

Etudes par cryo-microscopie électronique de la structure de virus : application aux bactériophages Gifsy-2 de Salmonella Typhimirium et T5 d'Escherichia Coli

Grégory Effantin

▶ **To cite this version:**

Grégory Effantin. Etudes par cryo-microscopie électronique de la structure de virus : application aux bactériophages Gifsy-2 de Salmonella Typhimirium et T5 d'Escherichia Coli. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011108

HAL Id: tel-00011108
https://theses.hal.science/tel-00011108

Submitted on 24 Nov 2005

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.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER de GRENOBLE
UFR de PHYSIQUE

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)
Spécialité : Physique

Études par cryo-microscopie électronique de la structure de virus : application aux bactériophages Gifsy-2 de *Salmonella Typhimurium* et T5 d'*E.Coli.*

Par **GREGORY EFFANTIN**

Soutenance le 23 novembre 2005

Sous la direction de Dr James CONWAY

Composition du jury
Mme L. Letellier
Mme E. Pebay-Peyroula
Mr J. Lepault
Mr L. Bossi
Mr N. Boisset
Mr J.F. Conway

Thèse préparée au Laboratoire de Microscopie Electronique Structurale de l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel – Unité mixte CEA/CNRS/UJF

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

REMERCIEMENTS

En premier lieu, mes remerciements s'adressent à James Conway à la fois en tant que directeur du LMES où s'est réalisée ma thèse et surtout pour tout le support qu'il m'a apporté en tant que responsable de thèse. Je le remercie pour son encadrement, son soutien tout le long de ma thèse, sa disponibilité, ses conseils, ses compétences scientifiques ainsi que pour m'avoir donner l'opportunité d'assister à deux excellentes conférences aux Etats-Unis et d'avoir contribué à l'amélioration de mon anglais de par nos nombreuses discussions.

Merci aux autres membres du LMES, Richard Wade, ancien directeur et fondateur du LMES sans qui je n'aurai sûrement pas disposé du même équipement; Elizabeth Hewat pour sa gentillesse et son aide en particulier pour la rédaction de ma thèse ; Emmanuelle Neumann pour son aide générale et en microscopie en particulier ; Fred Metoz régnant sans partage sur toutes les questions informatiques du labo. Merci aussi aux ex-LMES, nouveau LMM, Frank, Salvatore, Delphine, Isabel ainsi que mes comparses de bureau Serguey et Charles.

Merci aussi aux anciens LMES, Gauthier pour ses conseils en tout genre et Patricia pour son aide plus que précieuse sur mes débuts avec les bactériophages.

Je remercie aussi Rob Ruigrok et Guy Schoehn pour m'avoir donner accès au microscope de l'EMBL et re-Guy pour son aide et ses conseils souvent pertinents en microscopie par exemple.

Un grand merci à Nara Figueroa-Bossi et Lionello Bossi pour m'avoir accueilli 2 fois dans leur laboratoire afin de me perfectionner avec la production et la purification de Gifsy-2. Merci à Jean Lepault pour avoir accepté de juger mon travail et d'avoir mis en contact James avec Nara et Lionello sur les débuts du projet Gifsy-2. Merci à Sherwood Casjens et Roger Hendrix pour avoir, les premiers remarquaient les particularités du phage Gifsy-2 au niveau de son génome. Merci à Bob Duda pour ses conseils sur la purification des phages.

Je remercie aussi Pascale Boulanger et Lucienne Letellier pour leur collaboration, les échantillons qu'elles nous ont fait parvenir et leurs conseils sur le travail concernant le phage T5.

Un grand merci à Nicolas Boisset qui a eu la gentillesse d'accepter de juger mon tavail.

Merci également à Alasdair Steven pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail ainsi que ses encouragements.

Enfin, un grand merci à Sam, ancien du DEA et de l'IBS et à Jacques, futur thésard et compagnon des hauts et des bas d'une thèse. Finalement, je tiens à remercier mes parents, notamment pour m'avoir soutenu durant ses longues années d'études.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Introduction 6

Les bactériophages - Introduction 7

I. Définition et présentation 7
II. Découverte et intérêts majeurs dans l'étude des bactériophages 8
III. Les bactériophages : acteur important dans l'évolution des bactéries 9
IV. Modification de la pathogénie des bactéries par les bactériophages 10
V. La présentation de peptide à la surface de phages 11
VI. Diversité et classification 12
VII. Architecture d'un bactériophage infectieux de la famille des *Caudovirales* 14
A. La capside à symétrie icosaédrique des Caudovirales 14
B. Le connecteur 18
C. La queue 18
VIII. Infection d'une bactérie par un phage de la famille des *Caudovirales* 19
IX. Cycle d'assemblage de la capside d'un bactériophage 20
A. La formation d'un précurseur : la procapside 21
B. Clivage protéolytique 22
C. L'expansion : transition procapside – capside 22
D. La stabilisation 23
X. Similarités entre les virus procaryotes et eucaryotes 23

