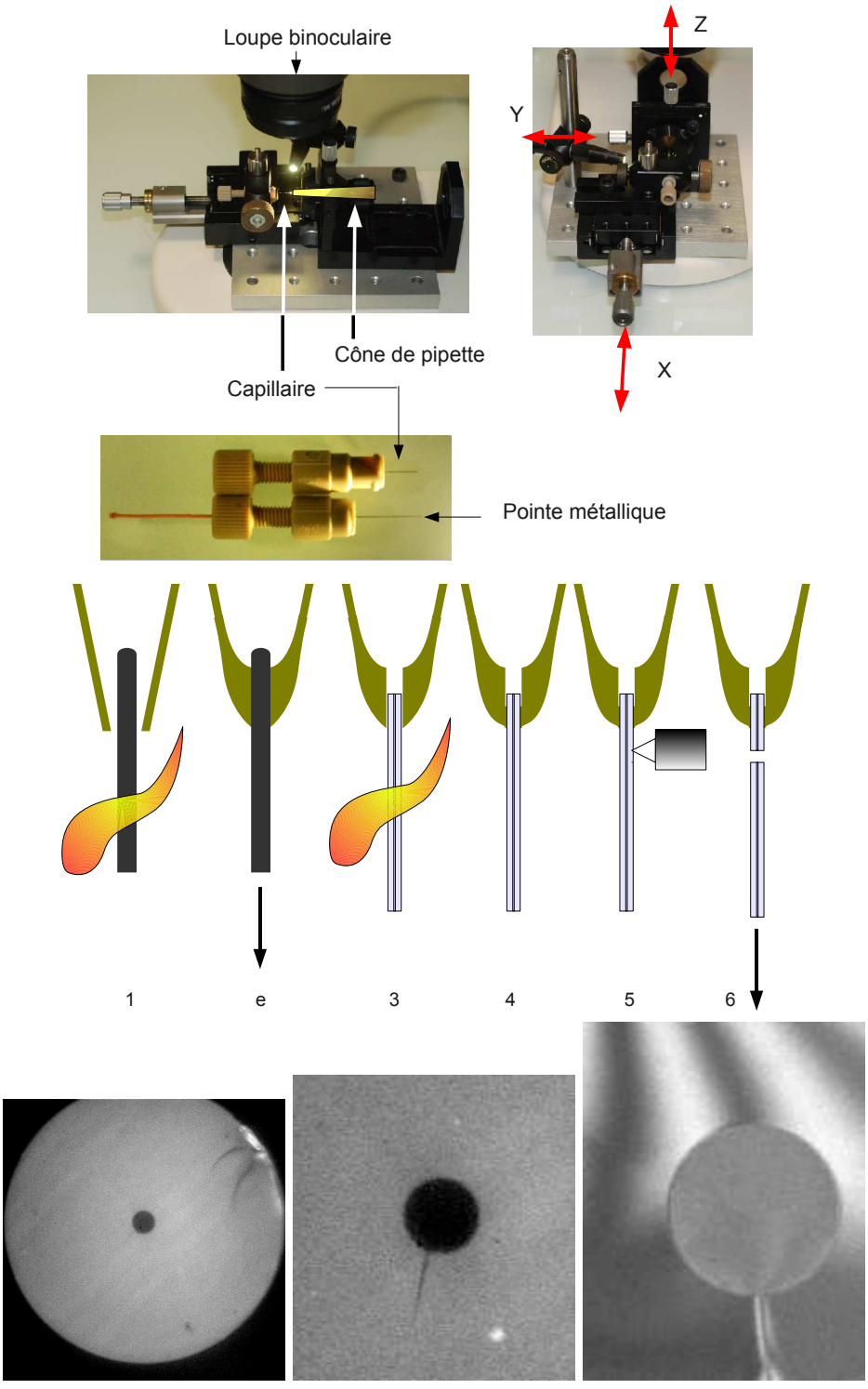



**Figure 13.5** – Photos du haut : dispositif de micromanipulation pour fabriquer les pipettes. Les trois axes de déplacement sont surlignés en rouge. Les pièces maintenant le capillaire et la pointe métallique (photo du milieu) peuvent s'insérer en face de la pointe de micropipette (surlignée en jaune sur la photo en haut à gauche). Pour le schéma des différentes étapes de fabrication, se référer au texte partie 13.5.4.4, "Fabrication de la pipette capillaire". Photos du bas : gauche : vue sur la section du capillaire après fabrication de la pipette, le diamètre externe est de 150 $\mu$m et le diamètre du trou interne est de 10 $\mu$m. Milieu : Zoom sur le trou interne du capillaire. La brèche formée lors de la cassure du capillaire est clairement visible. Droite : visualisation par microscopie à contraste interférentiel de la surface du capillaire au niveau de la zone centrale. Les interfranges correspondent à des différences de hauteur de 250nm.

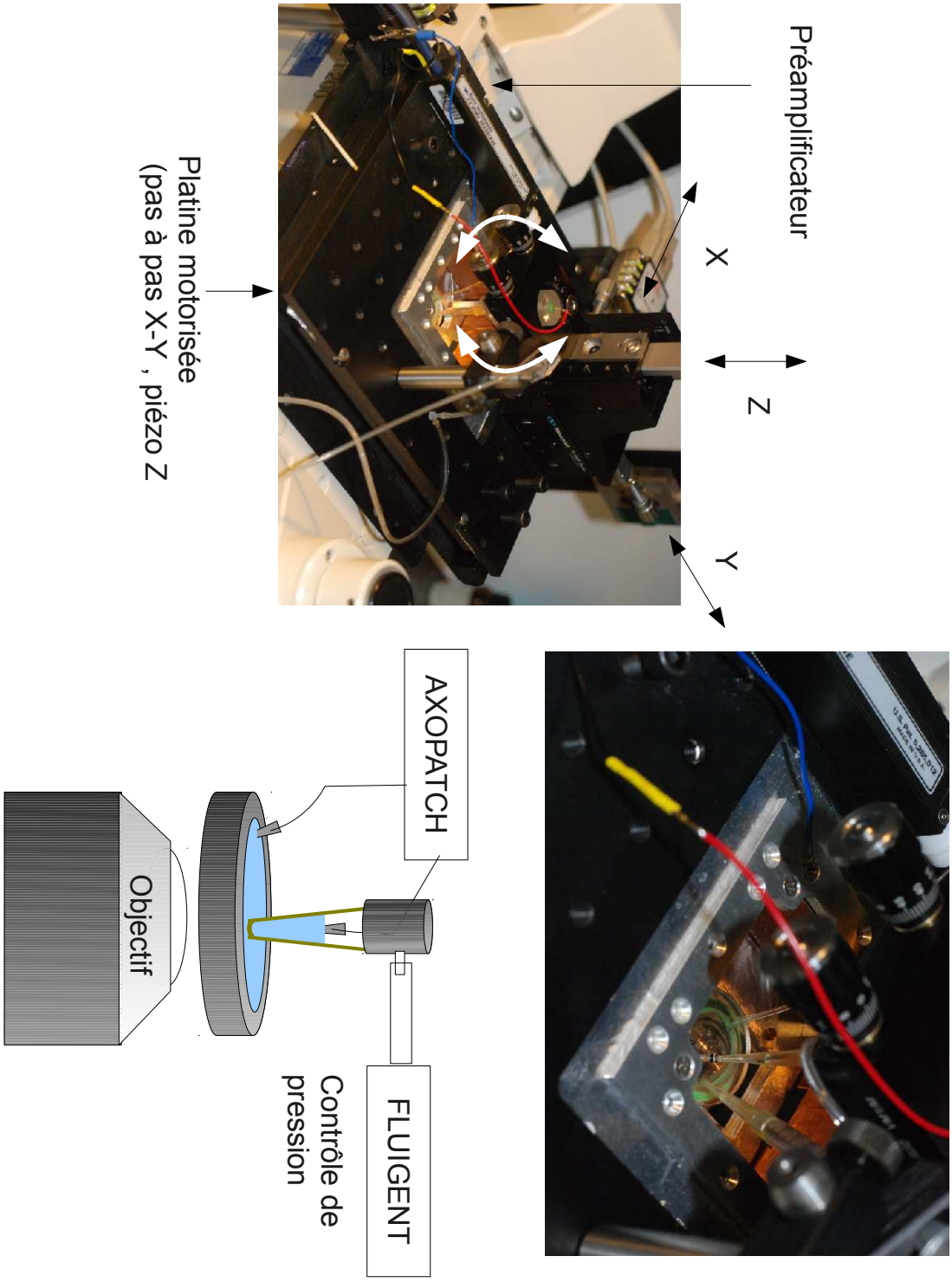



**Figure 13.6** – Montage expérimental, photos et représentation schématique.

#### 13.5.4.6 Protocole

- Préparer la chambre de microscopie (paragraphe 13.5.4.3).
- Placer la chambre sur le microscope.
- Connecter une électrode à la masse de l'Axopatch et à la chambre.
- Introduire une petite quantité de billes de latex de trois microns au fond de la chambre.
- Transférer les vésicules géantes dans la chambre (environ 2$\mu$L de la chambre de pousse, à l'aide d'un cône large pour ne pas cisailler les vésicules). L'expérience est grandement facilitée si les vésicules sont fluorescentes. (lipides ou protéines marquées). [14]

Ces préparatifs sont effectués une fois. Les étapes suivantes peuvent être répétées dans la même chambre jusqu'à l'obtention d'une membrane plane.

- Remplir de tampon une pipette. La placer dans la chambre à l'aide du dispositif de micromanipulation.
- Connecter la pipette à l'Axopatch.
- Vérifier le contact électrique entre les deux compartiments à l'aide de l'Axopatch.
- Connecter la pipette au contrôle de pression Fluigent.
- Focaliser le microscope sur le bout de la pipette. Deux cercles correspondant au diamètre externe et interne sont visibles (voir figure 13.5, photo de gauche).
- Approcher la pipette près des billes de latex.
- Régler l'appareil Fluigent de manière à égaliser la différence de pression de part et d'autre de la pipette : les billes de latex doivent bouger le moins possible.
- Mémoriser la position de la pipette.
- Rechercher une vésicule de taille correcte (environ 40$\mu$m de diamètre pour un diamètre interne de 10$\mu$m). Mémoriser sa position.
- Approcher la pipette au dessus de la vésicule, à une distance de 20 microns environ.
- A l'aide du dispositif piezo électrique, rapprocher la vésicule du capillaire, jusqu'à rentrer en contact.
- Si tout se passe correctement, un anneau fluorescent apparaît au centre du capillaire, qui s'élargit, puis la vésicule s'étale subitement et recouvre le trou interne au capillaire (voir figure 13.7). Si une faible différence de potentiel est appliquée (environ 40mV), il est possible de voir la chute de courant concomitant à l'étalement de la vésicule.

### 13.5.5 Discussion sur la stabilité de la membrane

Pour réaliser des mesures de courant électrique, il est essentiel de travailler sur des bicouches lipidiques stables, de résistance élevée ($>$100M$\Omega$) et constante. Nous détaillons dans cette partie nos observations et étudions quelques facteurs influençant la stabilité de la membrane plane.

14. Il est préférable de mettre les vésicules d'un côté de la chambre, et les billes d'un autre, afin de régler la pression à un endroit, puis de chercher les vésicules ailleurs. Ceci permet d'éviter les rencontres fortuites entre pipette et vésicule.

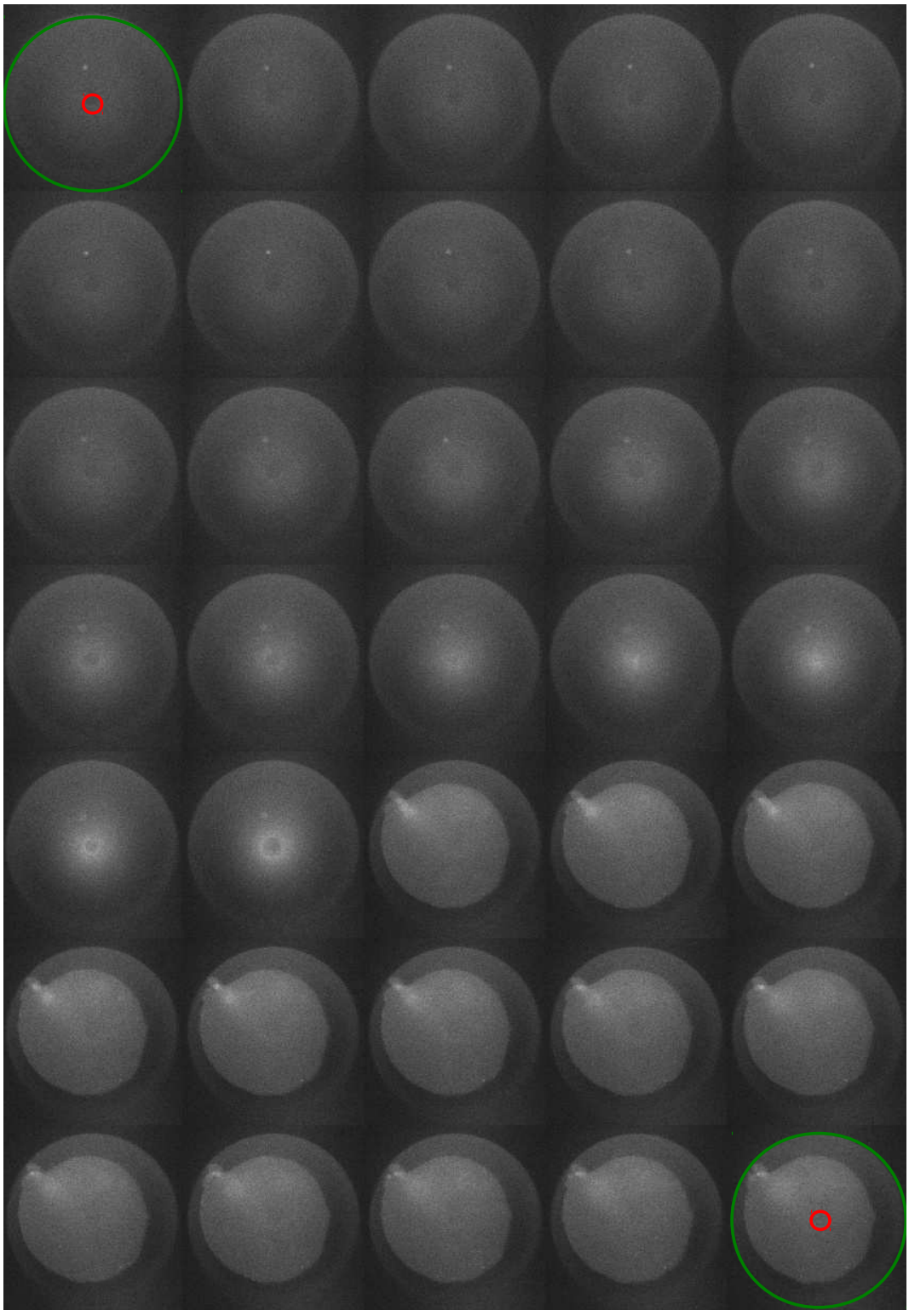


**Figure 13.7** – Images de la phase d'approche entre la pipette et une vésicule (délai entre chaque image : 0.5s). La focalisation est effectuée au bout de la pipette. Sur la première et la dernière photo, le diamètre externe (150$\mu$m) du capillaire est surligné en vert et le diamètre interne (10$\mu$m) en rouge. La vésicule (EggPC + PE-NBD (1/1000 w/v)) se rapproche de la pipette à vitesse constante. La vésicule apparaît d'abord sous la forme d'un rond fluorescent qui s'élargit. Arrivée au contact, elle "éclate" subitement et s'étale sur la section du capillaire. La partie rouge délimite la ligne triple qui connecte la membrane plane de 10 microns de diamètre à la membrane supportée.

#### 13.5.5.1 La résistance électrique des membranes DPhPC est plus grande que celle des membranes EggPC.

Nous avons comparé le comportement des membranes DPhPC aux membranes EggPC. Des vésicules géantes des deux sortes, dépourvues de protéines membranaires, ont été fabriquées (protocole 14). Il y a une différence importante de comportement entre ces deux lipides. Les membranes fabriquées à l'aide de lipides DPhPC ont une résistance un ordre de grandeur au dessus des membranes EggPC : elles forment des gigaseals (c'est-à-dire que leur résistance est de l'ordre du GΩ), tandis que les membranes EggPC ont une résistance qui est plus fluctuante et qui varie autour de la centaine de MΩ. Curieusement, la résistance des membranes EggPC a l'air de diminuer très rapidement dans les premières secondes qui suivent la formation de la membrane. Nous n'avons pas d'hypothèses convaincantes pour expliquer ce phénomène. [15]

L'effet des lipides sur la "durée de vie" des membranes, c'est-à-dire le temps qui s'écoule entre leur formation et leur claquage, n'est pas évident. Avec ce protocole, la majorité des membranes dure moins de 10 secondes. Il y a peut être un léger avantage pour les DPhPC si l'on regarde la proportion de membranes qui dure plus de 2 minutes (4/13 pour les DPhPC et 2/18 pour les EggPC).

Dans un système similaire de patch clamp sur GUV, développé par Gil Toombes et Sophie Aimon, dans l'équipe de Patricia Bassereau à l'institut Curie, nous avons obtenu un résultat légèrement différent de celui-ci. Les vésicules sont patchées à l'aide de pipettes classiques et les membranes formées sont plus petites (5 microns maximum). Les membranes DPhPC sont très stables, elles forment des gigaseals de durée supérieure à 40 minutes (3 membranes / 3 essais). Les vésicules EggPC ne sont pas stables (durée $\approx$ 2 secondes), mais elles forment tout de même des gigaseals. Ces expériences nous ont incités à choisir les lipides DPhPC dans les expériences suivantes et dans les expériences avec les phages.

#### 13.5.5.2 Les ruptures de membrane se produisent au niveau de la ligne triple.

Lorsque les bicouches cassent, le courant électrique remonte brutalement. La visualisation optique révèle que la rupture s'initie toujours au niveau de la circonférence de la membrane plane, sur la ligne qui la relie à la membrane supportée (voir figure 13.9 pour un exemple). Les défauts dans la membrane sont donc probablement nucléés au niveau de la ligne triple. Le trou dans la membrane s'étend progressivement à l'échelle de la seconde, et finit par découvrir totalement le diamètre interne du capillaire (voir figure 13.9).

#### 13.5.5.3 Influence de la tension de surface sur la stabilité de la membrane

Nous avons mené une série d'expériences pour étudier qualitativement le rôle de la tension membranaire sur la stabilité de la bicouche. A l'origine, nous pensions que réduire la tension membranaire allait nous permettre d'obtenir des bicouches plus stables. C'est en partie vrai. La

15. Nous ne pouvons pas exclure un effet de la pureté de préparation des lipides. Les lipides DPhPC sont synthétiques et extrêmement purs, ce qui n'est pas le cas des lipides EggPC (Sigma-Aldrich, réf n° P3556), qui sont de plus sujets à l'oxydation.

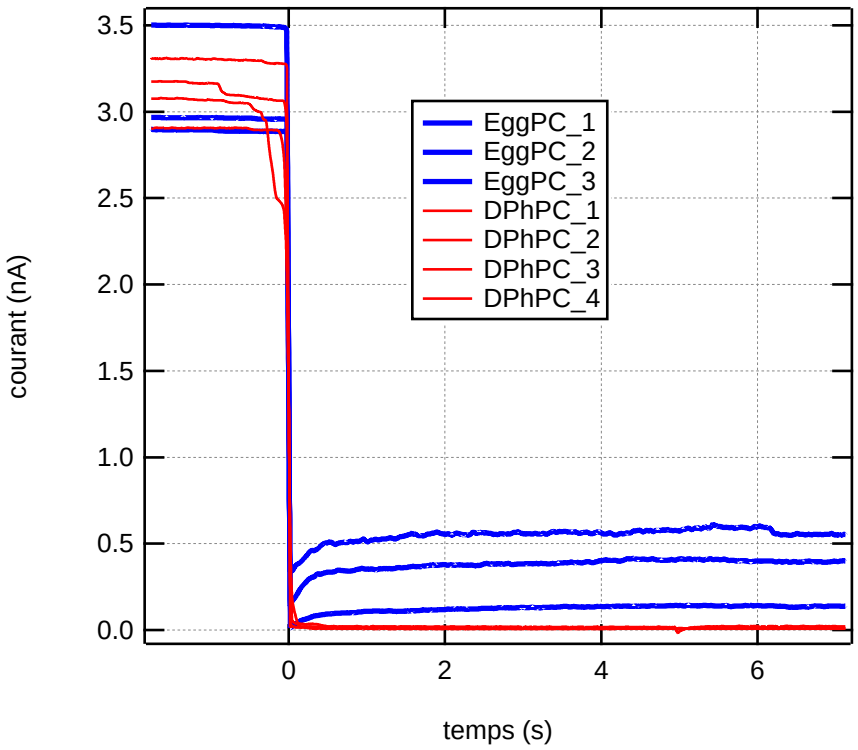



**Figure 13.8** – Comparaison des courbes de courant lors de la formation des bicouches planes pour des lipides EggPC (bleu) et des lipides DPhPC (rouge). Les membranes ont un diamètre de 10 microns dans les deux cas. Une différence de potentiel de 40mV est appliquée de part et d'autre de la pipette et les courbes sont synchronisées pour que t=0 corresponde à la date de formation des bicouches, date à laquelle le courant chute brutalement. Après cette date, les courants des 4 membranes DPhPC sont confondus et sont stables autour de 10-20pA tandis que les courants des 3 membranes EggPC augmentent et dépassent la centaine de pA.

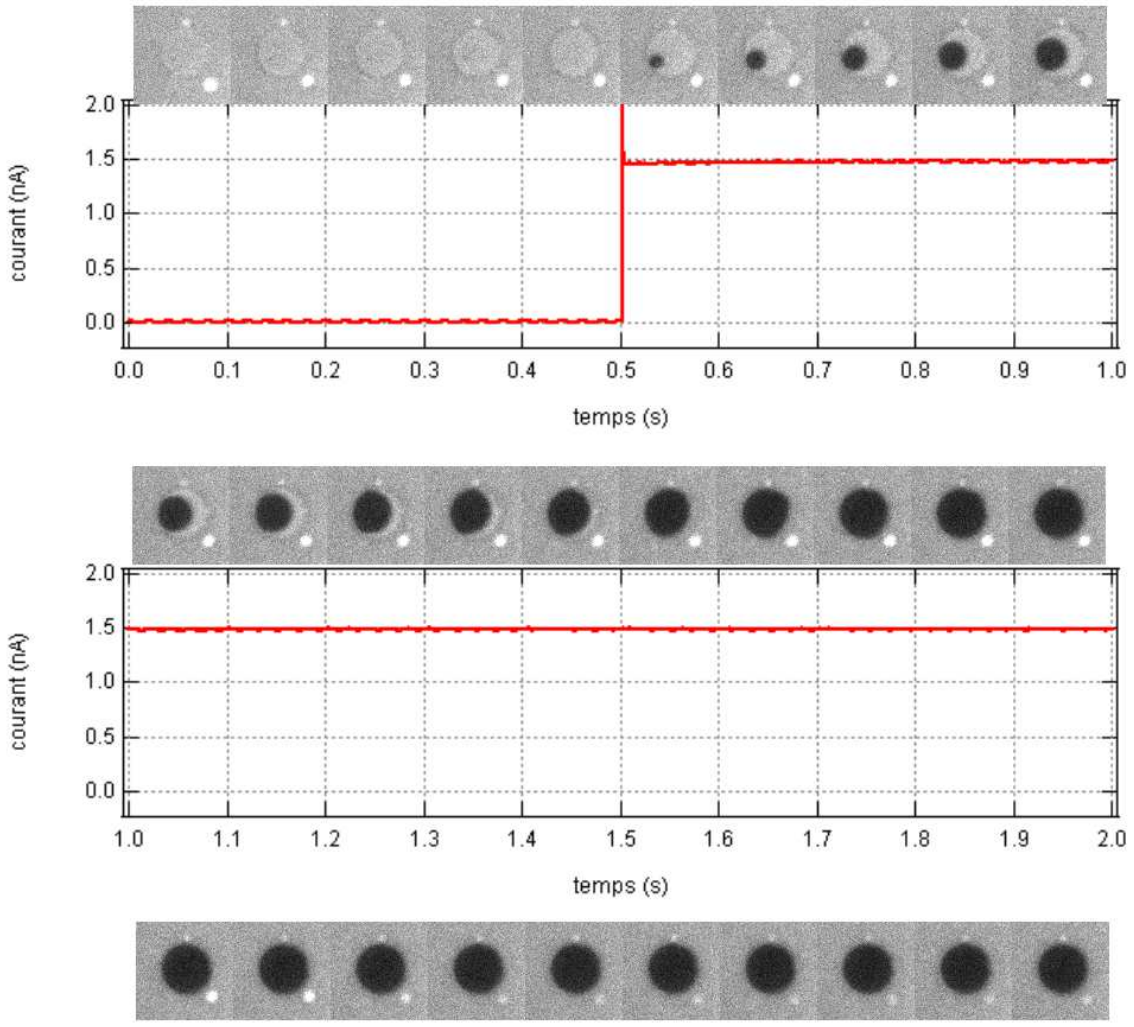



**Figure 13.9** – Rupture de membrane (10$\mu$m de diamètre, lipides DPhPC + PE-NBD (1/1000 w/v)) visualisée de manière synchrone en fluorescence et par la mesure du courant électrique (différence de potentiel appliquée constante égale à 20mV).

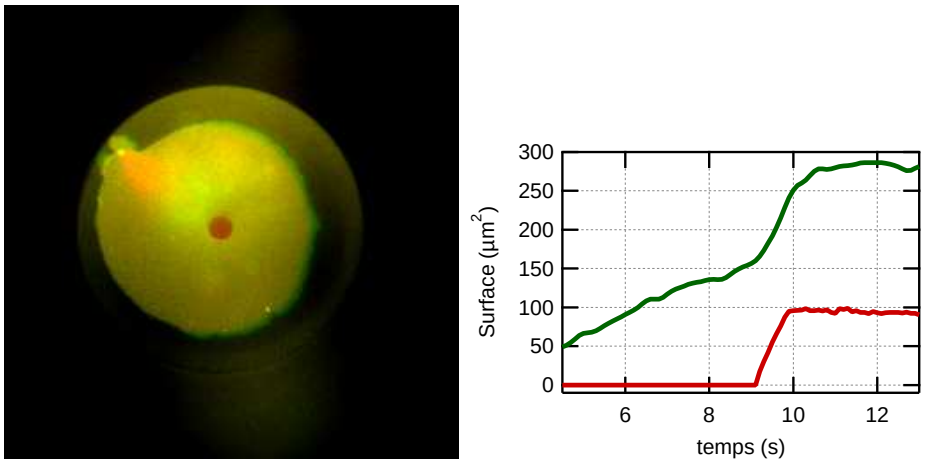



**Figure 13.10 –** Extension de la membrane supportée consécutive à la rupture de la membrane plane. Gauche : photo superposant la membrane avant (rouge) et après (vert) rupture de la membrane plane centrale. Les zones en jaune sont inchangées. La zone rouge du milieu est la position initiale de la membrane plane. Un liseret vert apparaît sur la partie droite : il s'agit de la zone d'extension de la membrane supportée suite à la rupture de la membrane plane. Droite : graphe montrant l'extension de la membrane supportée (vert) et la réduction de la membrane plane (rouge) en fonction du temps. Une nette accélération de l'extension est visible lors de la rupture de la membrane. La montée initiale de la courbe verte est due au fait que la membrane n'avait pas atteint son équilibre avant la rupture.

réduction de la tension membranaire empêche les défauts de grandir et de se propager comme sur la figure 13.9. Cependant, la réduction de la tension membranaire ne semble pas réduire la nucléation de ces défauts, qui, s'ils ne sont plus visibles optiquement, restent perceptibles via l'augmentation du courant en l'absence de toute protéine susceptible de former des pores. Nous démontrons cet effet dans les paragraphes suivants.

**La tension de surface de la membrane plane est fixée par l'interaction entre le verre et les lipides.** Nous avons remarqué un effet intéressant lorsque les membranes lipidiques cassent : la surface totale de membrane reste approximativement constante. La surface de membrane plane qui disparaît au centre du capillaire réapparaît autour de la membrane supportée, comme le montre la figure 13.10. Il s'agit d'une conséquence de l'interaction forte des lipides sur le verre. La membrane lipidique mouille le verre et s'étend jusqu'à atteindre une tension d'équilibre. La tension de la membrane supportée par le verre va ensuite fixer la tension de la membrane plane. Lorsqu'un trou est nucléé sur la circonférence de la membrane plane, la tension va étirer le trou et le propager comme sur la figure 13.9. Le flux de lipide qui en résulte diminue la tension de la membrane supportée. En réponse, celle-ci va s'étendre sur le verre et retrouver sa tension d'équilibre.

**Traitement de surface, réduction de la tension de surface membranaire.** Nous avons cherché à réduire la tension de surface de la membrane plane en jouant sur les propriétés d'adhésion entre le verre et les lipides. Un traitement de surface relativement simple qui empêche l'adhésion entre les lipides et le verre consiste à recouvrir le verre de protéines. Pour nos traite-

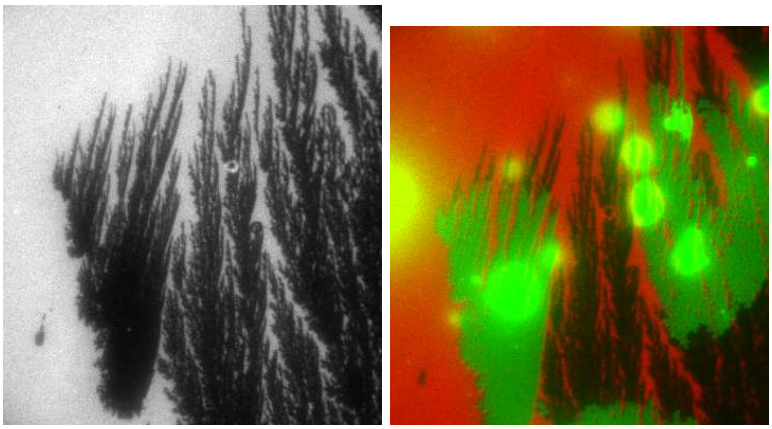


**Figure 13.11** – Protection de surface par la caséine. La caséine fluorescente imprimée sur le verre est visible sur la photo de gauche. Des vésicules fluorescentes (EggPC + PE-NBD (1/1000 w/v) sont ajoutées sur la surface. Les membranes s'étalent sur le verre dans les zones dénuées de caséine, comme le montre la photo de gauche superposant la caséine fluorescente (rouge) et les lipides fluorescents (vert). Echelle : un côté de la photo = 150 $\mu$m.

ments de surface, nous avons utilisé la caséine (Sigma-Aldrich, ref n°C7078) [16]. Cette protéine s'adsorbe spontanément sur le verre et ne se désorbe pas dans le tampon phage, à l'échelle de quelques heures. Pour visualiser nos traitements de surface, nous avons marqué la caséine de manière covalente avec une molécule fluorescente, l'Alexa-568. [17] La figure 13.12 montre une surface de verre recouverte partiellement de caséine fluorescente. Les vésicules lipidiques s'étalent sur le verre uniquement sur les zones dénuées de caséine.

Si l'on parvient à travers des traitements de surface à limiter la surface adhésive entre le verre et les lipides, alors il sera possible de réduire la tension de surface de la membrane. Il faut pour cela que la membrane recouvre entièrement la partie adhésive et qu'elle ne puisse pas continuer à s'étaler. Il faut à la fois limiter l'adhésion dans le capillaire, pour éviter que la membrane plane ne puisse rentrer dedans, et à l'extérieur de la membrane supportée.

L'utilisation de capillaires pour former des pipettes s'est révélé être un bon choix pour faire ces traitements de surface. En effet, avec notre mode de fabrication, il est possible de traiter spécifiquement l'intérieur du capillaire pendant l'étape 4 de fabrication de la pipette (voir figure 13.5 et 13.12). Pour empêcher l'adhésion des lipides à l'intérieur du capillaire, il est possible de ne traiter que l'intérieur du capillaire avec la caséine (étape 4b) (caséine-alexa, 0.1mg/ml, temps d'incubation de 30 secondes). Nous pouvons ensuite rincer l'intérieur du capillaire avec du tampon phage (étape 4c) avant de sectionner le capillaire pour finaliser la pipette (étapes 5 et 6).

Afin de limiter la tension de la membrane supportée, il faut de plus limiter l'adhésion des lipides au bord de la membrane supportée. Nous avons testé trois méthodes.

– Nous avons traité l'extérieur de la surface du capillaire pendant l'étape 4. Il suffit de

16. C'est une protéine, ou plutôt un mélange de protéines qui est couramment utilisé en biologie pour passiver des gels ou des surfaces.

17. Invitrogen Alexa Fluor 568 carboxylic acid, succinimidyl ester *mixed isomers*, 1 mg, voir le mode d'emploi d'Invitrogen pour le protocole de marquage.

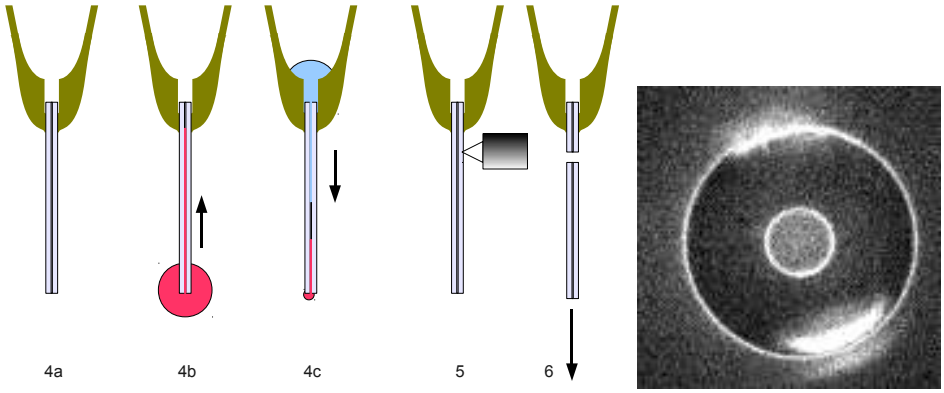



**Figure 13.12** – Traitement de surface de l'intérieur du capillaire.

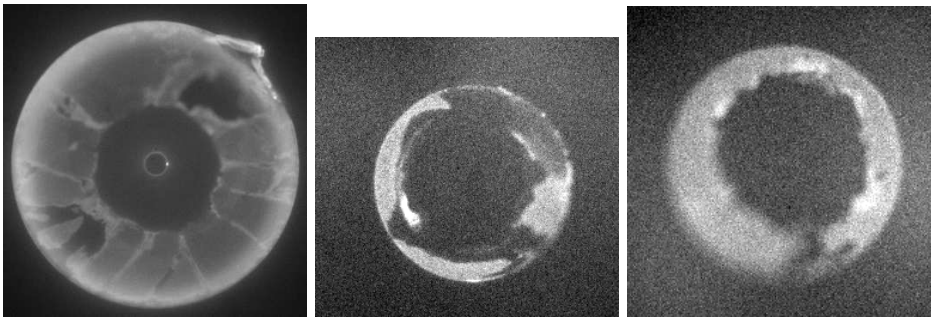


**Figure 13.13** – Impression de caséine.

déposer une goutte de caséine (0.1mg/ml, 30s) sur le capillaire avant de le rincer et de le sectionner. Un exemple de pipette obtenue avec cette méthode est montré figure 13.12. Le verre ainsi traité n'est adhésif que sur la section en forme de couronne du capillaire.

– Afin de ne pas être limité en taille par le diamètre externe du capillaire et ainsi utiliser des vésicules plus petites, nous avons imprimé par microcontact de la caséine directement sur le capillaire sectionné. A titre d'exemple, la figure 13.13 montre trois essais d'impression sur la pipette. Cette impression s'est révélée assez difficile. Nous avons utilisé différentes surfaces pour l'impression (PDMS, PDMS silanisé, NOA), mais la caséine s'imprime mal sur le verre et a tendance à s'arracher par lambeaux.

Avec ces méthodes, il faut trouver une vésicule de diamètre adapté à la surface adhésive. Par exemple pour recouvrir un disque adhésif de 90$\mu$m de diamètre, il faut trouver une vésicule d'approximativement 45 $\mu$m de diamètre[18]. Si les vésicules sont trop petites, le traitement est inutile ; si les vésicules sont trop grandes, nous obtenons des cas de figure assez variés. Un exemple intéressant est le cas où nous formons une "vésicule ouverte" : l'excès de membrane est recruté au niveau de la membrane plane. Notre contrôle de pression nous permet alors de former une vésicule rentrante ou sortante selon la pression appliquée (voir figure 13.14). [19] Néanmoins, en conclusion, la restriction sur la taille des vésicules limite fortement l'intérêt de ces deux méthodes.

18. $4\pi R_{ves}^2 = \pi R_{adh} \implies R_{ves} = R_{adh}/2$

19. Nous avons décelé un phénomène intéressant dans cette configuration : lorsque la différence de pression est extrêmement faible, la membrane fluctue très fortement et elle a tendance à former des minivésicules pour expulser sa membrane et ainsi retrouver une configuration quasi plane. Il est possible dans ce cas que la tension de membrane soit négative et induise des phénomènes de flambage.

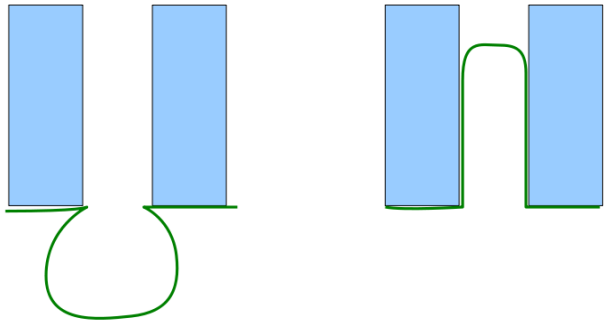


**Figure 13.14** – Traitement de surface de l'intérieur du capillaire.

Une troisième méthode, qui s'est révélée être la plus efficace repose sur le principe suivant : lors de la formation de la membrane plane, il existe un délai de quelques secondes avant que la membrane supportée n'atteignent sa surface d'équilibre. Nous avons fabriqué un dispositif actif à l'aide de l'appareil Fluigent interfacé par Labview. Dans ce dispositif, la chute de courant détectée lorsqu'une membrane est formée déclenche le relargage de caséine concentrée (environ 1mg/ml) dans la chambre de microscopie. La caséine recouvre alors, en moins d'une seconde, la surface de verre non traitée du capillaire. L'extension de la membrane supportée s'arrête avant d'atteindre la tension d'équilibre.[20] Nous obtenons ainsi des membranes planes faiblement tendues.

**Influence de la réduction de la tension de surface sur la stabilité de la bicouche.** Lorsque les membranes sont faiblement tendues, le comportement des bicouches change. Optiquement, les membranes sont stables pendant plus d'une heure. Malheureusement, elles ne sont pas stables électriquement. La résistance électrique des membranes diminue avec le temps. Les défauts dans la membrane sont probablement nucléés de la même manière que pour les membranes tendues, mais la faible tension membranaire les empêche de s'étendre. La figure 13.15 montre le comportement électrique de ces deux types de membrane. Alors que les membranes tendues claquent de manière nette électriquement et que la rupture est corrélée à l'extension d'un trou dans la membrane (cf figure 13.10), les membranes détendues ont un courant qui augmente progressivement avec le temps, et cette différence est imperceptible optiquement.

#### 13.5.5.4 Influence des protéines membranaires.

Précédemment, nous avons utilisé des vésicules purement lipidiques. Dans les expériences du chapitre 11 sur les phages, les vésicules sont concentrées en protéines membranaires (masse(FhuA)/masse(DPhPC)=1%). Les protéines de FhuA n'ont pas d'activité électrique propre et, conformément à ceci, nous n'observons pas de différence avec ce protocole entre les vésicules lipidiques pures et les vésicules contenant FhuA. Notons que pour étudier les signaux électriques liés aux phages, il faut utiliser des membranes tendues, sans traitement de surface, afin de ne pas confondre les signaux électriques liés au phage de signaux liés à la rupture de la membrane.

20. Cette méthode a un défaut : il faut changer de chambre de microscopie en cas d'échec, puisque la caséine est présente en solution.

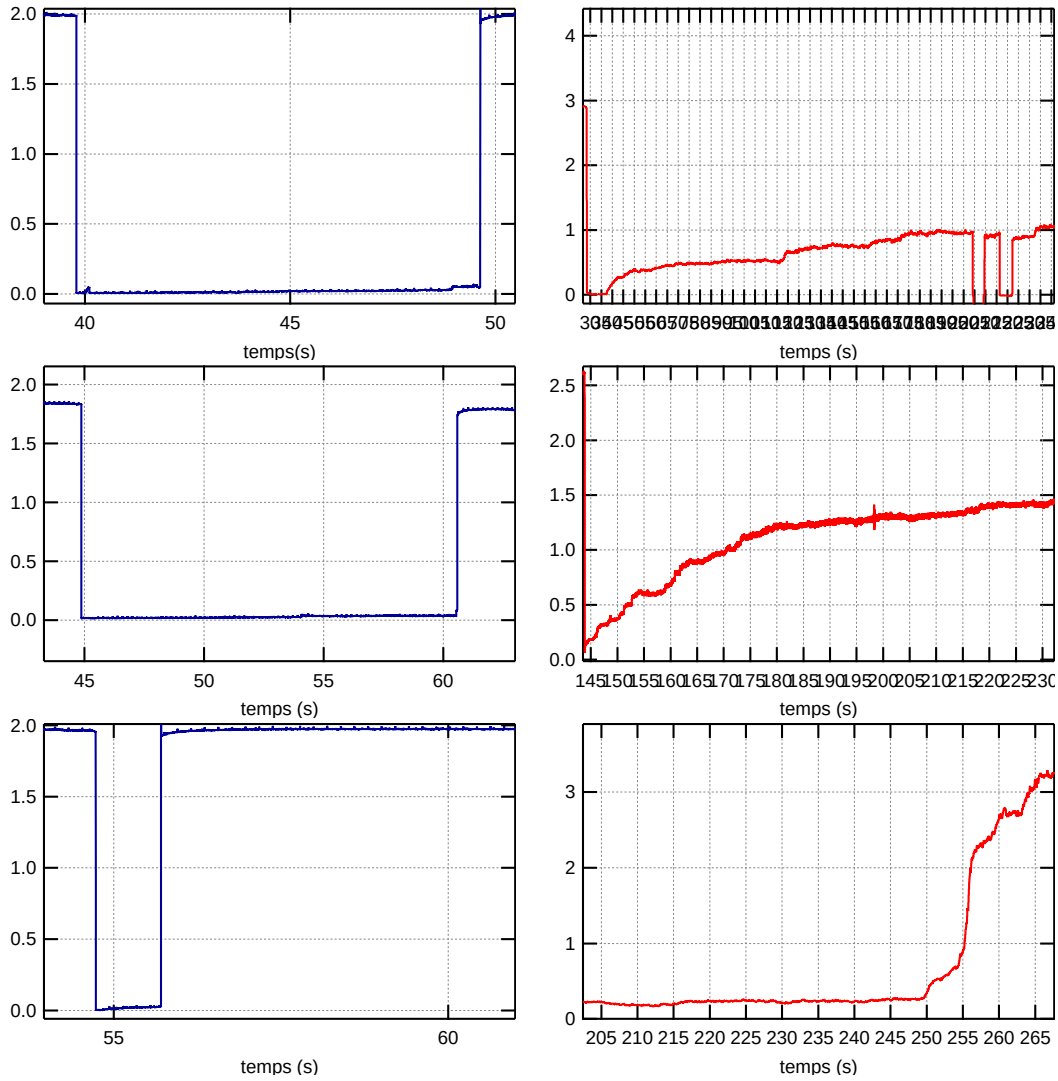



**Figure 13.15** – Influence de la tension de membrane sur la stabilité des membranes. Les membranes (10 $\mu$m de diamètre, lipides DPhPC) sont formées dans le tampon phage, la différence de potentiel appliquée, constante, est de 40mV. Gauche : en l'absence de traitement de surface les membranes sont tendues. Lorsque les membranes claquent, elles le font de manière nette et la membrane se rétracte. Droite : lorsqu'un traitement de surface diminue la tension, le courant électrique augmente progressivement (et les membranes ne se rétractent pas). Notez les différences d'échelle de temps, les graduations sont identiques (5s) pour tous les graphes.