La microscopie électronique en transmission appliquée à l'observation d'échantillons biologiques – Introduction 25

I. Quelques rappels historiques 25
II. La microscopie électronique en transmission 27
A. Le canon à électrons 27
B. Les lentilles électromagnétiques et les défauts limitant la résolution 29
C. La colonne du microscope 30
III. Principes de la formation d'une image agrandie par microscopie électronique en transmission 31
A. Interactions électrons/matière 31
B. Fonction d'onde associée au trajet du faisceau d'électron dans la colonne du microscope (d'après Frank, 1996) 32
1. Interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon 32
2. Fonction d'onde associée au passage des électrons à travers l'objectif 33
3. Fonction d'onde dans le plan image 33
C. La théorie du transfert de contraste 34
1. La fonction de transfert de contraste (CTF) 34
2. La fonction enveloppe 35
3. Correction de la fonction de transfert de contraste 36
IV. La microscopie électronique en transmission appliquée à l'observation d'objets biologiques 37
A. La coloration négative 37
B. La cryo-microscopie électronique 38

C. Principe général de la reconstruction tridimensionnelle de molécules isolées à partir d'images prise en microscopie électronique en transmission 39
V. La cryo-microscopie électronique en biologie structurale 40

Caractérisation de la structure de la capside de Gifsy-2 à différentes étapes de son assemblage par microscopie électronique en transmission 41

I. Le bactériophage Gifsy-2 41
A. Introduction 41
B. Contexte, intérêts et objectifs de l'étude de Gifsy-2 en microscopie électronique 43
II. Résultats 45
A. Production et purification du bactériophage Gifsy-2 45
B. Les protéines structurales de Gifsy-2 46
1. Organisation générale de la région du génome de Gifsy-2 codant pour les protéines structurales 46
2. Identification de la protéine de capside majeure 48
C. Reconstruction de la capside de Gifsy-2 par cryo-microscopie électronique 49
1. Les différents types de capside en solution 49
2. Reconstructions de la procapside de Gifsy-2 51
3. Reconstructions des capsides de Gifsy-2 après expansion 55
D. Similarités structurales entre les protéines composant la capside des bactériophages de la famille des Caudovirales 61
1. Ajustement du modèle atomique d'HK97 dans la densité électronique de la procapside et de la capside mature de Gifsy-2 62
2. Ajustement du modèle atomique de la protéine de décoration GpD du phage Lambda dans la densité électronique de la capside mature de Gifsy-2 64
III. Conclusion et perspectives 65
A. Structure des capsides de phage 65
B. Stabilisation de la capside mature des bactériophages par une protéine externe 66
C. Les gènes structuraux impliqués dans l'assemblage de la capside de Gifsy-2 67
D. Perspectives 69
IV. Matériels et méthodes pour la microscopie électronique - Reconstruction tridimensionnelle d'objets biologiques par microscopie électronique en transmission 71
A. Préparation des échantillons 71
1. La coloration négative 71
2. La cryo-microscopie électronique 72
B. Prise d'images en microscopie électronique en transmission 73
C. Sélection des micrographies et numérisation 73
D. Analyse des données enregistrées en microscopie électronique en transmission 74
1. Sélection des particules 74
2. Spectre de puissance et calcul de la sous focalisation 74
3. Correction de la fonction de transfert de contraste 76
4. Détermination des paramètres d'orientation de chaque particule 78
5. Calcul de la reconstruction 81
6. Détermination de la résolution 82
V. Matériels et méthodes concernant Gifsy-2 83
A. Souches bactériennes 83
B. Production et purification des capsides de bactériophage 84

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

C. Gel acrylamide en condition dénaturante 85
D. Ajustement des modèles cristallographiques dans la densité électronique des reconstructions déterminées par microscopie électronique. 85
E. Microscopie électronique - Notes spécifiques à Gifsy-2 86

Le bactériophage T5 d'*E.Coli* 88

I. Introduction 88
II. Structure de la capside de T5 par coloration négative 91
III. Structure de la capside de T5 en cryo-microscopie électronique 94
A. Capside mature pleine 94
B. Capside vide 96
C. Caractéristique et identification de la protéine de capside mineure 98
IV. Similarités entre les protéines de capside de T5 et d'HK97 100
A. Modélisation d'HK97 gp5 dans la carte de densité de T5 100
B. Organisation des gènes structuraux 102
V. Analyse de la queue du bactériophage T5 105
A. Analyse du tube de la queue de T5 en coloration négative 106
B. Analyse du tube de la queue de T5 en cryo-microscopie électronique 109
C. Analyse de la partie distale de la queue de T5 en coloration négative 112
VI. Reconstruction du complexe capside/queue - Visualisation du connecteur 113
VII. Conclusions et perspectives 114
A. Détermination d'un modèle initial par coloration négative 114
B. Structure de la capside mature de T5 115
C. Similarités structurales avec les protéines de capside majeure de T4 et HK97 116
D. Structure du long tube flexible de la queue du phage T5 117
E. Perspectives 118
VIII. Matériels et Méthodes 121
A. Préparation des capsides vides 121
B. Microscopie électronique et analyse des données 121
C. Analyses de séquence 122
D. Reconstruction hélicoïdale du tube de la queue de T5 122
E. Reconstruction de la partie distale de la queue de T5 124