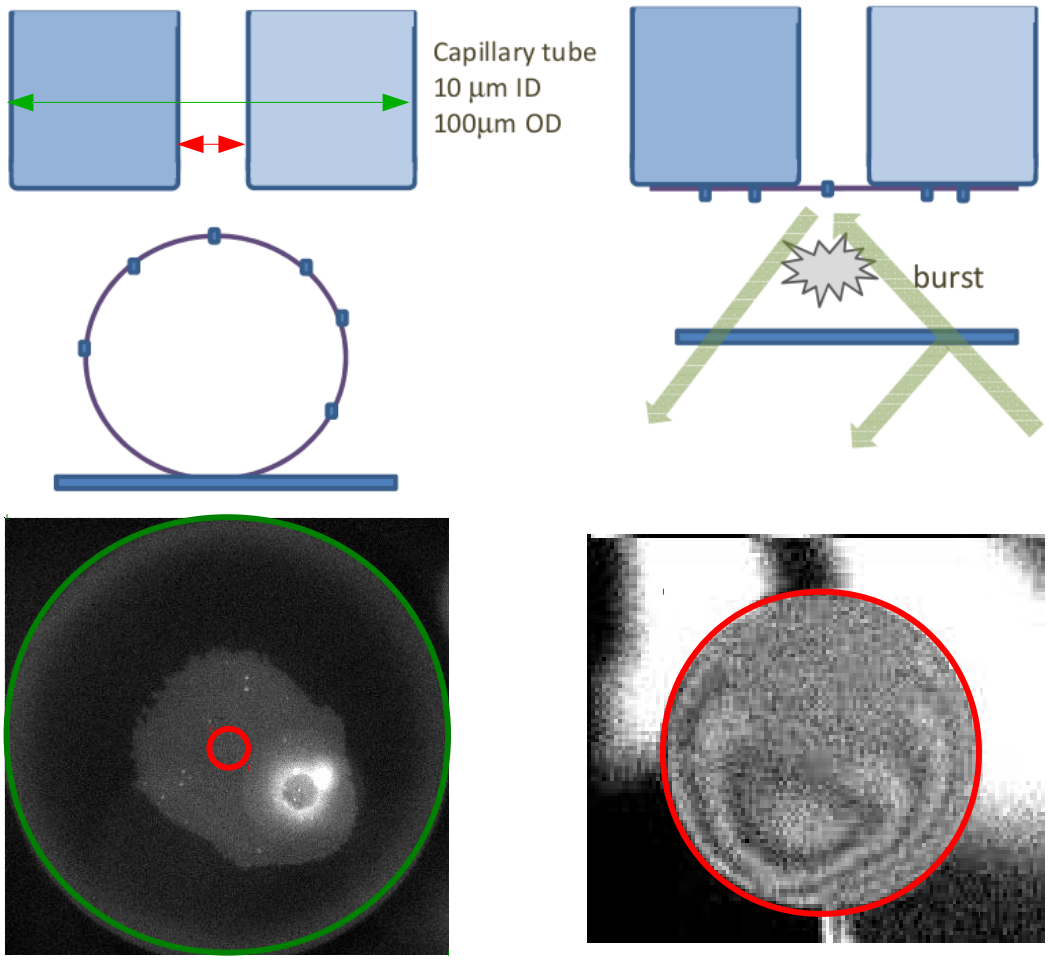



**Figure 13.16** – Visualisation de la membrane lipidique par RICM. Haut : schéma montrant la formation d'une bicouche lipidique plane. La différence de marche entre le rayon lumineux réfléchi à la surface du verre et celui réfléchi par la membrane permet de voir la forme de la membrane lipidique par interférométrie. La photo en bas à droite est un zoom sur le trou interne du capillaire qui montre la forme légèrement gonflée de la membrane.

### 13.5.6 Visualisation des fluctuations membranaires par RICM

Si le capillaire soutenant la membrane est suffisamment proche de la surface de verre de la chambre de microscopie, il est possible de visualiser les fluctuations de membrane par microscopie à contraste interférentiel (RICM). En éclairant la surface avec un lumière monochromatique, nous voyons des interférences entre le rayon lumineux réfléchi par la membrane et celui réfléchi par la surface de verre. Des franges d'interférences fluctuantes révèlent les fluctuations thermiques de la membrane. Le contrôle de pression (Fluigent) permet en outre de gonfler ou de détendre la membrane. Une surpression va par exemple créer un léger gonflement de la membrane parfaitement visible par RICM (voir figure 13.16).

Cette technique est présentée pour montrer différents modes d'utilisation du montage. Les modes de visualisation peuvent être variés il est possible de contrôle finement les paramètres physique pouvant influer sur la membrane (pression, différence de potentiel...).

Dans cette partie, nous avons mis au point une technique permettant :
- la formation de membranes planes de grande taille (diamètre compris entre 5 et 20 $\mu$m),
- la mesure simultanée de signaux électriques et optiques sur cette membrane,
- la formation de membranes planes contenant de grandes quantités de protéines membranaires,
- le contrôle de la pression appliquée sur la membrane, donc de sa tension.

Les limitations de la technique :
- Il est nécessaire de former des vésicules lipidiques de grande taille.
- Il est déconseillé de former de très petites bicouches car la résistance électrique des pipettes évolue selon le carré du diamètre de la membrane.

Le point critique à améliorer concerne la stabilité des membranes. Nous avons montré que la tension de membrane n'influe pas sur la stabilité électrique des bicouches. Il serait intéressant de tester différents traitements de surface afin de stabiliser la ligne triple sur laquelle est fixée la membrane plane. Notre protocole original de fabrication de pipette permet de tester facilement plusieurs traitements de surface.

# Chapitre 14

# Protocole fabrication de vésicules unilamellaires géantes (GUVs)

Les vésicules géantes lipidiques sont formées par électroformation [6].

**Matériel**

- Lames ITO (sigma)
- Lipides[1]
  - Lipides EggPC (Sigma Aldrich, ref n°P3556)
  - Lipides DPhPC (Avanti polar lipdids, ref n°850356P)
  - Lipides fluorescents (18 :1 PE-NBD, Avanti polar lipids, ref n°810145C ou Texas Red DHPE, Invitrogen, ref n°T-1395MP)

**Préparation**

- Préparation du mélange de lipide[2]
  - Mélanger dans un tube à essai :
  - 5 $\mu$L de NBD PE (ou Texas Red DHPE) à 1mg/ml
  - 200$\mu$L de lipides EggPC ou DPhPC à 10mg/ml
  - 800$\mu$L d'un mélange chloroforme + 1% méthanol
- Lavage des lames ITO (Sigma Aldrich, ref n°639303-1EA)
  - sonication 10 minutes dans un mélange eau alcool (50/50) + détergent hellmanex (1ml)
  - sortir les lames une par une, les rincer à l'eau distillée, à l'alcool puis les sécher sous flux d'air.
- nettoyer la surface conductrice[3] de deux lames ITO au chloroforme
- Etaler environ 10$\mu$L du mélange de lipide sur une surface de $\approx$ 1cm$^2$ au centre de chaque lame ITO (côté conducteur) à l'aide d'une pipette Hamilton[4]

1. Sortir les lipides du congélateur à l'avance et mettre de l'argon avant de reboucher les flacons.
2. Le mélange peut être conservé au congélateur pour plusieurs utilisations. Attention toutefois d'utiliser des flacons compatibles avec le chloroforme (bouchons en Teflon ou en PTFE).
3. A repérer à l'aide d'un multimètre
4. Des irisations apparaissent, il faut essayer de former des irisations vertes les plus homogènes possibles.

- Mettre les lames dans une pompe à vide (30 minutes) à l'abri de la lumière pour enlever le chloroforme.
- Pendant ce temps préparer une solution de Sucrose à 220mM
- Former une chambre de pousse scellée à l'aide d'une pâte étanche (Vitrex (Modulhor)), et de deux espaceurs de 1mm permettant le contact électrique avec chaque lame ITO.
- Remplir la chambre de la solution de sucrose.
- Faire pousser les vésicules géantes en appliquant une tension sinusoïdale de 2V crête à crête, 10Hz, pendant 4 heures à l'aide d'un générateur basse fréquence.
- Les vésicules se conservent dans la chambre de pousse environ une semaine à 4°C.

# Chapitre 15

# Protocoles bactériophage T5

## 15.1 Mise en place d'un assay *in vitro* d'éjection de l'ADN de T5 en virus unique

### 15.1.1 Principe

Le principe général de ces expériences est de suivre le processus d'éjection de l'ADN du phage à l'échelle du virus unique. Les phages sont d'abord incubés en présence de FhuA puis immobilisés sur une surface. Pour révéler l'éjection de l'ADN, une molécule fluorescente marquant l'ADN est ajoutée dans le buffer. La capside du phage est imperméable aux molécules utilisées, ce qui permet de ne marquer que l'ADN qui est à l'extérieur du phage. (voir figure 15.1)

Ces expériences sont réalisées en cellule de flux, ce qui permet :
- de changer facilement et rapidement de buffer
- d'étirer la molécule d'ADN au fur et à mesure de son éjection.

#### 15.1.1.1 Montage expérimental

Une cellule de flux (ibidi $\mu$-Slide VI 0.4) est placée sur le plateau d'un microscope inversé (Zeiss Axioplan 200) équipé d'une caméra EMCCD (Andor iXon) et d'un dispositif de visualisation de fluorescence. L'objectif de microscope est un Zeiss 40x d'ouverture numérique 1.2. Un pousse-seringue (WPI) est utilisé afin de contrôler le flux de solution dans la chambre de flux. La caméra Andor a un capteur de 512*512 pixels, d'une dimension de $16\mu m * 16\mu m$. Au 40x, un champ d'observation correspond donc à un coté de $200\mu m$.

#### 15.1.1.2 Mesure de la longueur d'ADN éjectée

Lorsque les éjections d'ADN sont réalisées sous flux, une force de cisaillement est exercée sur l'ADN qui s'allonge dans le flux. Il est possible d'extraire la longueur d'ADN étendue dans

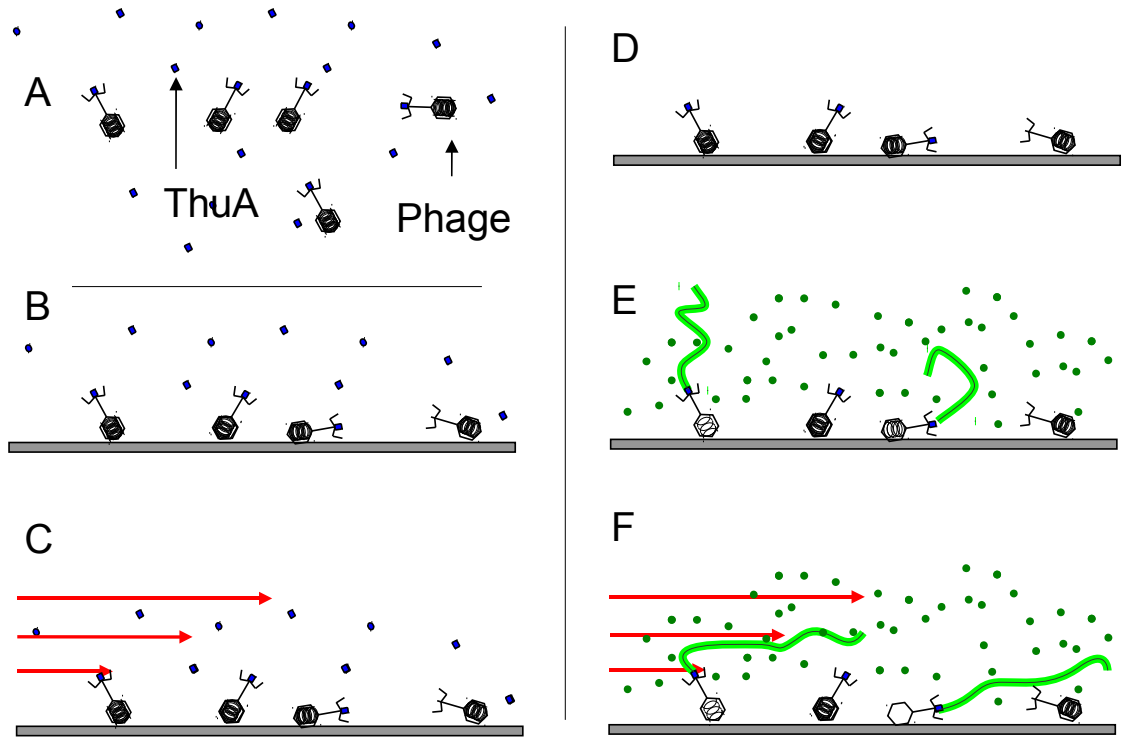



**Figure 15.1** – Principe des expériences en virus unique

le flux en fonction du temps. Pour ce travail un peu fastidieux, un plugin a été écrit sur le logiciel ImageJ qui permet d'effectuer une mesure semi automatique de la longueur éjectée en fonction du temps. Le fond fluorescent est soustrait pour chaque image à partir de la moyenne de l'intensité de l'image. En effet, les molécules d'ADN étant assez dispersées sur chaque image, la fluorescence moyenne de l'image est peu éloignée du fond réel. Le plugin permet, à partir d'un segment grossièrement défini par l'utilisateur sur la molécule d'ADN, d'optimiser localement la position du segment afin de maximiser son rapport signal/bruit. Le signal de fluorescence d'un segment est égal à l'intensité intégrée de long de ce segment. Le bruit est proportionnel à la racine de la longueur du segment. Le segment optimal est trouvé en cherchant le segment ayant le meilleur rapport d'intensité intégrée sur la racine de la longueur du segment.

**Calibration de l'étirement de l'ADN en cellule de flux** La longueur apparente de l'ADN a été mesurée en fonction du taux de cisaillement appliqué dans la chambre de flux et en fonction de la longueur de l'ADN. La dépendance de l'allongement des molécules d'ADN dans les chambres de flux est complexe [85]. Il n'y a pas de loi facilement applicable pour retrouver la longueur de la molécule d'ADN en kbp en fonction de la longueur apparente. C'est pourquoi la méthode la plus judicieuse pour y remonter est de mesurer l'étirement de molécules de longueur connues pour ensuite pouvoir inverser cette relation. Voir figure 15.2, pour les courbes de calibration.

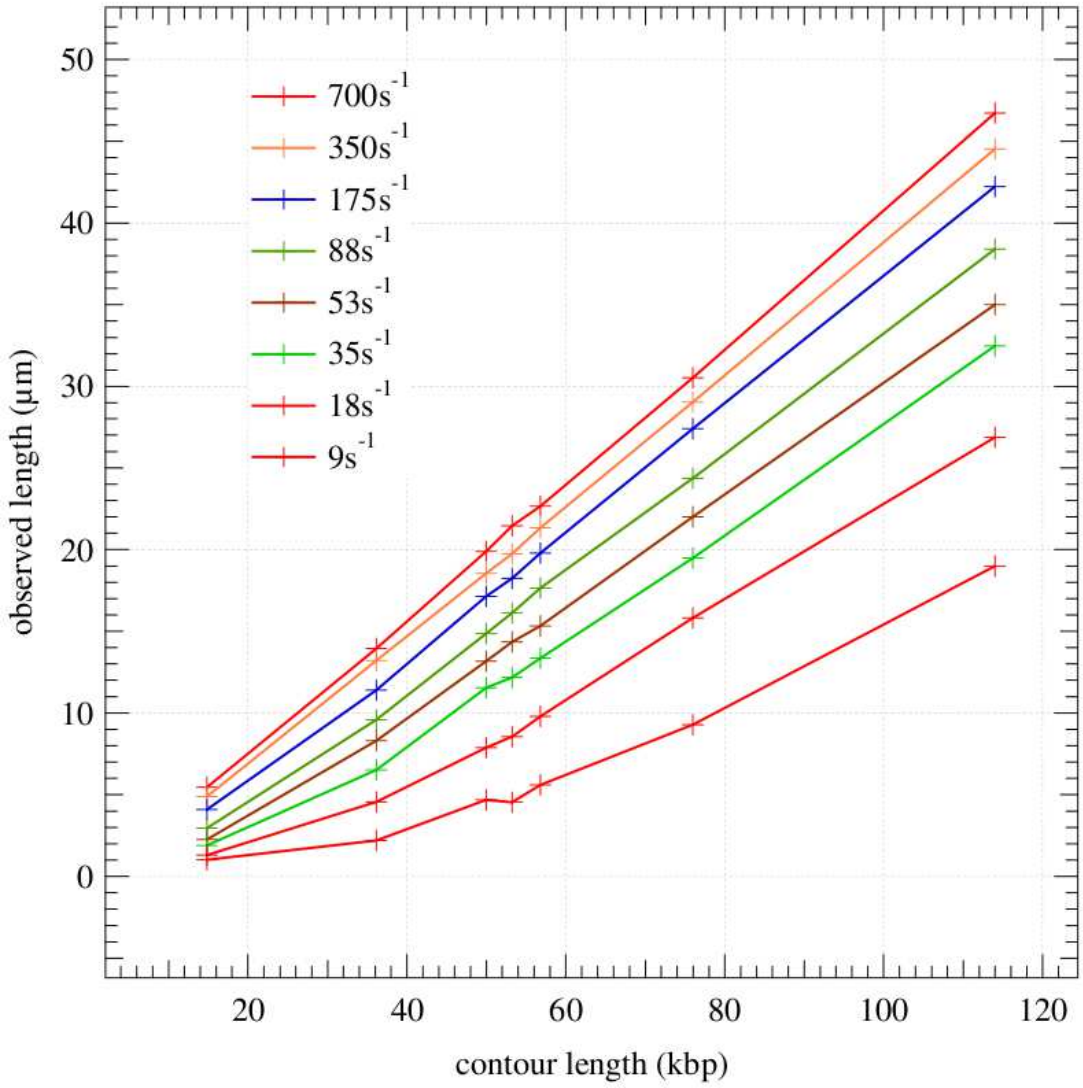



**Figure 15.2** – Courbe de calibration d'extension de l'ADN en cellule de flux. 7 ADNs de longueur connue sont étirés dans une chambre de flux. Le buffer utilisé est le tampon phage avec Sybr Green I (1x). L'extension est mesurée en fonction du taux de cisaillement. Le taux de $53s^{-1}$ correspond au flux de $300\mu L.min^{-1}$ couramment utilisé dans les expériences d'éjection en molécule unique.

#### 15.1.1.3 Mesure de la quantité d'ADN éjectée par intégration de fluorescence

Une autre méthode permettant de mesurer la cinétique d'éjection consiste à mesurer l'augmentation de fluorescence liée à l'éjection de l'ADN. Dans cette méthode la fluorescence intégrée est mesurée au cours du temps sur un rectangle entourant la molécule d'ADN apparente. Le fond fluorescent est soustrait en mesurant la fluorescence moyenne sur un carré proche de l'éjection. La courbe est alors normée en divisant l'intensité de fluorescence par la fluorescence finale. [1] De plus afin de réduire le bruit, l'intensité de fluorescence est intégrée sur 3 surfaces de taille croissante au fur et à mesure que l'ADN s'étend. La résolution est donc meilleure au début de l'éjection qu'à la fin, ce qui explique l'augmentation du bruit au cours de l'éjection (voir figures 10.2, par exemple). Le détail du traitement sur un exemple est montré figure 15.3.

#### 15.1.1.4 Comparaison des deux méthodes

Théoriquement, la méthode par mesure de longueur est limitée par la résolution optique. $500nm$ représentant environ 1,5kb d'ADN étiré, il s'agit de la résolution maximale. En pratique plusieurs problèmes se présentent :

- les fluctuations limitent fortement cette résolution. L'ADN fluctue beaucoup lorsqu'il est étiré. Ces fluctuations sont d'origine thermique mais elles sont aussi dues aux fluctuations du débit de tampon. Pour limiter ces fluctuations, il faudrait imposer un débit plus fort, ce qui réduirait les fluctuations thermiques et les fluctuations liées au débit. Cela demanderait néanmoins une quantité importante de buffer, et de plus, la force exercée par le flux viendrait peut être modifier la cinétique d'éjection.
- De plus, lorsque peu d'ADN est éjecté, il est très difficile de l'étendre, car la force exercée sur l'ADN dépend de la longueur de la molécule. Etant peu étiré, la résolution est mauvaise pour le début de l'éjection.
- Enfin, la présence d'éjections "en boucle" (voir section 10.5) réduit encore la résolution de la méthode.
- Enfin, lorsque l'on compare les courbes obtenues avec les 2 méthodes, on voit distinctement qu'il existe un retard de cette méthode par rapport à l'autre (voir figure 10.9 pour un exemple). En effet, l'ADN est éjecté beaucoup plus rapidement qu'il n'est étendu par le flux.

La méthode par intégration de fluorescence supprime nombre de ces inconvénients : elle est peu sensible aux fluctuations de la molécule. Il reste néanmoins nécessaire que l'ADN reste dans le plan focal d'observation, ce qui est réalisé si la molécule est étirée sous flux. La résolution optique ne limite pas la résolution en terme de quantité d'ADN. Le bruit dépend de la surface d'intégration. La résolution est donc meilleure lors de l'initiation de l'éjection, puis diminue petit à petit. L'éjection en boucle est un avantage pour cette méthode puisque la surface d'intégration est réduite, ce qui diminue le bruit.
Néanmoins, la méthode par mesure de longueur n'est pas dénuée d'intérêt. Elle a permis de vérifier l'éjection en boucle. C'est de plus une méthode pour contrôler le fait que lorsque l'intensité ne varie plus, c'est que tout l'ADN a été éjecté. Enfin on peut vérifier que le mutant T5amHA911 a un ADN 8% plus grand que T5st(0).

1. La visualisation de la longueur d'ADN éjectée permet de s'assurer que tout l'ADN a bien été éjecté.

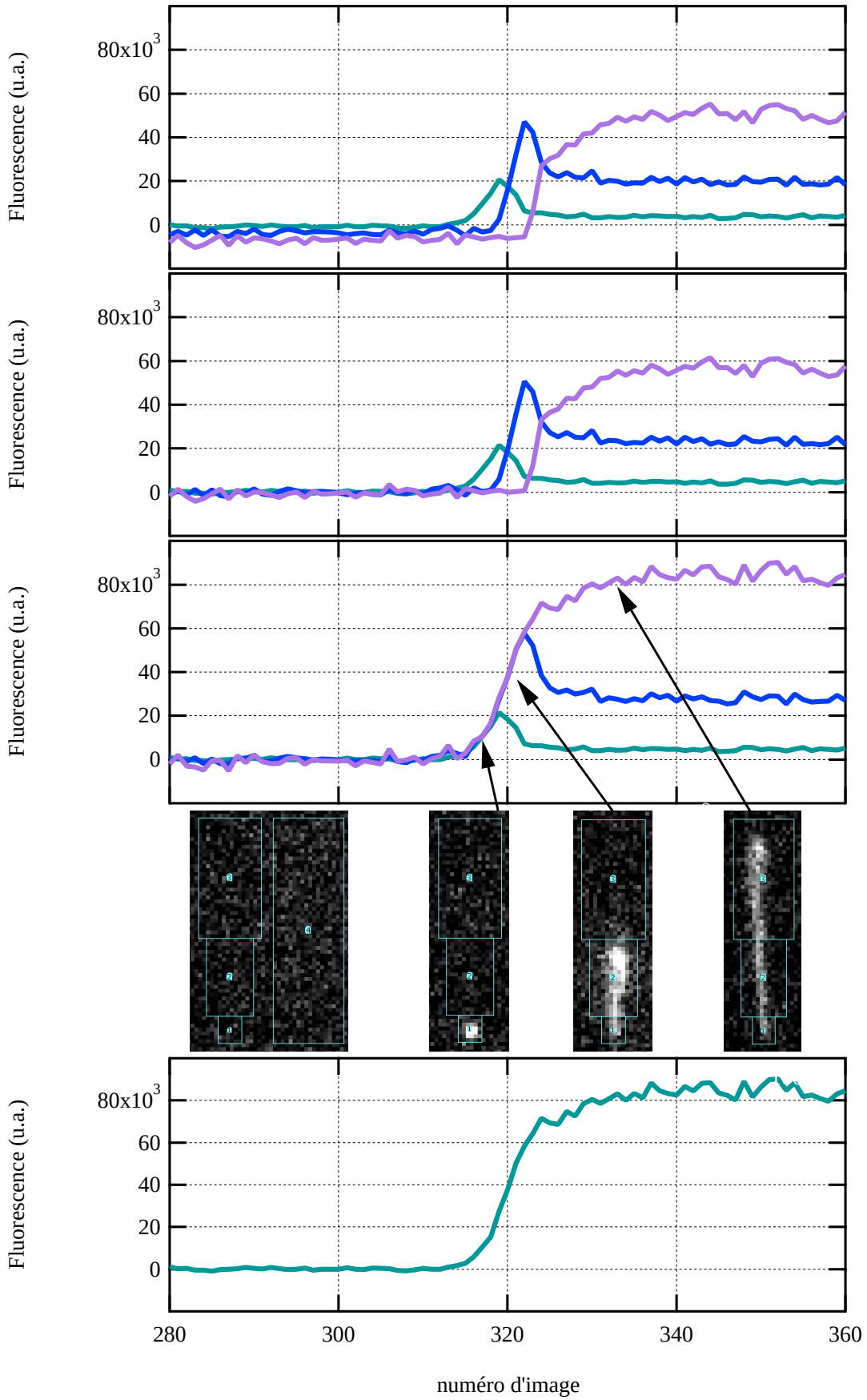



**Figure 15.3** – 10 images par secondes

### 15.1.2 Difficultés expérimentales

#### 15.1.2.1 Cassures photoinduites des molécules d'ADN

Le dioxygène est l'ennemi principal des expériences de fluorescence. En effet les molécules fluorescentes peuvent réagir avec $O_2$ dissous dans le buffer et induire des cassures le long de l'ADN.[2] Il faut donc limiter cet effet. Trois solutions complémentaires peuvent être utilisées :

- dégazer les solutions utilisées afin d'enlever le maximum d'oxygène dissous,
- ajouter dans la solution un agent réducteur limitant la réactivité de $O_2$ (DTT, $\beta$-mercaptoéthanol, trollox),
- utiliser un mélange de réactifs (catalase, glucose oxydase, glucose) permettant de capturer l'oxygène du milieu, la réaction est la suivante :
  Réaction de la catalase :
  $$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$
  Réaction de la glucose oxydase :
  $$Glucose + O_2 \rightarrow Gluconolactone + H_2O_2$$
  Soit au final, les 2 réactions conjuguées permettent de piéger l'oxygène suivant la réaction suivante :
  $$2Glucose + O_2 \rightarrow 2Gluconolactone + 2H_2O$$

Le protocole qui suit et qui permet de préparer une solution limitant les cassures photoinduites d'ADN nous a été généreusement fourni par Pierre Desbiolles (Laboratoire Kastler Brossel, ENS).

2. Dans nos expériences, l'ADN séquestré dans la capside est protégé des molécules fluorescentes. Ce qui limite d'autant le risque de cassures d'ADN avant que l'éjection ait lieu.

**Matériel**

- PIPES
- $H_2O_2$
- Glucose
- Catalase (Sigma C100)
- Glucose Oxidase (Sigma G2133)
- DTT (Sigma 43815)

**Préparation**

- Catalase
  - Conservation : 1 semaine sur la paillasse.
  - On peut extraire de la bouteille (seringue/aiguille) environ 20 $\mu$L de la solution
  - On teste l'activité de la catalase en mettant $0.5\mu L$ de la solution dans 1mL d'eau oxygénée à 30%[3] diluée 10 fois dans le tampon phage. On doit observer de grosses bulles.
- Glucose Oxydase
  - Conservation : quelques jours à 4°C
  - préparer une solution à 10mg/ml dans un buffer Pipes 50mM pH6.8, NaCl 20mM
  - Aliquoter par $50\mu L$, conserver à -20°C
- DL-Dithiothreitol (DTT)
  - Préparer une solution à 1M dans PIPES 50mM pH 6.8, NaCl 20mM
  - Aliquoter par $100\mu L$
  - Conservation : quelque jours à 4°C
- Glucose
  - Solution à 20% dans le tampon phage.

**Utilisation** Pour 100$\mu$L de solution

- 5$\mu$L de glucose oxydase
- 1$\mu$L de catalase
- 5$\mu$L de glucose
- 5$\mu$L de DTT
- 84$\mu$L du reste

Ne pas mettre d'EDTA car les bactériophages doivent avoir du calcium pour leur stabilité.

3. Pour vérifier que l'eau oxygénée est "bonne", peser 1mL de l'eau oxygénée à 30% : vous devez trouver 1.1g avec une balance de précision.

#### 15.1.2.2 Baisse du pH liée à la séquestration du dioxygène

Un effet secondaire de la réaction de séquestration de l'oxygène est la baisse de pH du milieu. Le *Gluconolactone* produit est un acide. Lors de nos premières expériences, le pH diminuait tellement que les charges des ADNs se sont retrouvé neutralisées au bout d'une heure d'expérience ! Typiquement la concentration de Gluconolactone peut atteindre la concentration initiale de Glucose, qui est de 50mM. Afin de prévenir le problème, la solution tampon pour les longues expériences d'éjection est modifiée de façon à avoir un pouvoir tampon plus grand. La concentration en Tris est ainsi de 100mM pour le protocole d'éjection pour les longues durées (15.1.3.2) par rapport à 10mM pour le protocole court (15.1.3.1). Nous avons aussi essayé de limiter la diffusion d'oxygène en recouvrant le réservoir contenant le tampon d'huile minérale. Nous avons abandonné cette technique car l'huile minérale est incompatible avec la cellule de flux ibidi.

#### 15.1.2.3 Diffusion intracapside du marqueur fluo d'ADN

Différent marqueurs d'ADN ont été testés afin de trouver celui qui diffuse le moins dans les capsides. Yo-Pro I, Yo-Yo I et Sybr Green I ont été testés. Nous avons trouvé que le Sybr Green I est la molécule qui diffuse le moins dans les capsides de phages.[4] L'utilisation de l'antibleacher est indispensable avec ce marqueur car, en l'absence de celui-ci, les ADNs éjectés se cassent en quelques secondes. La présence de l'antibleacher change radicalement ce comportement, plusieurs minutes en éclairement maximum peuvent s'écouler avant d'observer une cassure d'ADN double brin.

#### 15.1.2.4 Accessibilité phage-récepteur

Nous n'avons jamais réussi à fixer d'abord les phages sur la surface de la cellule puis à les faire éjecter après ajout de FhuA. C'est pourquoi nous préincubons les phages avec FhuA à 4°C avant de les disposer sur la chambre ibidi.

### 15.1.3 Protocoles

#### 15.1.3.1 Cinétique courte / 5 minutes

4. Une étude détaillée de la diffusion intracapside a été réalisée précédemment [32], mais elle n'incluait pas le Sybr Green I.

**Matériel**

- Tampon phage (section B.1)
- OG, solution à 20%
- Aliquot de FhuA (50$\mu$M), sur glace
- Aliquot de Phages T5 [$10^{13} pfu/ml$ T5st(0) ou $2.10^{12} pfu/ml$ T5amHA911], sur glace
- Aliquot de marqueur d'ADN fluo dans DMSO [Yo-Pro I 1mM ou SYBR Green I 10000x] [5]
- Aliquots pour l'antibleacher (section 15.1.2.1)
  - 100$\mu$L Glucose Oxydase
  - 20$\mu$L Catalase
  - 100$\mu$L Glucose.
  - 50$\mu$L DTT
- Filtres (seuil à 0.3$\mu$m)
- Seringues 1ml, 5ml, 10ml
- Tuyau tygon
- Cellule de flux ibidi $\mu$-Slide VI 0.4

**Préparatifs**

- Vérifier la température de la pièce
- Mettre 1ml de tampon phage dans un tube eppendorf sur glace (tube de pré-dilution)
- Lavage de la cellule de flux
  - Laver les chambres de la cellule de flux à l'isopropanol, 10 minutes à l'aide de seringues 1mL
  - Rincer à l'eau distillée et à l'alcool
  - Sécher sous flux d'air
- Acquisition des données
  - Lancer l'ordinateur
  - Lancer le logiciel de capture du flux vidéo (VI Virnanomotor)
  - Lancer le logiciel de contrôle de la platine motorisée (VIs Controle platine)
- Allumer la source lumineuse (UVICO Rapp Optoelectronics) [6]
- Mettre en place la cellule de flux sur le microscope
- Préparation du circuit fluidique
  - Mettre une seringue 10ml sur le pousse-seringue
  - Relier cette seringue à la sortie de la chambre de flux à l'aide du tygon
  - Connecter une seringue 5ml en "réservoir" à l'entrée de la chambre de flux
  - Rincer la chambre avec 1ml de tampon phage 1x en laissant un petit ménisque de buffer dans le réservoir
- Déplacer la platine pour se mettre au centre de la chambre de flux
- Faire approximativement la mise au point sur la surface de la chambre
- Régler le pousse-seringue pour une aspiration de 200$\mu$L à 900$\mu$L/min [7]

**Réglages**

- Température de la pièce = 24°C
- Régler la puissance de la source (typiquement au 2/3 de la puissance maximale)

5. la température de fusion du DMSO est de l'ordre de 20°C, il faut donc bien réchauffer cet aliquot pour qu'il soit entièrement liquide

6. Il est préférable de laisser chauffer la lampe 30 minutes afin d'améliorer la stabilité de l'éclairement.

7. Pour l'étape de fixation des phages.

- Régler les paramètres de la vidéo pour la caméra Andor iXon EMCCD :
  - 30fps EMCCD 170 pour le Yo-Pro I
  - 62fps EMCCD 170 binning 2x2 pour le Sybr Green I
- Vitesse du flux pendant l'observation = $300\mu L/min$ (taux de cisaillement = $53s^{-1}$)

**Préparation des solutions**

- A température ambiante.
- Préparation du buffer de fixation de FhuA
  - Dans un tube eppendorf mettre :
  - 80$\mu$L de solution de tampon phage
  - 5$\mu$L d'Octyl-Glucoside (OG) à 20% en masse
  - $10^{10}$ pfu de la solution de phages
- Préparer du "tampon phage fluo" : 10mL de tampon phage, 25$\mu$L de solution d'OG à 20% en masse
- Préparation du buffer d'observation (2ml totaux $\approx$ 6 minutes d'acquisition)
  - Dans un conteneur adapté, mélanger :
  - 2*840$\mu$L de tampon phage fluo
  - 2$\mu$L de Yo-Pro I ou 2$\mu$L de Sybr Green I prédilué 10 fois
  - Mélanger puis ajouter les ingrédients de l'antibleacher
    - 100$\mu$L de Glucose Oxydase
    - 20$\mu$L de Catalase
    - 100$\mu$L de Glucose
    - 50$\mu$L de DTT

**A vérifier**

- Vérifier l'absence de bulle dans le circuit fluidique
- Vérifier le réglage du diamètre seringue (13.34mm pour 10ml)
- Vérifier la position du diaphragme de champ et d'ouverture
- Vérifier l'ouverture numérique de l'objectif
- Vérifier la position du cube fluorescent
- Vérifier que le microscope envoie la lumière sur la caméra
- Vérifier le répertoire d'enregistrement de la vidéo

La suite du protocole nécessite d'être effectuée rapidement afin de ne pas "rater" les premières éjections, qui sont aussi les plus nombreuses.

**Fixation de FhuA sur les phages**

- Prélever 10 $\mu$L du buffer de fixation de FhuA, ajouter 0.2$\mu$L de la solution stock de FhuA
- Vortexer légèrement et attendre 1 minute

**Fixation des phages et lancement de l'acquisition**

- Diluer les 10$\mu$L du mélange phage FhuA dans le ml du tube de pré-dilution resté à 4°C
- Remplir le réservoir de la chambre de flux avec 300$\mu$L de cette solution
- A l'aide du pousse-seringue préparé précédemment, introduire la solution dans la chambre de flux. (Les phages s'adsorbent de manière irréversible à la surface).

- Retirer le surplus de solution du réservoir tout en laissant un léger ménisque.
- Aspirer à l'aide d'une seringue le buffer d'observation puis mettre un filtre au bout de la seringue.
- Insérer ces 2ml dans le réservoir en les filtrant
- (facultatif) Déposer une cloche sur le montage pour le protéger de la lumière parasite.
- Démarrer le flux de buffer du pousse-seringue (300$\mu$L/min)
- Démarrer l'acquisition de la vidéo
- Vérifier la mise au point du microscope au début de la vidéo

#### 15.1.3.2 Cinétique longue / 1H

Protocole quasi identique au précédent. La cinétique d'éjection est suivie sur plus d'une heure pour comptabiliser les phages. Les modifications sont surlignées en jaune.

## 15.1 Mise en place d'un assay *in vitro* d'éjection de l'ADN de T5 en virus unique167

### Matériel

- Tampon phage AB (section B.1)
- OG, solution à 20%
- Aliquot de FhuA (50$\mu$M), sur glace
- Aliquot de Phages T5 [$10^{13} pfu/ml$ T5st(0) ou $2.10^{12} pfu/ml$ T5amHA911], sur glace
- Aliquot de marqueur d'ADN fluo dans DMSO SYBR Green I 10000x
- Aliquots pour l'antibleacher (section 15.1.2.1)
  - 100$\mu$L Glucose Oxydase
  - 20$\mu$L Catalase
  - 100$\mu$L Glucose.
  - 50$\mu$L DTT
- Filtres (seuil à 0.3$\mu$m)
- Seringues 1ml, 5ml, 10ml
- Tuyau tygon
- Cellule de flux ibidi $\mu$-Slide VI 0.4

### Préparatifs

- Vérifier la température de la pièce
- Mettre 1ml de tampon phage dans un tube eppendorf sur glace (tube de pré-dilution)
- Lavage de la cellule de flux
  - Laver les chambres de la cellule de flux à l'isopropanol, 10 minutes à l'aide de seringues 1mL
  - Rincer à l'eau distillée et à l'alcool
  - Sécher sous flux d'air
- Acquisition des données
  - Lancer l'ordinateur
  - Lancer le logiciel de capture du flux vidéo (VI Virnanomotor)
  - Lancer le logiciel de contrôle de la platine motorisée (VIs Controle platine)
- Allumer la source lumineuse (UVICO Rapp Optoelectronics)
- Mettre en place la cellule de flux sur le microscope
- Préparation du circuit fluidique
  - Mettre une seringue 10ml sur le pousse-seringue
  - Relier cette seringue à la sortie de la chambre de flux à l'aide du tygon
  - Connecter une seringue 5ml en "réservoir" à l'entrée de la chambre de flux
  - Rincer la chambre avec 1ml de tampon phage 1x en laissant un petit ménisque de tampon dans le réservoir
- Déplacer la platine pour se mettre au centre de la chambre de flux
- Faire approximativement la mise au point sur la surface de la chambre
- Régler le pousse-seringue pour une aspiration de 200$\mu$L à 900$\mu$L/min[8]

### Réglages

- Température de la pièce = 24°C
- Régler la puissance de la source (typiquement 10% de la puissance maximale)
- Temps d'exposition par image 0.5s EMCCD 170 (pour moyenner les fluctuations)
- Aucun flux pendant l'observation

8. Pour l'étape de fixation des phages.

**Préparation des solutions**

- A température ambiante.
- Préparation du buffer de fixation de FhuA
  - Dans un tube eppendorf mettre :
  - 80$\mu$L de solution "tampon phage"
  - 5$\mu$L d'Octyl-Glucoside (OG) à 20% en masse
  - $5.10^{10}$ pfu de la solution de phages
- Préparer du "tampon phage fluo" : 10mL de Tampon phage AB, 25$\mu$L de solution d'OG à 20% en masse
- Préparation du buffer d'observation
  - Dans un conteneur adapté, mélanger :
  - 2*840$\mu$L de tampon phage fluo
  - 0.5$\mu$L de Sybr Green I
  - Mélanger puis ajouter les ingrédients de l'antibleacher
    - 100$\mu$L de Glucose Oxydase
    - 20$\mu$L de Catalase
    - 100$\mu$L de Glucose
    - 50$\mu$L de DTT

**A vérifier**

- Vérifier l'absence de bulle dans le circuit fluidique
- Vérifier la position du diaphragme de champ et d'ouverture
- Vérifier l'ouverture numérique de l'objectif
- Vérifier la position du cube fluorescent
- Vérifier que le microscope envoie la lumière sur la caméra
- Vérifier le répertoire d'enregistrement de la vidéo

La suite du protocole nécessite d'être effectuée rapidement afin de ne pas “rater” les premières éjections, qui sont aussi les plus nombreuses. Autrement la statistique serait fortement tronquée.

**Fixation de FhuA sur les phages**

- Prélever 10 $\mu$L du buffer de fixation de FhuA, ajouter 0.2$\mu$L de la solution stock de FhuA
- Vortexer légèrement et attendre 1 minute

**Fixation des phages et lancement de l'acquisition**

- Diluer les 10$\mu$L du mélange phage FhuA dans le ml du tube de pré-dilution resté à 4°C
- Remplir le réservoir de la chambre de flux avec 300$\mu$L de cette solution
- A l'aide du pousse-seringue préparé précédemment, introduire la solution dans la chambre de flux. (Les phages s'adsorbent de manière irréversible à la surface).
- Retirer le surplus de solution du réservoir tout en laissant un léger ménisque.
- Aspirer à l'aide d'une seringue le buffer d'observation puis mettre un filtre au bout de la seringue.
- Insérer ces 2ml dans le réservoir en les filtrant

- Rincer à l'aide du pousse-seringue[9] [10]
- Prendre des photos du champ de vue à intervalles de temps de plus en plus grand :[11]
  - toutes les 30 secondes
  - toutes les minutes
  - toutes les 2 minutes
  - ...
- En l'absence d'autofocus, vérifier la mise au point au long de l'expérience

9. Pour éliminer au maximum la présence de phages "libres" en solution, il est conseillé de ne pas prendre les 2 ml tout de suite, mais de mettre 500$\mu$L par 500$\mu$L dans le réservoir et de faire plusieurs étapes successives de rinçage. L'absence de phage en solution peut se voir par l'absence de points fluorescents diffusants lorsque l'on s'éloigne de la surface.

10. Il est conseillé de commencer à prendre des photos alors que le rinçage est en train de s'effectuer pour ne pas rater les premières éjections.

11. La fréquence d'éjection est très grande au début, puis diminue petit à petit.

## 15.2 Etude de la cinétique d'éjection en population par fluorimétrie

#### 15.2.0.3 Principe

Cette partie explique la mise en œuvre du suivi de la cinétique d'éjection par fluorimétrie. De même que pour les expériences en virus unique son principe repose sur le marquage fluorescent de l'ADN éjecté des capsides. Cependant la cinétique est suivie sur une population de phages, typiquement de l'ordre de $10^9$ phages par mL et les phages ne sont pas fixés sur une surface mais baignent dans le tampon.

Le tampon est composé de tampon phage 1x, du détergent LDAO(0.06%) et de Sybr Green I 1x. Nous mettons ce tampon dans une cuve de fluorimétrie. Après une attente d'environ 1min, nous ajoutons les phages (T5st(0) ou T5amHA911). Après un délai de 500s, nous ajoutons 8$\mu$L de FhuA à la concentration choisie.

#### 15.2.0.4 Protocole fluorimétrie

**Préparation du tampon**

- Préparer 4mL de tampon phage 1x complété avec du LDAO à 0.06% et ajouter 0.4$\mu L$ de Sybr Green I (1x final)
- Bien mélanger le sybr en faisant attention à la mousse
- Aliquoter par 200 $\mu L$
- Se conserve à 4°C une semaine

**Préparation des phages et de FhuA**

- Phages T5st(0) : préparer une solution de phages prédiluée 100 fois par rapport au stock (stock à $10^{13} pfu/ml$)
- Phages T5amHA911 : préparer une solution de phage prédiluée 20 fois par rapport au stock (stock à $2.10^{12} pfu/ml$)
- FhuA : diluer dans un buffer contenant 0.06% de LDAO la solution stock de FhuA de manière à ce que 8$\mu$L de la solution soient ajoutés à la cellule de flux pour atteindre la concentration désirée

**Nettoyage des cuves de fluorescence**

- Rincer 1h à l'hellmanex à 1% 60°C
- Bien rincer ($ddH_2O$ puis alcool avant de sécher sous flux d'air)

**Paramètres du fluorimètre** Pour Sybr Green I

- Fente d'excitation : 498nm, largeur 2nm
- Fente d'émission : 520nm, largeur 2nm
- 10s entre chaque mesure, shutter activé
- 0.5s de temps d'exposition
- Thermostaté à 37°C ou à 24°C
- Durée de la mesure : 2 heures

**Démarrage de l'acquisition**

- Tout au long de l'expérience boucher la cellule de fluorescence pour limiter l'évaporation
- Mettre 150$\mu L$ de buffer dans la cuve
- Commencer la mesure
- Attendre 1 min
- Ajouter 1$\mu$L de la solution diluée de phages
- Mélanger 2-3 fois à la pipette sans faire de bulles obstruant le chemin optique
- Attendre 10 minutes [12]
- Ajouter 8$\mu L$ de la solution de FhuA
- Mélanger 2-3 fois à la pipette sans faire de bulles pouvant obstruer le chemin optique

12. Si la fluorescence augmente de manière non négligeable, c'est que FhuA n'a pas été bien rincé lors de l'expérience précédente.

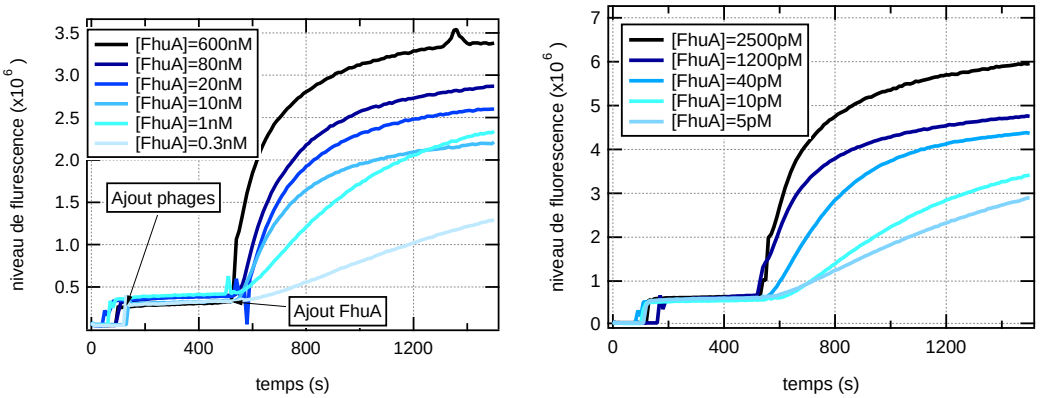



**Figure 15.4** – Données brutes de fluorescence pour T5st(0) (gauche) et T5amHA911 (droite).

#### 15.2.0.5 Traitement des données brutes

Les données brutes correspondent à la fluorescence du tampon seul, puis au plateau de phages (phages avec tampon) et à partir de 500s, au début de la cinétique par ajout de FhuA à diverses concentrations. A la fin de la cinétique, la courbe atteint un plateau dont le niveau dépend de la concentration en FhuA (cf figure 15.4).

**Signal de fluorescence du buffer seul** La fluorescence du tampon seul est négligeable. Elle représente moins de 1% du signal total.

**Influence des phages sur le signal de fluorescence** Lors de l'ajout des phages, le signal de fluorescence augmente. Cette augmentation peut être attribuée à la présence de quelques ADN libres présents dans la préparation de phages. En effet les phages conservés à 4°C s'abîment lentement avec le temps ; la proportion d'ADN libres en solution augmente d'autant. Ce signal plateau, pouvant représenter 10% du signal total doit être soustrait des données avant normalisation.

**Influence de FhuA sur le signal de fluorescence** Nous nous sommes rendu compte que FhuA induisait également une augmentation de la fluorescence non négligeable lorsqu'il est introduit dans la cellule de fluorimétrie en grande concentration. A $[FhuA] = 1\mu M$, il peut contribuer pour 30% du signal d'éjection totale. L'offset créé par FhuA a été mesuré en l'absence de phages (figure 15.5). Il est soustrait des courbes, de même que le plateau de phage (figure 15.6).

#### 15.2.0.6 Vérification de la linéarité du signal en fonction de la quantité d'ADN

Nous nous sommes assurés de la linéarité du signal de fluorescence vis à vis de la quantité d'ADN. Cela permet de vérifier que d'une part, le capteur du fluorimètre fonctionne dans le

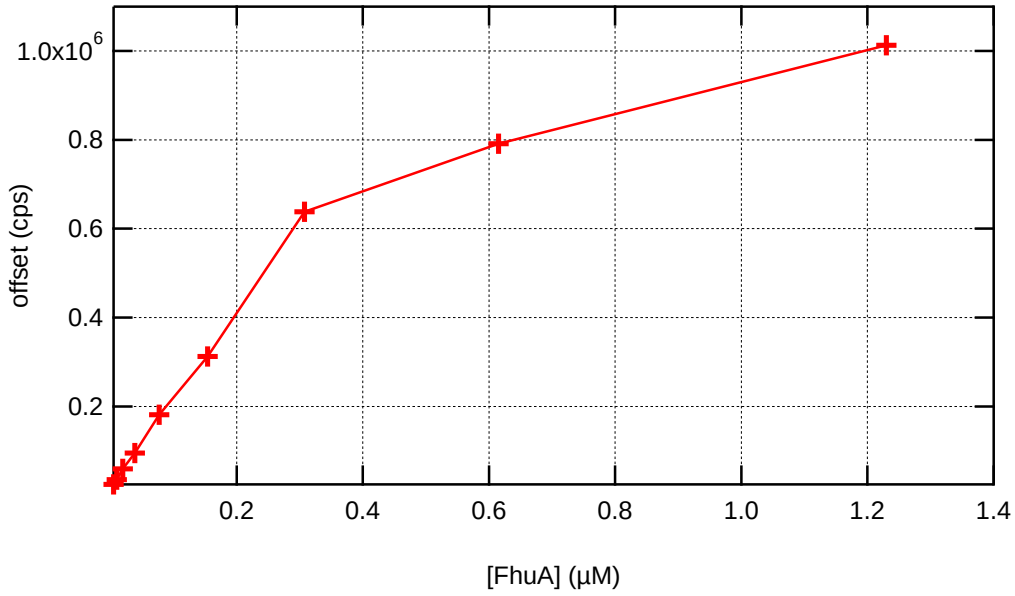



**Figure 15.5** – Offset FhuA

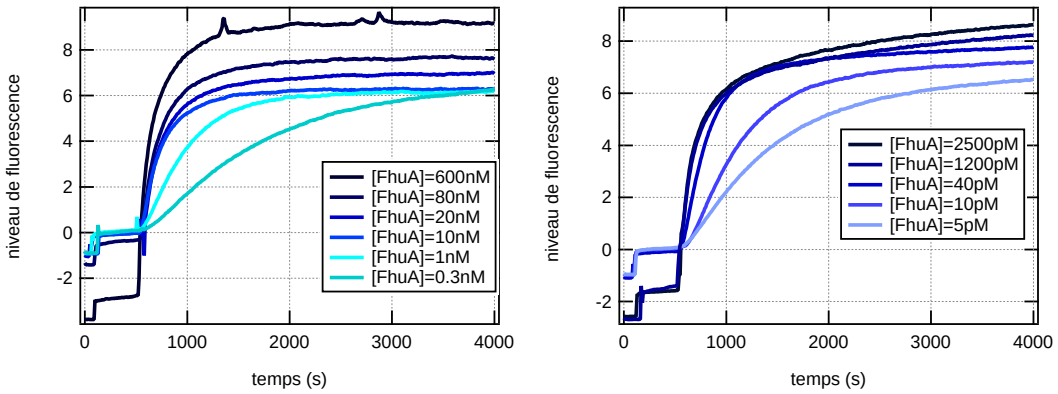



**Figure 15.6** – Cinétique corrigées du plateau de phage et de l'offset induit par FhuA pour T5st(0) (gauche) et T5amHA911 (droite).

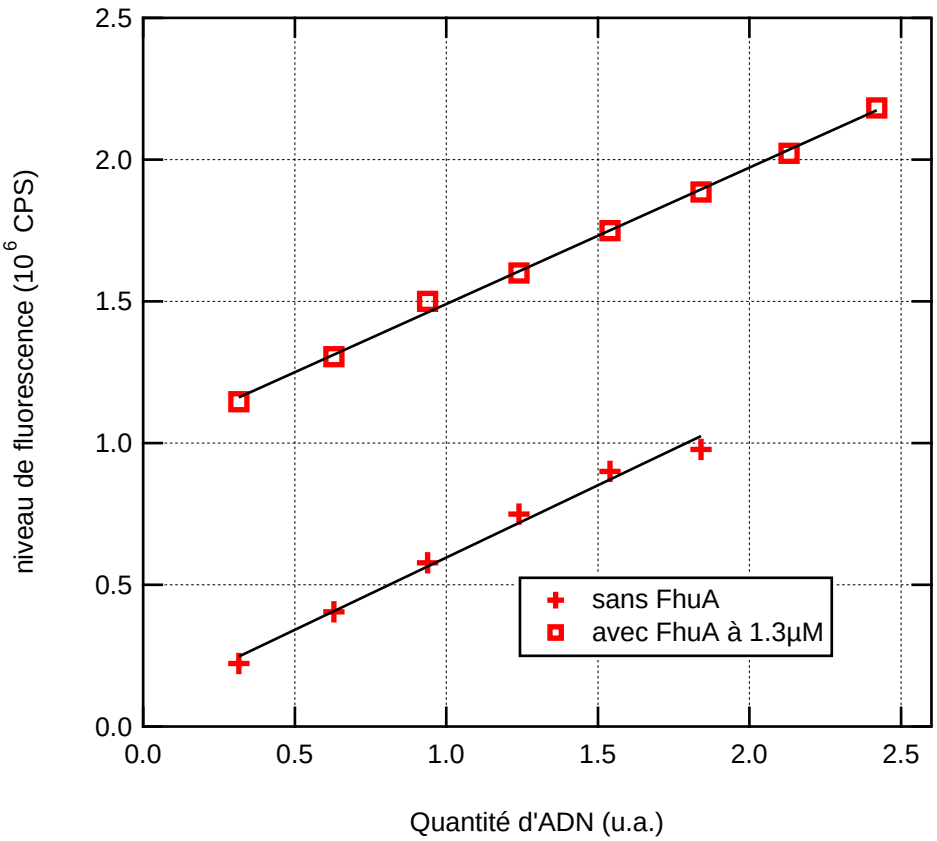



**Figure 15.7** – Offset FhuA

régime linéaire et d'autre part que le nombre de molécules de marqueur fluorescent est en quantité suffisante. La figure 15.7 montre que nous sommes bien dans le régime linéaire.

Sur cette figure nous montrons aussi qu'il n'y a pas d'interaction gênante entre le Sybr Green I, FhuA et l'ADN car même à la concentration maximale de FhuA utilisée, la fluorescence est linéaire avec la quantité d'ADN et ce avec sensiblement le même coefficient directeur (5% d'écart). Nous observons dans les deux cas, présence et absence de FhuA, des droites à peu près parallèles. La pente avec FhuA est de $1,06.10^{14}$ et la pente sans FhuA est de $1,12.10^{14}$. Nous pouvons en déduire qu'il n'existe pas d'interaction particulière entre l'ADN et FhuA qui falsifierait nos cinétiques.

Notons, cependant, que l'ajout d'ADN dans une solution contenant du buffer, du LDAO et du FhuA, provoque une augmentation du niveau de fluorescence suivie d'une rapide décroissance (100s environ) puis d'une lente décroissance (≈plateau). C'est la valeur moyenne de ce plateau qui a été prise en considération pour ces mesures (figure 15.8). Ce phénomène est récurrent.

#### 15.2.0.7 Difficulté des comparaisons quantitatives inter-expériences

Nous aurions voulu ne pas avoir besoin de normaliser les expériences d'éjection en effectuant des expériences d'éjections toujours avec les mêmes quantités de phages. Malheureusement, il

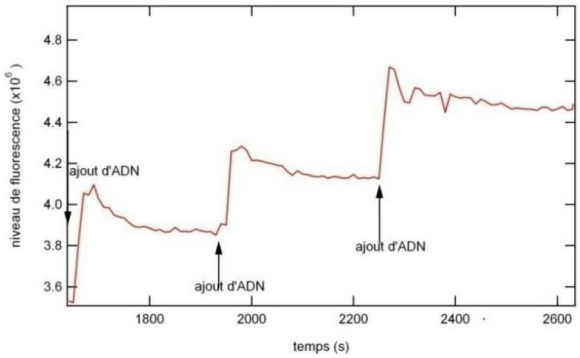



**Figure 15.8** – Ajout d'ADN dans une solution contenant le tampon phage, le LDAO et FhuA.

est apparu qu'il est très difficile, même en répétant plusieurs fois des expériences très simples d'obtenir des niveaux similaires de fluorescence (variation $> 10\%$).

**Mesures d'incertitude à la fluorescéine** Pour pouvoir comparer les niveaux de fluorescence des cinétiques d'éjection, nous devons estimer les incertitudes de mesure.

Nous avons mis dans une cuve de spectrofluorimètre : 150$\mu$L de buffer tampon à pH=7,6 et 10$\mu$L de fluorescéine faiblement concentrée (pour être dans le régime linéaire du fluorimètre). Les mesures ont été faites à T=37°C, dans les mêmes conditions de travail que pour les cinétiques d'éjection. Le pic d'excitation de la fluorescéine est centré sur 488nm et celui d'émission sur 513nm, ce qui est proche des pics du Sybr Green I utilisé pour les cinétiques. Nous effectuons 5 mesures pour lesquelles les mêmes dilutions sont toujours refaites. A chaque mesure, nous enregistrons la variation de la valeur de fluorescence. Elle fluctue d'environ 5%. La valeur moyenne varie de 7% entre les mesures. Globalement, l'incertitude peut être estimée à 12%.

**Méthode annexe** Nous avons testé une autre méthode pour essayer de réduire cette incertitude et ainsi pouvoir procéder à la renormalisation de nos courbes d'éjection et à la comparaison.

En rajoutant un autre fluorophore dans la solution qui serait stable, i.e. qui n'interviendrait pas dans la cinétique et dont le niveau resterait constant, nous pourrions comparer le niveau du Sybr Green I par rapport à celui-ci. De cette manière, nous pourrions faire abstraction des erreurs de pipetage. Pour cela, il faut choisir un fluorophore dont les pics d'émission et d'excitation sont séparés de ceux de la fluorescéine et du Sybr pour pouvoir déterminer séparément leur contribution. Nous avons choisi l'Alexa 568 (excitation 577nm, émission 603nm). Nous mesurons les valeurs de fluorescence pour l'Alexa et pour la fluorescéine pour chaque cuve et nous analysons les fluctuations du rapport de ces valeurs sur 4 mesures. Nous trouvons une incertitude de l'ordre de 14%. Cette méthode est donc sans intérêt.

**Importance du buffer sur la cinétique d'éjection** La cinétique d'éjection dépend du tampon utilisé, notamment des ions et du surfactant. Pour comparer des cinétiques comme par exemple dans la figure 8.4 du chapitre 8, il est important d'utiliser exactement les mêmes

conditions de tampon.

## 15.3 Marquage fluorescent des phages T5

### 15.3.1 Marquage de l'ADN intra capside par Yo-Pro I

#### 15.3.1.1 Protocole

Il est possible de marquer les phages simplement par diffusion des marqueurs fluorescents d'ADN à travers la capside du bactériophage T5. Il est possible de suivre la cinétique de diffusion dans les capsides de phage unique, en fixant les phages sur une surface et en mesurant la variation de fluorescence au cours du temps. La diffusion du Sybr Green I (1x dans le tampon phage) est imperceptible au bout de 2 heures d'attente. Le Yo-Pro-I (1$\mu$M dans le tampon phage) diffuse plus facilement dans la capside. La fluorescence atteint un plateau où les phages sont saturés en Yo-Pro I en approximativement deux heures (voir figure 15.9). Certains phages 'éclatent' avec le temps. La fluorescence du phage augmente alors brutalement. On peut mettre en évidence l'endommagement de la capside à l'aide d'une enzyme dégradant l'ADN (DNAse I). Les phages dont la fluorescence augmente brutalement sont sensibles à la DNAse, tandis que les phages qui ont atteint le plateau ont toujours leur ADN protégé et sont insensibles à la DNAse (figure 15.9).

#### 15.3.1.2 Activité des phages marqués au Yo-Pro I

Nous avons testé l'activité des phages marqués en testant leur capacité à éjecter l'ADN en fluorimétrie (protocole 15.2). Nous laissons les phages incuber dans le Yo-Pro I pendant une heure avant d'ajouter FhuA. Nous voyons pendant la première heure une croissance lente de la fluorescence qui est due à la diffusion du Yo-Pro dans la capside et à l'endommagement de certains phages avec le temps. Néanmoins il subsiste une proportion importante de phages encore actifs *in vitro* après une heure de diffusion de Yo-Pro I dans la capside.

### 15.3.2 Marquage global des protéines de phages

#### 15.3.2.1 Protocole

Nous pouvons aussi marquer les phages avec les molécules fluorescentes réactives se liant de manière covalente aux amines primaires des protéines (Lysine, Arginine et bout N-terminal des protéines). Nous utilisons pour cela la molécule Alexa Fluor 568 carboxylic acid, succinimidyl ester (Invitrogen, ref n°A2003, *mixed isomers*, 1 mg) d'Invitrogen. Cependant, nous devons modifier le protocole de marquage pour deux raisons :

- Le tampon phage dans lequel sont conservés les phages contient du Tris. Le Tris entre en compétition avec les protéines de phages car il est constitué d'amines qui réagissent avec la fonction succinimidyl ester.
- Il faut maintenir une concentration minimale en ion divalent pendant la réaction de couplage (1mM $Ca^{2+}$ et 1mM $Mg^{2+}$). Or le mélange $H_2CO_3/HCO_3^-$ à pH 8.3 conseillé pour la réaction de couplage précipite avec les ions divalents (formation de calcaire :

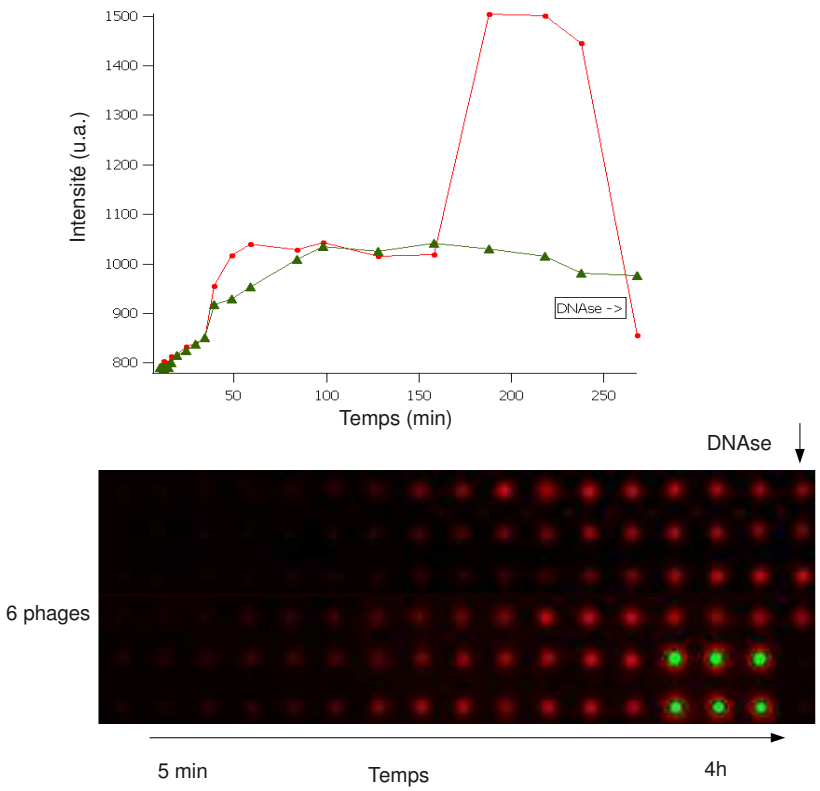



**Figure 15.9** – Diffusion du Yo Pro I ($1\mu$M dans le tampon phage) dans les capsides de phage. Haut : graphe montrant l'augmentation de fluorescence au cours du temps pour deux phages. L'un est endommagé à $t = 180min$. Sa fluorescence réduit drastiquement en présence de DNAse. Bas : image montrant l'augmentation de fluorescence dans 6 capsides au cours du temps. L'échelle de temps n'est pas linéaire. L'échelle de couleur rouge/vert choisie sert à mettre en évidence les phages endommagés dont la fluorescence dépasse une valeur seuil.

$CaCO_3$). Il faut donc utiliser une autre molécule pour tamponner la solution.

Pour changer le tampon des phages il faut d'abord dialyser les phages. Nous utilisons un microdialyseur (QuixSep, membranes CelluSep MWCO=3.5kg/mol) permettant de dialyser 100 microlitres de solution afin de garder les phages suffisamment concentrés. La réaction de couplage est, en effet, fortement dépendante de la concentration en protéines.

Nous avons besoin de préparer les solutions suivantes pour la réaction et les dialyses. Un protocole pratique pour réaliser ces solutions est détaillé par la suite.

- Buffer de dialyse phage 1 (2*500mL) (BDP1)
  - Hepes 20mM pH 7.6
  - NaCl 100mM
  - MgSO4 1mM
  - CaCl2 1mM
- Buffer de dialyse phage 2 (500mL) (BDP2)
  - Hepes 20mM pH 8.3
  - NaCl 100mM
  - MgSO4 1mM
  - CaCl2 1mM

- Préparation des solutions
  - Hepes 400mM
    - 200ml pH 7.6 étiquetté H20x-7
    - 100ml pH 8.3 étiquetté H20x-8
  - NaCl 2M + MgSO4 20mM + Cacl2 20mM
    - 1000ml étiquetté NaCldiv20x
  - Tris 200mM
    - 500ml pH 7.6 étiquetté T20x-7
- Préparation des tampons de dialyse
  - BDP1 = 50ml H20x-7 + 50ml NaCldiv20x + 900ml ED
  - BDP2 = 25ml H20x-8 + 25ml NaCldiv20x + 450ml ED
  - Tampon phage = 100ml T20x-7 + 100ml NaCldiv20x + 1800ml ED

Une fois les solutions prêtes, suivre les étapes suivantes pour marquer les phages :

- Prélever 50$\mu L$ de la solution de phages T5st(0) à $10^{13}$ pfu/ml,
- y ajouter 50$\mu$L de la solution BDP1
- mettre ces 100$\mu$L dans le système de dialyse
- Dialyses préliminaires[13]
  - Dialyser les phages deux fois 45 minutes dans 500mL de BDP1
  - Dialyser une dernière fois 45 minutes dans 500mL de BDP2
- Récupérer la solution de phages (environ 100$\mu$L)
- Mélanger cette solution à 10$\mu$L d'Alexa succinimidyl diluée à 10mg/ml dans le DMSO
- Laisser réagir une heure
- Dialyses finales
  - remettre la solution dans le microdialyseur avec une nouvelle membrane
  - Dialyser 3 fois 45 minutes dans 500mL de tampon phage
- On récupère les phages marqués à $\approx 4.10^{12}$ pfu par ml

13. Pour enlever le Tris et fixer les conditions optimales de pH

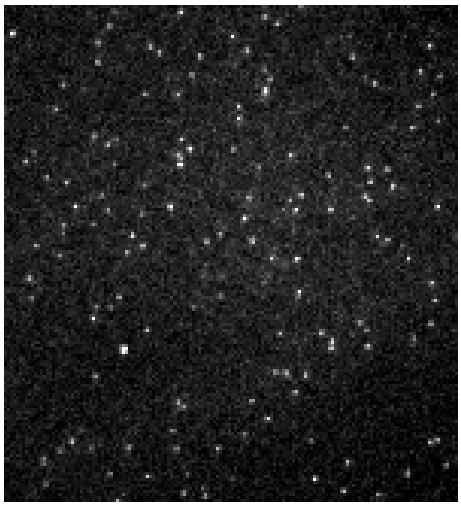


**Figure 15.10** – Phages marqués à l'alexa-568 adsorbés sur une surface de verre.

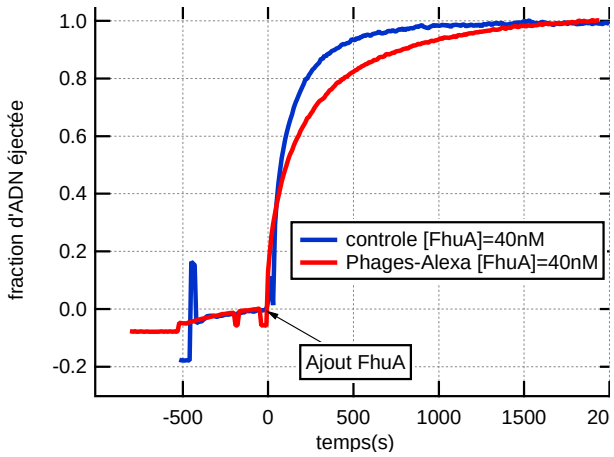



**Figure 15.11** – Contrôle de l'activité des phages marqués Alexa 568.

Lorsqu'ils sont attachés sur une surface, les phages marqués apparaissent sous la forme de points fluorescents (voir figure 15.10).

#### 15.3.2.2 Activité des phages marqués à l'Alexa

Nous avons testé l'activité des phages marqués par l'Alexa en testant leur capacité à éjecter l'ADN en fluorimétrie (protocole 15.2, 37°C, Sybr Green I 1x, et figure 15.11). Le marquage semble influencer sur la cinétique d'éjection, qui est réduite (les propriétés structurales du phage sont modifiées). Les phages gardent leur activité *in vitro*.

## 15.4 Marquage fluorescent de FhuA

### 15.4.1 Protocole

Nous avons marqué la protéine membranaire FhuA avec les molécules fluorescentes réactives se liant de manière covalente aux amines primaires de FhuA (Lysine, Arginine et bout N-terminal des protéines). Nous utilisons pour cela la molécule Alexa Fluor 568 carboxylic acid, succinimidyl ester (Invitrogen, ref n°A2003, *mixed isomers*, 1 mg) d'Invitrogen. Cependant, nous devons modifier le protocole de marquage pour deux raisons :

- Le tampon dans lequel est conservé FhuA contient du Tris. Le Tris entre en compétition avec les protéines de FhuA car il est constitué d'amines qui réagissent avec la fonction succinimidyl ester.
- Il faut maintenir une concentration supérieure à la cmc (concentration micellaire critique) en surfactant pendant la réaction de couplage (pour OG, la cmc est de 1%, pour le LDAO de 0.03%). Nous nous sommes rendu compte qu'il se forme un précipité lors du mélange du LDAO avec le tampon HEPES pH 8.3. L'origine du précipité est inconnu. Il est nécessaire d'utiliser de l'OG comme surfactant pour la réaction de couplage. Ceci pose problème étant donné que ce surfactant est cher et que sa cmc est haute. Nous effectuons un échange de surfactant en dialysant à faible volume dans une solution contenant de l'OG. Il serait néanmoins beaucoup plus pratique d'avoir une préparation de FhuA tamponnée par une autre molécule que le Tris directement dans l'OG.

Remarque : les ions divalents ne sont probablement pas nécessaires dans les tampons de dialyse.

Pour changer le tampon (élimination du Tris) il faut d'abord dialyser FhuA. Nous utilisons un microdialyseur (QuixSep, membranes CelluSep MWCO=3.5kg/mol) permettant de dialyser 100 microlitres de solution afin de garder FhuA suffisamment concentré. La réaction de couplage est en effet fortement dépendante de la concentration en protéines.

Nous avons besoin de préparer les solutions suivantes pour la réaction et les dialyses. Un protocole pratique pour réaliser ces solutions est détaillé par la suite.

- Buffer de dialyse FhuA 1 (2*500ml) BDF1
  - Hepes 20mM pH 7.6
  - NaCl 100mM
  - LDAO 0.06%
  - MgSO4 1mM
  - CaCl2 1mM
- Buffer de dialyse FhuA 2 (100mL) BDF2
  - Hepes 20mM pH 8.3
  - NaCl 100mM
  - OG 1%
  - MgSO4 1mM
  - CaCl2 1mM
- Buffer de conservation de FhuA (500mL) BCF
  - Hepes 20mM pH 8.3
  - NaCl 100mM
  - LDAO 0.06%

  - MgSO4 1mM
  - CaCl2 1mM

- Préparation des solutions
  - Hepes 400mM
    - 200ml pH 7.6 étiquetté H20x-7
    - 100ml pH 8.3 étiquetté H20x-8
  - NaCl 2M + MgSO4 20mM + Cacl2 20mM
    - 1000ml étiquetté NaCldiv20x
  - LDAO 1,2%
    - 200ml pH 7.6 étiquetté L20x-7
  - Tris 200mM
    - 500ml pH 7.6 étiquetté T20x-7
  - LDAO 1,2%
    - 200ml pH 7.6 étiquetté L20x-7
- Préparation des tampons de dialyse
  - BDF1 = 50ml H20x-7 + 50ml NaCldiv20x + 50ml L20x + 850ml ED
  - BDF2 = 5ml H20x-8 + 5ml NaCldiv20x + 1% OG + 90ml ED
  - BCF = 100ml T20x-7 + 100ml NaCldiv20x + 100ml L20x + 1700ml ED

Une fois les solutions prêtes, suivre les étapes suivantes pour marquer FhuA :

- Prélever 25$\mu L$ de la solution stock de FhuA à 4mg/ml,
- y ajouter 75$\mu$L de la solution BDF1
- mettre ces 100$\mu$L dans le système de dialyse
- Dialyses préliminaires[14]
  - Dialyser FhuA deux fois 45 minutes dans 500mL de BDF1
  - Dialyser deux fois 45 minutes dans 50mL de BDF2 (mettre le microdialyseur dans un falcon et agiter)
- Récupérer la solution de FhuA (environ 100$\mu$L)
- Mélanger cette solution à 10$\mu$L d'Alexa succinimidyl diluée à 10mg/ml dans le DMSO
- Laisser réagir une heure
- Dialyses finales
  - Remettre la solution dans le microdialyseur avec une nouvelle membrane
  - Dialyser 3 fois 45 minutes dans 500mL de tampon BCF
- On récupère les FhuA marqués à $\approx$ 0.5mg/ml

### 15.4.2 Activité

Nous avons testé l'activité des phages marqués par l'Alexa en testant leur capacité à éjecter l'ADN en fluorimétrie (protocole 15.2, 37°C, Sybr Green I 1x, et figure 15.12). Le marquage ne semble pas changer la cinétique d'éjection. Notons que nous nous sommes placés à 40nM en FhuA. Le choix d'une concentration plus réduite ($<$10nM) aurait pu permettre de mieux quantifier l'activité de FhuA-Alexa car la cinétique d'éjection est plus sensible à la concentration en FhuA dans ce régime là. Avec le résultat obtenu figure 15.12, nous pouvons simplement déduire que l'activité du FhuA marqué n'est pas réduite de plus d'un facteur 4 par rapport à

14. Pour enlever le Tris et fixer les conditions optimales de pH

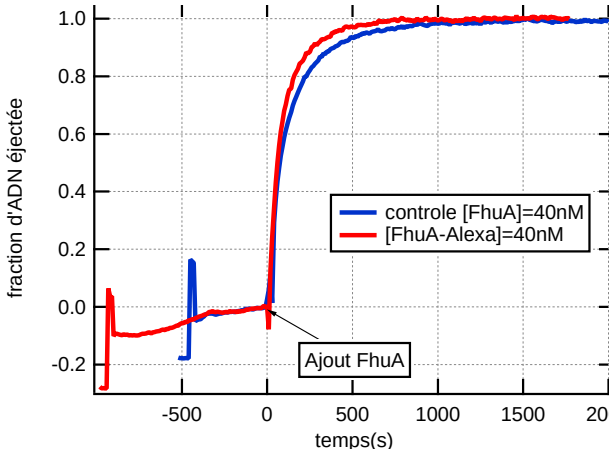



**Figure 15.12** – Contrôle de l'activité de FhuA marqué Alexa 568.

la molécule non marquée.

## 15.5 Reconstitution de FhuA en vésicule lipidique

### 15.5.1 Reconstitution de FhuA en petites vésicules unilamellaires (SUVs)

#### 15.5.1.1 Protocole de préparation des protéoliposomes FhuA

**Matériel**

- OG à 20 %
- Tampon phage
- Lipides EggPC ou DPhPC, solution à 20mg/ml dans le chloroforme

**Fabrication de liposomes**

- Sortir les lipides du congélateur
- Attendre l'équilibre thermique du pot (env. 20 minutes)[15]
- Rincer plusieurs fois au chloroforme les pipettes Hamilton (5ml et 10$\mu$L) en verre sous hotte
- Dans un tube à essai en verre de 5ml
- Mettre l'équivalent de 5mg de lipides dans ce tube (20mg/ml $=>$ 250$\mu$L)
- Vortexer (pour augmenter la surface de séchage) pendant le séchage sous flux d'azote gazeux
- S'assurer que la masse lipidique est bien sèche[16]
- Ajouter 500$\mu$L de tampon dans le tube ce qui donne une solution de lipide à 10 mg/ml
- Vortexer. La solution devient opaque, signe de la formation de liposomes de taille variable. (étape A figure 15.13)

15. Important : si le flacon est froid quand on l'ouvre, l'eau se condense dans le flacon, ce qui risque d'hydrolyser les lipides.

16. Eventuellement mettre le tube sous vide pendant au moins 30' pour bien enlever le chloroforme

- Pour obtenir des SUVs (facultatif)
  - ultrasoniquer le mélange jusqu'à ce qu'il devienne translucide (on forme des « small unilamellar vesicles » de taille relativement homogène, environ 50nm)
  - ou utiliser l'extrudeur de chez Avanti Polar lipids.

**Reconstitution de FhuA dans des liposomes**

- Clarifier 100$\mu$L de la solution de liposomes à l'aide du minimum de détergent (ex : ajouter 2$\mu$L par 2$\mu$L d'OG jusqu'à obtenir une solution transparente) (étape B figure 15.13)
- Ajouter les protéines membranaires dans le rapport massique de votre choix (tant qu'il est inférieur à 1/40, la solution stock de FhuA est à 50$\mu$M = 4mg/ml) (étape C figure 15.13)

A partir de ce moment les protocoles diffèrent selon les lipides utilisés. La reconstitution dans les lipides EggPC est plus aisée que celle dans les lipides DPhPC.

- Pour les lipides EggPC
  - laissez incuber quelques minutes,
  - Ajoutez 900$\mu$L de votre solution tampon $\Longrightarrow$ la concentration en OG passe en dessous de la cmc et la solution se trouble instantanément. (étape D figure 15.13)
  - (optionnel) Pour obtenir une solution concentrée en liposomes et éliminer le détergent faire des cycles centrifugation/ resuspension : (étape E figure 15.13)
    - Centrifugation à 4°C 18 000g 30' minimum de la solution trouble => un précipité se forme[17]
    - Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 10$\mu$L de tampon phage.
- Pour les lipides DPhPC
  - laissez incuber au moins une heure[18]
  - récupérer la solution (environ 100$\mu$L) et insérer dans un microdialyseur (QuixSep, membranes CelluSep MWCO=3.5kg/mol)
  - dialyser la solution contre une solution de tampon phage (2*2H dans 500mL de solution)
  - récupérer la solution qui doit être trouble, signe de la formation des protéoliposomes

#### 15.5.1.2 Vérification de l'efficacité de reconstitution par fluorimétrie

Pour vérifier l'efficacité de reconstitution de FhuA dans les liposomes dans ce protocole, on teste l'activité des fractions culot et surnageant en vérifiant leur capacité à faire éjecter l'ADN de T5. Nous cela nous utilisons le protocole 15.2 en remplaçant le FhuA stock par un volume équivalent de la fraction culot ou surnageant du protocole de fabrication des protéoliposomes FhuA.[19] La figure 15.14 montre que l'activité se retrouve bien concentrée dans le culot et que l'activité du surnageant est très faible. La quantification exacte de l'efficacité de reconstitution

17. Cette étape est plus ou moins facile en fonction de la densité de la solution tampon. A l'extrême, si la solution est très dense (très salée par exemple), les vésicules vont remonter au lieu d'être culotées.

18. La durée de l'incubation est très importante. Si on ne laisse pas assez longtemps, les protéines ne sont pas associées aux membranes et précipitent lors de l'étape de dialyse.

19. Comme le buffer des expériences de fluorimétrie contient du LDAO en concentration supérieure à sa cmc, les protéoliposomes sont immédiatement solubilisés. Il n'y a donc pas de problème d'accessibilité de l'ADN pour les marqueurs fluorescents.

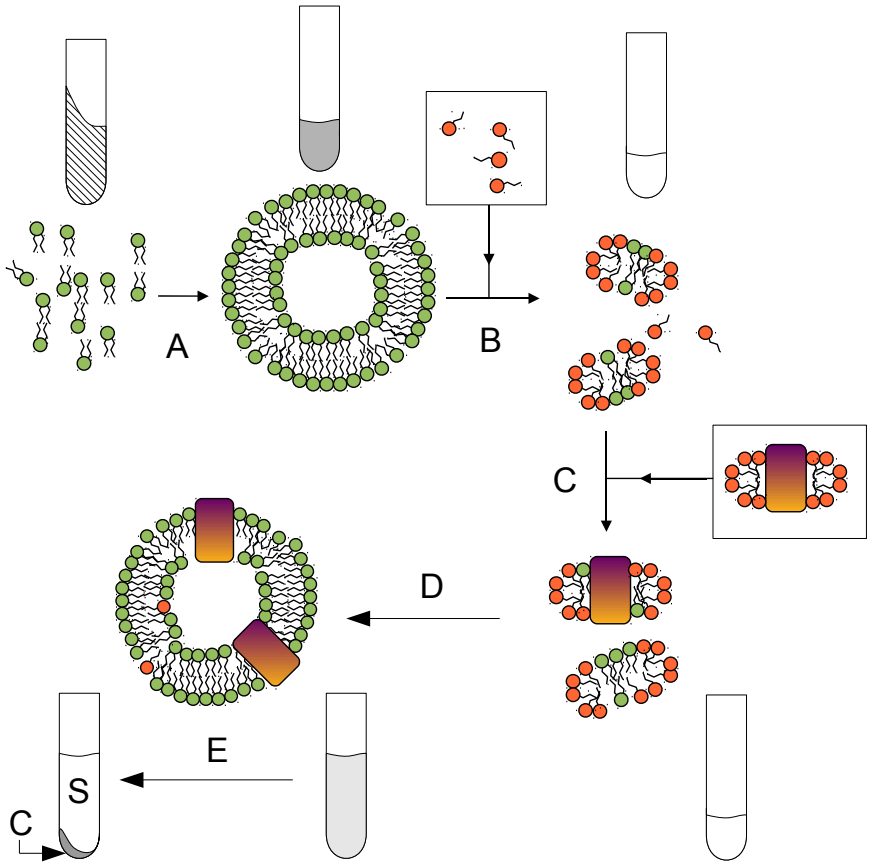



**Figure 15.13** – Principe de la reconstitution de FhuA en petites vésicules unilamellaires pour les lipides EggPC. En ce qui concerne les lipides DPhPC, les étapes D et E (dilution pour passer en dessous de la cmc) sont remplacées par une étape de dialyse.

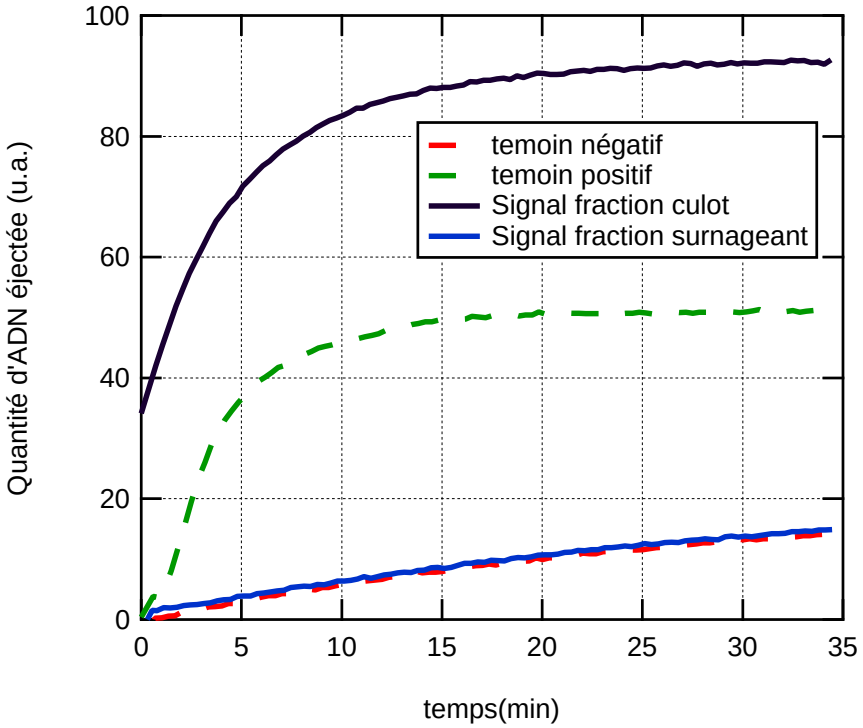



**Figure 15.14** – Vérification de la reconstitution de FhuA en petites vésicules unilamellaires. Ces mesures ont été faites en présence de Yo-Pro I, la plus grande diffusion du Yo Pro dans les capsides par rapport au Sybr Green I explique la dérive de la fluorescence dans le contrôle négatif. L'offset observé dans le signal de la fraction culot peut provenir de la grande quantité de FhuA ou de la fluorescence des micelles LDAO-lipides.

n'a pas été mesurée précisément. Tout au plus pouvons nous dire que si il y a une perte d'activité, elle ne dépasse pas un facteur 10.

## 15.5.2 Reconstitution de FhuA en vésicules unilamellaires géantes (GUVs)

### 15.5.2.1 Préparation de vésicules géantes unilamellaires contenant FhuA

Le protocole suivant est inspiré de [42].

**Matériel**

- Lames ITO (sigma)
- Une solution de protéoliposomes FhuA fabriquée selon le protocole 15.5.1.

Il est conseillé de marquer en fluorescence ces vésicules, en formant des protéoliposomes FhuA avec des molécules de FhuA marquées (cf protocole 15.5.1) ou en insérant une petite quantité de lipides marqués (PE-NBD ou Texas Red DHPE).

**Préparation**

- Lavage des lames ITO (Sigma Aldrich, ref n°639303-1EA)
  - sonication 10 minutes dans un mélange eau alcool (50/50) + détergent hellmanex (1ml)
  - sortir les lames une par une, les rincer à l'eau distillée puis les sécher sous flux d'air.
- Nettoyer la surface conductrice[20] de six lames ITO au chloroforme
- Placer les lames dans une chambre humide en équilibre avec une solution saturée en NaCl (humidité $\approx$ 70%)
- Ranger les lames par paire, sur chaque paire déposer 2*3 gouttes de 0.5$\mu$L de la solution de protéoliposomes FhuA non diluée (paire n°1), diluée 5 fois (paire n°2) dans l'ED et diluée 25 fois (paire n°3) dans de l'ED
- Pendant ce temps préparer une solution de pousse (Sucrose à 220mM + NaCl 0.1mM).
- Forrmer une chambre de pousse scellée pour chaque paire de lame ITO à l'aide d'une pâte étanche (Vitrex (Modulhor)) et de deux espaceurs de 1mm permettant le contact électrique sur chaque lame ITO.
- Remplir la chambre de la solution de pousse.
- Faire pousser les vésicules géantes en appliquant une tension sinusoïdale de 2V, 10Hz, crête à crête pendant 4 heures.
- Les vésicules se conservent dans la chambre de pousse environ une semaine à 4°C.

20. A repérer à l'aide d'un multimètre

# Chapitre 16

# Protocoles Nanopores

## 16.1 Production des molécules d'ADN

### 16.1.1 Liste des oligos d'ADN

Oligos utilisés pendant la thèse, conservés à $-20°C$ dans TE pH7.4.

| NOM | SEQUENCE | |
|---|---|---|
| c-RLS | 5'-CCTGAACAGTGAGCGAAGCCCGGCGCGGACAAAATGCCGCAGCCTA$_{30}$-3' | 75pb |
| RLS | 3'-GGACTTGTCACTCGCTTCGGGCCGCGCCTGTTTTACGGCGTCGGA-5' | 45pb |
| | | |
| c-SLS | 5'-CGTAGTTCGTGCGTGGAGATCTGCCTCCGTGGCCTCGCGCAGCCTA$_{30}$-3' | 75pb |
| SLS | 3'-GCATCAAGCACGCACCTCTAGACGGAGGCACCGGAGCGCGTCGGA-5' | 45pb |
| | | |
| hpc | 5'-CGCAGCCT(A)$-$30-3' | 38pb |
| hp1 | 5'-AGGCTGCGGCGTCGGATA GTTG TATCCGACGC-3' | 32pb |
| hp2 | 5'-AGGCTGCGATTCGTCCTG GTTG CAGGACGAAT-3' | 32pb |
| hp3 | 5'-AGGCTGCGATCTGTTCGT GTTG ACGAACAGAT-3' | 32pb |
| hp4 | 5'-AGGCTGCGTTATCGGTTC GTTG GAACCGATAA-3' | 32pb |
| hp5 | 5'-AGGCTGCGAAATGCTGTT GTTG AACAGCATTT-3' | 32pb |

Les oligos sont suspendus dans une solution de TE 1x pH7.4 à 200$\mu$M. La concentration est vérifiée en mesurant l'absorbance à 260nm d'une dilution connue de ces suspensions.

### 16.1.2 Production des hairpins Hp1 à 5

La longueur totale de la molécule dépliée faisant 70 paires de base, les fournisseurs d'oligos déconseillent la production en une étape de la molécule. Nous avons donc choisi de produire la molécule en deux étapes, en séparant la partie commune à toutes les molécules (hpc, 38 pb) de la partie variable (hp1 à 5, 32pb). Ainsi l'oligo hpc est mélangé en proportion 1.5/1 avec un oligo hpx complémentaire. Le léger excès de molécule hpc permet de s'assurer que les molécules qui n'ont pas réagi ne forment pas de hairpins qui pourraient gêner les mesures de nanopore. Hpc, s'il est présent en excès, va passer dans l'hémolysine beaucoup plus vite

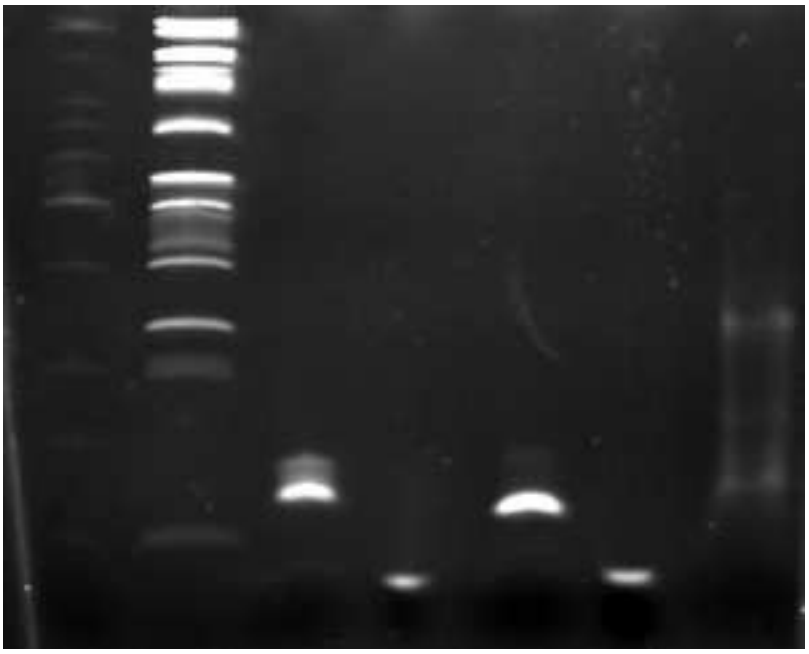


**Figure 16.1 –** Gel de polyacrylamide dénaturant de contrôle de ligation. Les puits sont, de gauche à droite : ladder low M (difficilement visible) / ladder 50pb / hp3+hpc + ligase / hp3+hpc - ligase / hp5+hpc + ligase / hp5+hpc - ligase

que les hairpins complets et sera facilement exclu de l'analyse des signaux de translocation. Une ligation est alors effectuée pour les hybrides hpc/hpx. La ligation est vérifiée sur gel de polyacrylamide dénaturant (figure 16.1). En présence de ligase, nous obtenons bien des molécules plus grandes et nous vérifions l'absence de molécules hpx résiduelles (pour une raison que l'on ignore, l'oligo hpc de 32 paires de bases n'est pas visible car il n'est pas marqué par le BET). Le gel n'est qu'un gel d'analyse, nous ne purifions pas les molécules sur gel de polyacrylamide. Avant utilisation dans les nanopores, les molécules subissent un quench thermique (chauffage 5 minutes à 90°C puis plongeon dans la glace). Ce quench permet d'éliminer la présence éventuelle de concatémères.

### 16.1.3 Production des duplex $\lambda$-RLS et $\lambda$-SLS

Les longs duplex sont fabriqués plus simplement. Il suffit d'hybrider des deux oligos complémentaires en condition équimolaire.

## 16.2 Réalisation des expériences d'ouverture en pore unique

### 16.2.1 Présentation du montage (figure 16.2)

Le montage expérimental n'est pas tout à fait standard pour ces expériences de translocation car le dispositif est placé sous microscope inversé, ce qui s'avèrera pratique pour vérifier la qualité de la bicouche lipidique. Une cellule en Teflon séparant deux compartiments (cis et

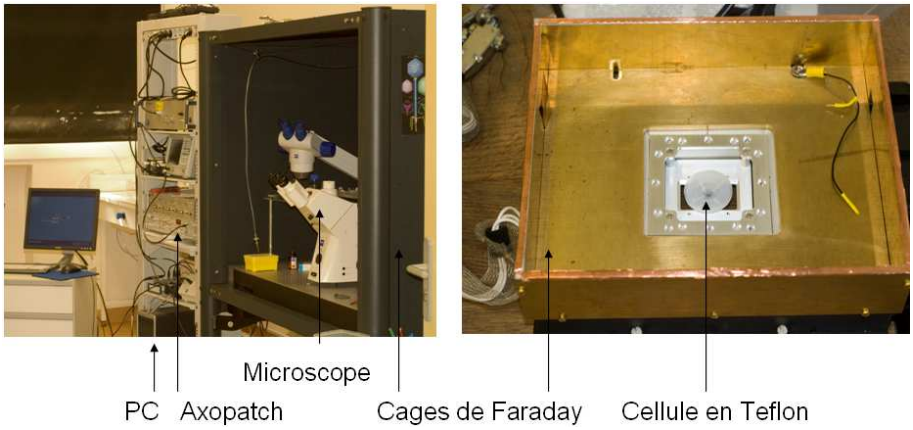



**Figure 16.2** – Photo du montage expérimental. Le microscope est placé dans une grande cage de Faraday. La cellule en Teflon est placée au centre d'une plus petite cage de Faraday.

trans) pouvant contenir du tampon est percée par une fine membrane de Teflon percée par un trou de 30$\mu$m. Ce dispositif est placé sur un microscope inversé et recouvert par une cage de Faraday. Deux électrodes d'argent (WPI) sont connectées à la cellule de Teflon du coté cis et trans et à un préamplificateur relié à l'appareil Axopatch 200. L'Axopatch permet la mesure du courant à travers la membrane, il permet de contrôler les paramètres d'acquisition et de fixer la différence de potentiel entre les électrodes d'argent.

### 16.2.2 Préparation des aliquots d'alpha hémolysine

Préparer :
- une soixantaine de tubes eppendorf (0.5mL),
- une fiole de toxine d'alpha hémolysine (Sigma Aldrich, H9395),
- une seringue de 1mL avec une aiguille stérile,
- 1mL d'une solution d'éthylène glycol (50% w/v)

Puis :
- enlever le sceau métallique sur la fiole d'hémolysine
- mettre 0.5mL d'éthylène glycol dans la seringue
- percer le bouchon en caoutchouc de la fiole à l'aide de la seringue (la seringue se vide d'elle même car la fiole est sous vide)
- dissoudre tous les agrégats de protéines et attendre quelques minutes
- ouvrir délicatement la fiole et faire des aliquots de 8$\mu$L de la solution dans les tubes eppendorf
- garder les aliquots au congélateur

### 16.2.3 Formation d'une bicouche lipidique plane (BLM)

Voir le protocole partie 13.4. Nous utilisons toujours le tampon nanopore (TE pH7.4 + 1M KCl) dans ces expériences.

### 16.2.4 Insertion d'un pore unique d'$\alpha$-hémolysine

Lorsque l'on a obtenu une bicouche lipidique stable, sortir un aliquot d'alpha hémolysine du congélateur. Diluer l'aliquot dans 200$\mu$L de tampon nanopore. Ajouter 3 $\mu$L de la solution dans le compartiment cis de la cellule, au dessus de la membrane plane. Attendre l'incorporation d'un pore pendant environ 15 minutes. Pour cela il faut appliquer une différence de potentiel (100mV typiquement), et attendre d'observer une augmentation de courant brusque de 130pA.

Au bout d'un quart d'heure, si aucun pore n'est incorporé, il est possible de :
- reformer la membrane et attendre de nouveau
- ajouter à nouveau de l'alpha-hémolysine

Un pore correct laisse passer un courant de 120pA en appliquant +100mV et -90pA en appliquant -100mV à température ambiante. Le niveau de bruit est de 1pA rms.

### 16.2.5 Ajout des molécules d'ADN

Une fois la bicouche et un pore unique stable incorporé, il suffit d'ajouter les molécules en concentration suffisante (typiquement 1$\mu$M) dans le compartiment cis de la cellule. Un délai de l'ordre de la minute doit s'écouler avant d'obtenir les premiers signaux de translocation.

### 16.2.6 Acquisition des données

La différence de potentiel est ensuite fixée et le courant passant à travers le pore est enregistré, il est filtré à 10kHz et échantillonné à 20kHz.

# Bibliographie


[1] K. Aathavan, A T Politzer, A. Kaplan, J R Moffitt, Y R Chemla, S. Grimes, P J Jardine, D L Anderson, and C. Bustamante. Substrate interactions and promiscuity in a viral DNA packaging motor. *Nature*, 461(7264) :669–U118, 2009. 93

[2] H. -W. Ackermann. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154(4) :245–251, May 2003. 56

[3] HW Ackermann. Classification of bacteriophages. *The bacteriophages*, 2 :8–17, 2006. 56

[4] M. Ackermann, A. Schauerte, S C Stearns, and U. Jenal. Experimental evolution of aging in a bacterium. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 2007. 54, 55

[5] Aleksei Aksimentiev and Klaus Schulten. Imaging [alpha]-Hemolysin with molecular dynamics : Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophysical Journal*, 88(6) :3745–3761, 2005. 11

[6] Miglena I. Angelova and Dimiter S. Dimitrov. Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 81 :303–311, 1986. 154

[7] Dennis H. Bamford. Do viruses form lineages across different domains of life ? *Research in Microbiology*, 154(4) :231–236, May 2003. 51, 53

[8] Dennis H Bamford, Jonathan M Grimes, and David I Stuart. What does structure tell us about virus evolution ? *Current Opinion in Structural Biology*, 15(6) :655–663, December 2005. 51, 53

[9] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot. DNA strand separation studied by single molecule force measurements. *Physical Review E*, 58(2) :2386, 1998. 5

[10] U. Bockelmann and V. Viasnoff. Theoretical study of sequence-dependent nanopore unzipping of DNA. *Biophysical Journal*, 94(7) :2716–2724, 2008. 17, 31

[11] J. Bohm, O. Lambert, A S Frangakis, L. Letellier, W. Baumeister, and J L Rigaud. FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes : A cryo-electron tomography study. *Current Biology*, 11(15) :1168–1175, 2001. 59, 63, 113, 127

[12] M. Bonhivers, A. Ghazi, P. Boulanger, and L. Letellier. FhuA, a transporter of the escherichia coli outer membrane, is converted into a channel upon binding of bacteriophage T5. *EMBO Journal*, 15(8) :1850–6, April 1996. 63, 113, 116

[13] P. Boulanger, M. le Maire, M. Bonhivers, S. Dubois, M. Desmadril, and L. Letellier. Purification and structural and functional characterization of FhuA, a transporter of the Escherichia coli outer membrane. *Biochemistry*, 35(45) :14216–24, 1996. 62

[14] Mya Breitbart and Forest Rohwer. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus ? *Trends in Microbiology*, 13(6) :278–284, 2005. 54

[15] S. Casjens and R. Hendrix. Control mechanisms in dsDNA bacteriophage assembly. *The bacteriophages*, 1 :15–91, 1988. 56

[16] Sherwood R Casjens. Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4) :451–458, 2005. 56

[17] M. Castelnovo and A. Evilevitch. DNA ejection from bacteriophage : Towards a general behavior for osmotic-suppression experiments. *European Physical Journal E*, 24 :9–18, 2007. 93

[18] M E Cerritelli, N Q Cheng, A H Rosenberg, C E McPherson, F P Booy, and A C Steven. Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. *Cell*, 91(2) :271–280, 1997. 80, 81

[19] Y R Chemla, K. Aathavan, J. Michaelis, S. Grimes, P J Jardine, D L Anderson, and C. Bustamante. Mechanism of force generation of a viral DNA packaging motor. *Cell*, 122(5) :683–692, 2005. 93

[20] K H Choi, J. McPartland, I. Kaganman, V D Bowman, L B Rothman-Denes, and M G Rossmann. Insight into DNA and protein transport in double-stranded DNA viruses : The structure of bacteriophage N4. *Journal of Molecular Biology*, 378(3) :726–736, 2008. 80

[21] André M Comeau and Henry M Krisch. War is peace – dispatches from the bacterial and phage killing fields. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4) :488–494, August 2005. 57

[22] Luis R Comolli, Andrew J Spakowitz, Cristina E Siegerist, Paul J Jardine, Shelley Grimes, Dwight L Anderson, Carlos Bustamante, and Kenneth H Downing. Three-dimensional architecture of the bacteriophage phi29 packaged genome and elucidation of its packaging process. *Virology*, 371(2) :267–77, February 2008. 81, 82

[23] J. Couprie, P. Tavares, S. Zinn-Justin, S. Lhuillier, M. Gallopin, B. Gilquin, S. Brasiles, N. Lancelot, G. Letellier, M. Gilles, G. Dethan, and E V Orlova. Structure of bacteriophage SPP1 head-to-tail connection reveals mechanism for viral DNA gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21) :8507–8512, 2009. 78

[24] M. de Frutos, S. Brasiles, P. Tavares, and E. Raspaud. Effect of spermine and DNase on DNA release from bacteriophage T5. *European Physical Journal E*, 17(4) :429–434, 2005. 66

[25] Marta de Frutos, Lucienne Letellier, and Eric Raspaud. DNA ejection from bacteriophage T5 : analysis of the kinetics and energetics. *Biophysical Journal*, 88(2) :1364–70, February 2005. 66, 74, 75, 103

[26] D. Durand, J. Doucet, and F. Livolant. A study of the structure of highly concentrated phases of DNA by x-ray diffraction. *Journal de Physique II*, 2(9) :15, 1992. 81, 83, 93

[27] W. Earnshaw, S. Casjens, and S. C Harrison. Assembly of the head of bacteriophage P22 : X-ray diffraction from heads, proheads and related structures 1. *Journal of molecular biology*, 104(2) :387–410, 1976. 80, 81

[28] W. C. Earnshaw and S. C. Harrison. DNA arrangement in isometric phage heads. *Nature*, 268(5621) :598–602, 1977. 80, 81, 86

[29] W. C. Earnshaw, J. King, S. C. Harrison, and F. A. Eiserling. The structural organization of DNA packaged within the heads of T4 wild-type, isometric and giant bacteriophages. *Cell*, 14(3) :559–568, 1978. 80, 81, 97

[30] R. Edgar, A. Rokney, M. Feeney, S. Semsey, M. Kessel, M B Goldberg, S. Adhya, and A B Oppenheim. Bacteriophage infection is targeted to cellular poles. *Molecular Microbiology*, 68(5) :1107–1116, 2008. 128

[31] G. Effantin, P. Boulanger, E. Neumann, L. Letellier, and J F Conway. Bacteriophage T5 structure reveals similarities with HK97 and T4 suggesting evolutionary relationships. *Journal of Molecular Biology*, 361(5) :993–1002, September 2006. 59, 61, 80, 81

[32] M. Eriksson, M. Hardelin, A. Larsson, J. Bergenholtz, and B. Akerman. Binding of intercalating and groove-binding cyanine dyes to bacteriophage T5. *Journal fo Physical Chemistry B*, 111(5) :1139–1148, 2007. 163

[33] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(22) :11935 –11940, October 1997. 5

[34] A. Evilevitch, L T Fang, A M Yoffe, M. Castelnovo, D C Rau, V A Parsegian, W M Gelbart, and C M Knobler. Effects of salt concentrations and bending energy on the extent of ejection of phage genomes. *Biophysical Journal*, 94(3) :1110–1120, 2008. 93, 95

[35] A. Evilevitch, L. Lavelle, C M Knobler, E. Raspaud, and W M Gelbart. Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16) :9292–9295, 2003. 80, 93

[36] P A Fang, E T Wright, S T Weintraub, K. Hakala, W M Wu, P. Serwer, and W. Jiang. Visualization of bacteriophage T3 capsids with DNA incompletely packaged in vivo. *Journal of Molecular Biology*, 384(5) :1384–1399, 2008. 80, 82

[37] Michael Feiss, R.A. Fisher, M.A. Crayton, and Carol Egner. Packaging of the bacteriophage [lambda] chromosome : Effect of chromosome length. *Virology*, 77(1) :281–293, March 1977. 79, 125

[38] A D Ferguson, E. Hofmann, J W Coulton, K. Diederichs, and W. Welte. Siderophore-mediated iron transport : Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science*, 282(5397) :2215–2220, 1998. 61

[39] D N Fuller, D M Raymer, V I Kottadiel, V B Rao, and D E Smith. Single phage T4 DNA packaging motors exhibit barge force generation, high velocity, and dynamic variability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 :16868–16873, 2007. 93, 94

[40] D N Fuller, J P Rickgauer, P J Jardine, S. Grimes, D L Anderson, and D E Smith. Ionic effects on viral DNA packaging and portal motor function in bacteriophage phi 29. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 :11245–11250, 2007. 93, 106

[41] Derek N Fuller, Dorian M Raymer, John Peter Rickgauer, Rae M Robertson, Carlos E Catalano, Dwight L Anderson, Shelley Grimes, and Douglas E Smith. Measurements of single DNA molecule packaging dynamics in bacteriophage lambda reveal high forces, high motor processivity, and capsid transformations. *Journal of Molecular Biology*, 373(5) :1113–22, November 2007. 93, 94

[42] P. Girard, J. Pecreaux, G. Lenoir, P. Falson, J L Rigaud, and P. Bassereau. A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*, 87(1) :419–429, 2004. 116, 186

[43] P. Grayson, A. Evilevitch, M M Inamdar, P K Purohit, W M Gelbart, C M Knobler, and R. Phillips. The effect of genome length on ejection forces in bacteriophage lambda. *Virology*, 348(2) :430–436, 2006. 93, 96

[44] P. Grayson and I J Molineux. Is phage DNA 'injected' into cells-biologists and physicists can agree. *Current Opinion in Microbiology*, 10 :401–409, 2007. 126

[45] Paul Grayson. The DNA ejection process in bacteriophage lambda. http ://thesis.library.caltech.edu/2069/, 2007. 86, 87, 89, 105, 106, 107, 111, 126

[46] Paul Grayson, Lin Han, Tabita Winther, and Rob Phillips. Real-time observations of single bacteriophage lambda DNA ejections in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37) :14652–7, September 2007. 98, 105, 106

[47] Emma Hambly and Curtis A Suttle. The viriosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4) :444–450, August 2005. 54

[48] K. Hantke and V. Braun. Functional interaction of the tonA/tonB receptor system in escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 135(1) :190–197, 1978. 62

[49] Klaus Hantke. Regulation of ferric iron transport in Escherichia coli K12 : Isolation of a constitutive mutant. *MGG Molecular & General Genetics*, 182(2) :288–292, 1981. 62

[50] K Heller and V Braun. Polymannose o-antigens of escherichia coli, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5+ via the L-shaped tail fibers. *J. Virol.*, 41(1) :222–227, January 1982. 62

[51] Knut Heller and Volkmar Braun. Accelerated adsorption of bacteriophage T5 to Escherichia coli F, resulting from reversible tail Fiber-Lipopolysaccharide binding. *Journal of Bacteriology*, 139(1) :32–38, 1979. 114

[52] Roger W. Hendrix. Bacteriophages : Evolution of the majority. *Theoretical Population Biology*, 61(4) :471–480, 2002. 53

[53] M. Heusterspreute, V. Ha-Thi, S. Tournis-Gamble, and J. Davison. The 1st-step transfer-DNA injection-stop signal of bacteriophage T5. *Gene*, 52(2-3) :155–164, 1987. 63

[54] Stefan Howorka, Stephen Cheley, and Hagan Bayley. Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nat Biotech*, 19(7) :636–639, 2001. 5, 14

[55] C. HULEN, B. LABEDAN, and J. LEGAULTDEMARE. EVIDENCE FOR HETEROGENEITY IN POPULATIONS OF BACTERIOPHAGE-T5 .2. SOME PARTICLES ARE UNABLE TO INJECT THEIR 2ND-STEP-TRANSFER DNA. *Journal of Virology*, 36(3) :633–638, 1980. 75

[56] Dorothee Jary and Jean-Louis Sikorav. Cyclization of globular DNA. implications for DNA-DNA interactions in vivo. *Biochemistry*, 38(11) :3223–3227, March 1999. 109

[57] Dorothée Jary, Jyotsana Lal, and Jean-Louis Sikorav. Accelerated cyclization of [lambda] DNA. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 321(1) :1–4, January 1998. 109

[58] M. Jeembaeva, M. Castelnovo, F. Larsson, and A. Evilevitch. Osmotic pressure : Resisting or promoting DNA ejection from phage ? *Journal of Molecular Biology*, 381(2) :310–323, 2008. 126

[59] John J. Kasianowicz, Eric Brandin, Daniel Branton, and David W. Deamer. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24) :13770 –13773, November 1996. 10

[60] James Kindt, Shelly Tzlil, Avinoam Ben-Shaul, and William M. Gelbart. DNA packaging and ejection forces in bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24) :13671 –13674, November 2001. 85

[61] A. A. Kornyshev and S. Leikin. Electrostatic zipper motif for DNA aggregation. *Physical Review Letters*, 82(20) :4138, May 1999. 85

[62] S. Koster, A. Evilevitch, M. Jeembaeva, and D A Weitz. Influence of internal capsid pressure on viral infection by phage lambda. *Biophysical Journal*, 97(6) :1525–1529, 2009. 125

[63] J S Koti, M C Morais, R. Rajagopal, B A L Owen, C T McMurray, and D L Anderson. DNA packaging motor assembly intermediate of bacteriophage phi 29. *Journal of Molecular Biology*, 381(5) :1114–1132, 2008. 93

[64] R. Koynova and M. Caffrey. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1376(1) :91–145, 1998. 132

[65] E. Kutter and A. Sulakvelidze. *Bacteriophages : biology and applications*. CRC Press Boca Raton, FL, 2005. 53, 54, 57

[66] O. Lambert, L. Letellier, W M Gelbart, and J L Rigaud. DNA delivery by phage as a strategy for encapsulating toroidal condensates of arbitrary size into liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13) :7248–7253, 2000. 63, 113

[67] O. Lambert, L. Plancon, J L Rigaud, and L. Letellier. Protein-mediated DNA transfer into liposomes. *Molecular Microbiology*, 30(4) :761–765, 1998. 63, 113

[68] G C Lander, L. Tang, S R Casjens, E B Gilcrease, P. Prevelige, A. Poliakov, C S Potter, B. Carragher, and J E Johnson. The structure of an infectious P22 virion shows the signal for headful DNA packaging. *Science*, 312(5781) :1791–1795, 2006. 80

[69] Y T Lanni. Invasion by bacteriophage T5. 1. some basic kinetic features. *Virology.*, 10(4) :501–513, 1960. 63

[70] Y T Lanni. Invasion by bacteriophage T5. 2. dissociation of calcium-independent and calcium-dependent processes. *Virology.*, 10(4) :514–529, 1960. 63

[71] Y T Lanni. First-step-transfer deoxyribonucleic acid of bacteriophage T5. *Bacteriol. Rev.*, 32(3) :227–&, 1968. 63

[72] Y T Lanni. Functions of 2 genes in first-step-transfer DNA of bacteriophage T5. *Journal of Molecular Biology*, 44(1) :173–&, 1969. 63

[73] Y T Lanni, C M Wilson, and D J McCorquodale. Molecular aspects of DNA transfer from phage T5 to host cells. 2. origin of first-step-transfer DNA fragments. *Journal of Molecular Biology*, 10(1) :19–&, 1964. 63

[74] A. Leforestier, S. Brasiles, M. de Frutos, E. Raspaud, L. Letellier, P. Tavares, and F. Livolant. Bacteriophage T5 DNA ejection under pressure. *Journal of Molecular Biology*, 384(3) :730–739, 2008. 81, 93, 96, 106

[75] A. Leforestier and F. Livolant. The bacteriophage genome undergoes a succession of intracapsid phase transitions upon DNA ejection. *Journal of Molecular Biology*, 396(2) :384–395, 2010. 80, 81, 82, 83, 84, 95, 106, 108

[76] Amélie Leforestier and Françoise Livolant. Structure of toroidal DNA collapsed inside the phage capsid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23) :9157 –9162, 2009. 85

[77] L. Letellier. Phage DNA transport across membranes. *Structure and Dyanmics of Confined Polymers*, 87 :23–36, 2002. 63

[78] Lucienne Letellier. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Frontiers in Bioscience*, 9(1-3) :1228, 2004. 65

[79] H. Lindsey, N.O. Petersen, and S.I. Chan. Physicochemical characterization of 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in model membrane systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 555(1) :147–167, 1979. 132

[80] Xiangan Liu, Qinfen Zhang, Kazuyoshi Murata, Matthew L Baker, Matthew B Sullivan, Caroline Fu, Matthew T Dougherty, Michael F Schmid, Marcia S Osburne, Sallie W Chisholm, and Wah Chiu. Structural changes in a marine podovirus associated with release of its genome into prochlorococcus. *Nat Struct Mol Biol*, 17(7) :830–836, 2010. 78

[81] F. Livolant and A. Leforestier. Condensed phases of DNA : structures and phase transitions. *Progress in polymer science*, 21(6) :1115–1164, 1996. 85

[82] D. Lof, K. Schillen, B. Jonsson, and A. Evilevitch. Dynamic and static light scattering analysis of DNA ejection from the phage lambda. *Physical Review E*, 76(1), 2007. 66

[83] S. Mangenot, M. Hochrein, J. Radler, and L. Letellier. Real-time imaging of DNA ejection from single phage particles. *Current Biology*, 15(5) :430–435, 2005. 63, 98, 103

[84] W. Margolin. Sculpting the bacterial cell. *Current Biology*, 19(17) :R812–R822, 2009. 127

[85] John F. Marko and Eric D. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28(26) :8759–8770, December 1995. 157

[86] Jérôme Mathé, Hasina Visram, Virgile Viasnoff, Yitzhak Rabin, and Amit Meller. Nanopore unzipping of individual DNA hairpin molecules. *Biophysical Journal*, 87(5) :3205–3212, November 2004. 5, 15, 18, 31

[87] Amit Meller, Lucas Nivon, Eric Brandin, Jene Golovchenko, and Daniel Branton. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3) :1079 –1084, February 2000. 10

[88] Ian J Molineux. No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular Microbiology*, 40(1) :1–8, 2001. 125

[89] M. Mondigler, R T Vogele, and K J Heller. Overproduced and purified receptor-binding protein pb5 of bacteriophage T5 binds to the receptor protein FhuA. *FEMS Microbiology Letters*, 130(2-3) :293–300, 1995. 62

[90] L R Montes, A. Alonso, F M Goni, and L A Bagatolli. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. *Biophysical Journal*, 93 :3548–3554, 2007. 119

[91] Paul Mueller, Donald O. Rudin, H. Ti Tien, and William C. Wescott. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*, 194(4832) :979–980, 1962. 131

[92] J. Muzard, M. Martinho, J. Mathé, U. Bockelmann, and V. Viasnoff. DNA translocation and unzipping through a nanopore : Some geometrical effects. *Biophysical Journal*, 98(10) :2170–2178, May 2010. 46

[93] Jonathan Nakane, Matthew Wiggin, and Andre Marziali. A nanosensor for transmembrane capture and identification of single nucleic acid molecules. *Biophysical Journal*, 87(1) :615–621, 2004. 5, 15

[94] A. C. T. North and Alexander Rich. X-Ray diffraction studies of bacterial viruses. *Nature*, 191(4795) :1242–1245, 1961. 80

[95] S H Northrup and H P Erickson. Kinetics of protein protein association explained by brownian dynamics computer-simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8) :3338–3342, 1992. 70, 71

[96] T. Odijk. Statics and dynamics of condensed DNA within phages and globules. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 362 :1497–1517, 2004. 86

[97] Theo Odijk. Hexagonally packed DNA within bacteriophage T7 stabilized by curvature stress. *Biophysical Journal*, 75(3) :1223–1227, September 1998. 86

[98] Marianne De Paepe and François Taddei. Viruses' life history : towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLoS Biol*, 4(7) :e193, 2006. 60, 125

[99] Anton S Petrov, C Rebecca Locker, and Stephen C Harvey. Characterization of DNA conformation inside bacterial viruses. *Physical Review E*, 80(2 Pt 1) :021914, August 2009. 83, 108

[100] L. Plancon, M. Chami, and L. Letellier. Reconstitution of FhuA, an Escherichia coli outer membrane protein, into liposomes - binding of phage T5 to FhuA triggers the transfer of DNA into the proteoliposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(27) :16868–16872, 1997. 63, 71, 113

[101] L. Plancon, C. Janmot, M. le Maire, M. Desmadril, M. Bonhivers, L. Letellier, and P. Boulanger. Characterization of a high-affinity complex between the bacterial outer membrane protein FhuA and the phage T5 protein pb5. *Journal of Molecular Biology*, 318(2) :557–569, 2002. 63, 69, 71, 74

[102] C. Plisson, H E White, I. Auzat, A. Zafarani, C. Sao-Jose, S. Lhuillier, P. Tavares, and E V Orlova. Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. *EMBO Journal*, 26(15) :3720–3728, 2007. 57

[103] T. Pott, H. Bouvrais, and P. Meleard. Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 154(2) :115–119, 2008. 119

[104] P K Purohit, M M Inamdar, P D Grayson, T M Squires, J. Kondev, and R. Phillips. Forces during bacteriophage DNA packaging and ejection. *Biophysical Journal*, 88(2) :851–866, 2005. 80, 81, 87

[105] Prashant K. Purohit, Jané Kondev, and Rob Phillips. Mechanics of DNA packaging in viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6) :3173 –3178, March 2003. 85, 86, 87

[106] Yitzhak Rabin and Motohiko Tanaka. DNA in nanopores : Counterion condensation and coion depletion. *Physical Review Letters*, 94(14) :148103, April 2005. 11

[107] Sivaramakrishnan Ramadurai, Andrea Holt, Victor Krasnikov, Geert van den Bogaart, J. Antoinette Killian, and Bert Poolman. Lateral diffusion of membrane proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 131(35) :12650–12656, 2009. 121

[108] E. Raspaud, T. Forth, C. Sao-Jose, P. Tavares, and M. de Frutos. A kinetic analysis of DNA ejection from tailed phages revealing the prerequisite activation energy. *Biophysical Journal*, 93 :3999–4005, 2007. 66, 74

[109] D C RAU, B. LEE, and V A PARSEGIAN. MEASUREMENT OF THE REPULSIVE FORCE BETWEEN POLY-ELECTROLYTE MOLECULES IN IONIC SOLUTION - HYDRATION FORCES BETWEEN PARALLEL DNA DOUBLE HELICES. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(9) :2621–2625, 1984. 80, 86

[110] D C RAU and V A PARSEGIAN. DIRECT MEASUREMENT OF THE INTERMOLECULAR FORCES BETWEEN COUNTERION-CONDENSED DNA DOUBLE HELICES -

EVIDENCE FOR LONG-RANGE ATTRACTIVE HYDRATION FORCES. *Biophysical Journal*, 61(1) :246–259, 1992. 80

[111] D M Raymer, D N Fuller, M. White, S. Grimes, D. Anderson, C. Catalan, and D E Smith. Characterization of the bacteriophage lambda viral DNA packaging motor with optical tweezers. *Biophysical Journal*, pages 48A–48A, 2007. 93

[112] J P Rickgauer, D N Fuller, S. Grimes, P J Jardine, D L Anderson, and D E Smith. Portal motor velocity and internal force resisting viral DNA packaging in bacteriophage phi 29. *Biophysical Journal*, 94(1) :159–167, 2008. 93

[113] S C Riemer and V A Bloomfield. Packaging of DNA in bacteriophage heads - some considerations on energetics. *Biopolymers*, 17(3) :785–794, 1978. 80

[114] Forest Rohwer and Rob Edwards. The phage proteomic tree : a Genome-Based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*, 184(16) :4529–4535, August 2002. 54

[115] John SantaLucia. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4) :1460 –1465, February 1998. 15, 18

[116] C. Sao-Jose, M. de Frutos, E. Raspaud, M A Santos, and P. Tavares. Pressure built by DNA packing inside virions : Enough to drive DNA ejection in vitro, largely insufficient for delivery into the bacterial cytoplasm. *Journal of Molecular Biology*, 374(2) :346–355, 2007. 81, 93, 96

[117] Alexis F. Sauer-Budge, Jacqueline A. Nyamwanda, David K. Lubensky, and Daniel Branton. Unzipping kinetics of Double-Stranded DNA in a nanopore. *Physical Review Letters*, 90(23) :238101, 2003. 5, 15

[118] D E Smith, S J Tans, S B Smith, S. Grimes, D L Anderson, and C. Bustamante. The bacteriophage phi 29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, 413(6857) :748–752, 2001. 79, 80, 81, 92

[119] MV Smoluchowski. Three Lectures on Diffusion, Brownian Movement and Coagulation of Colloidal Particles. *Physik. Z.*, 17 :585, 1916. 71

[120] C E SNYDER and R H BENZINGER. 2ND-STEP TRANSFER OF BACTERIOPHAGE-T5 DNA - PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE T5-GENE A2-PROTEIN. *Journal of Virology*, 40(1) :248–257, 1981. 63

[121] Langzhou Song, Michael R. Hobaugh, Christopher Shustak, Stephen Cheley, Hagan Bayley, and J. Eric Gouaux. Structure of staphylococcal alpha -Hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 274(5294) :1859–1865, December 1996. 10

[122] H. H. Strey, V. A. Parsegian, and R. Podgornik. Equation of state for polymer liquid crystals : Theory and experiment. *Physical Review E*, 59(1) :999, January 1999. 86, 89

[123] J. A. Subirana, J. Lloveras, M. Lombardero, and E. Vinuela. X-ray scattering of the non-isometric bacillus subtilis phage [phi]29. *Journal of Molecular Biology*, 128(1) :101–106, February 1979. 81

[124] W.C. Summers. Bacteriophage research : early history. *Bacteriophages : Biology and Applications*, pages 5–27, 2005. 53

[125] C. Suttle. The viriosphere : the greatest biological diversity on Earth and driver of global processes. *Environmental Microbiology*, 7(4) :481–482, 2005. 54

[126] Jinghua Tang, Norman Olson, Paul J Jardine, Shelley Grimes, Dwight L Anderson, and Timothy S Baker. DNA poised for release in bacteriophage phi29. *Structure*, 16(6) :935–43, 2008. 80, 81

[127] E. Udho, K S Jakes, S K Buchanan, K J James, X X Jiang, P E Klebba, and A. Finkelstein. Reconstitution of bacterial outer membrane TonB-dependent transporters in planar lipid bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51) :21990–21995, 2009. 63, 113, 116

[128] Joost van Mameren, Peter Gross, Geraldine Farge, Pleuni Hooijman, Mauro Modesti, Maria Falkenberg, Gijs J. L. Wuite, and Erwin J. G. Peterman. Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43) :18231 –18236, October 2009. 32

[129] Wenonah Vercoutere, Stephen Winters-Hilt, Hugh Olsen, David Deamer, David Haussler, and Mark Akeson. Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel. *Nat Biotech*, 19(3) :248–252, March 2001. 5, 14, 16

[130] V. Viasnoff, N. Chiaruttini, and U. Bockelmann. Probing DNA base pairing energy profiles using a nanopore. *European Biophysics Journal*, 38(2) :263–269, 2009. 11

[131] J B Wang, Y. Jiang, M. Vincent, Y Q Sun, H. Yu, J. Wang, Q Y Bao, H M Kong, and S N Hu. Complete genome sequence of bacteriophage T5. *Virology*, 332(1) :45–65, 2005. 62

[132] Wu. Ion-dependent dynamics of DNA ejections for bacteriophage lambda. 2010. 93, 95, 96, 106, 109, 111

[133] Michael Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.*, 31(13) :3406–3415, 2003. 15, 18, 19

# Annexe A

# Informations sur T5

### A.0.7 Protéines structurales de T5

Les protéines sont classées selon leur taille moléculaire. Voici un tableau récapitulatif des différentes protéines structurales de T5 :

| Nom | Nombre par phage | Localisation et informations |
|---|---|---|
| pb1 | ? | fibre longue en forme de L protéine de fibre distale |
| pb2 | 4-5 | fibre droite (pointe) dans le tube de queue<br>"règle" la longueur de la queue<br>transmission du signal de fixation de FhuA |
| pb3 | ? | protéine de queue mineure |
| pb4 | ? | protéine de queue mineure |
| pb5 | 1 | récepteur bout de la queue<br>fixe spécifiquement de FhuA |
| pb6 | 3*40 | protéine de queue majeur protéine de queue<br>organisation trimérique |
| pb7 | ? | protéine portail |
| pb8 | 730 | protéine de capside majeure protéine majeure de tête<br>un domaine N-terminal est clivé lors de la maturation de la capside |
| pb9 | ? | protéine de queue majeure |
| pb10 | 114 | protéine de "décoration" sur les héxamères de pb8 |
| pb11 | ? | protéase |
| pb12 | ? | ? |
| pb13 | ? | protéine de queue mineure |

| | WT | AmHA911 + | AmHA911 - | St(0) |
|---|---|---|---|---|
| 1er Nick | 9748 (8.0%) | 9748 (8.0%) | / | 9748 (8.6%) |
| 2ème Nick | 22336 (18.3%) | 22336 (18.3%) | / | 22336 (19.7%) |
| 3ème Nick | 39746 (32.6%) | 39746 (32.6%) | / | / |
| 4ème Nick | 78573 (64.5%) | 78573 (64.5%) | / | 70533 (62%) |
| 5ème Nick | 121279 (99.6%) | 121279 (99.6%) | / | 112275 (99.1%) |

# Annexe B

# Solutions

## B.1 Tampon phage 1x

- 10mM Tris HCl pH 7.6
- 100mM NaCl
- 1mM MgSO4
- 1mM CaCl2

## B.2 Tampon phage AB 1x

Utilisée spécialement pour tamponner la solution d'antibleacher.
- 100mM Tris HCl pH 7.6
- 100mM NaCl
- 1mM MgSO4
- 1mM CaCl2

## B.3 Tampon phage divalent

- 10mM Tris HCl pH 7.6
- 10mM MgSO4
- 1mM CaCl2

## B.4 Tampon nanopore

- 10mM Tris HCl pH 7.4
- 1mM EDTA
- 1M KCl