Conclusions 125

Bibliographie 128

ANNEXE 138

Bacteriophage T5 structure reveals similarities with HK97 & T4 suggesting evolutionary relationships 139

Maturation pathway of gifsy-2, an HK97-like phage of Salmonella 164

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Introduction

L'étude de la structure et de la fonction des virus, tels les bactériophages, a conduit à une compréhension fondamentale de leur biologie et a contribué aux développements technologiques en biophysique et en biologie moléculaire. Du fait, entre autres, de la mise au point de méthodes de manipulation génétiques robustes, de nombreux aspects du cycle de vie des bactériophages ont été et sont toujours étudiés. Les recherches sur les bactériophages ont contribué à la mise en évidence de certaines caractéristiques fondamentales, et élémentaires aujourd'hui, sur le fonctionnement des cellules comme la nature des gènes et la découverte des ARN messagers. Depuis leur découverte, les bactériophages se sont, petit à petit, montrés comme d'excellents systèmes modèles dans la compréhension de virus plus complexes et de fonctions cellulaires fondamentales. Une cellule peut être vu comme une « collection de machines moléculaires » (Alberts, 1998), chaque machine étant constituée par l'assemblage de différentes protéines. Des efforts considérables sont mis en place pour comprendre le fonctionnement de ces complexes. Par ailleurs, il est tout aussi fondamental de connaître le procédé par lequel ces complexes sont assemblés. Les virus tels les phages sont un exemple typique de complexe macromoléculaire capable de s'auto assembler en suivant une séquence d'événement ordonnée, régulée principalement par des interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique.

En particulier, au travers d'expériences réalisées sur deux phages différents (le phage Gifsy-2 de *Salmonella Typhimurium* et le phage T5 d'*E.Coli*), les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent plus particulièrement dans deux thématiques de recherche concernant :

- Les mécanismes d'assemblage et de maturation des macromolécules
- Les mécanismes intervenant dans le confinement et le transport de l'ADN

Dans un premier temps, je m'attacherai dans cette introduction à présenter dans une introduction générale certaines caractéristiques du « monde » des bactériophages ainsi que certains axes et applications de recherches. Aussi, leur morphologie et leur structure seront détaillées à partir de résultats de recherches obtenus sur certains phages. Enfin, je me concentrerai sur les différentes protéines partenaires interagissant dans l'injection de l'ADN lors de l'infection de la bactérie hôte et dans l'assemblage et la maturation de leur capside lors de leur réplication.

Ensuite, je m'attarderai toujours en introduction à présenter la microscopie électronique en transmission appliquée à la biologie. Cette technique s'est beaucoup développée et est parfaitement adaptée à l'observation et à la caractérisation des virus dans leur ensemble.

Les bactériophages - Introduction

I. Définition et présentation

Les bactériophages (ou phages) sont des virus infectant spécifiquement les bactéries. Au même titre que les autres virus infectant des cellules végétales ou eucaryotes, les bactériophages sont inactifs dans le milieu extracellulaire et ils se reproduisent en s'insinuant dans le métabolisme de leur cellule hôte. Ils possèdent un génome (ADN ou ARN), déterminant toutes les propriétés du virus, qui est contenu dans une enveloppe appelée capside. La plupart des phages possèdent une queue attachée à la capside, l'extrémité de cette queue s'accroche spécifiquement à des protéines composant la surface de la bactérie cible. Ensuite, l'information génétique contenue dans la capside est injectée par la queue directement dans le cytoplasme de la bactérie. À ce stade, on distingue deux types de bactériophages :

- les bactériophages « lytiques » vont détourner les ressources matérielles et énergétiques de la bactérie dans le but de produire de nouveaux virus qui vont s'accumuler à l'intérieure de la bactérie. Quelques heures après l'infection, les nouveaux phages sont libérés par l'explosion de la bactérie appelée « lyse ».
- les bactériophages « tempérés » : l'information génétique d'origine virale est intégrée dans le génome de la bactérie et l'expression des gènes viraux nécessaires au début de la réplication virale est empêchée. Ce phénomène est appelé lysogénie et il y aura coexistence de la bactérie et du bactériophage (appelé prophage dans ce cas particulier) pour un temps indéfini. Néanmoins, le phage peut toujours entrer en phase de réplication sous certaines conditions particulières (exposition aux rayons UV par exemple) s'il n'a pas subit de

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

mutations défavorables durant la période de lysogénie (figure 1). Dans le cas contraire, il devient inactif (prophage cryptique).

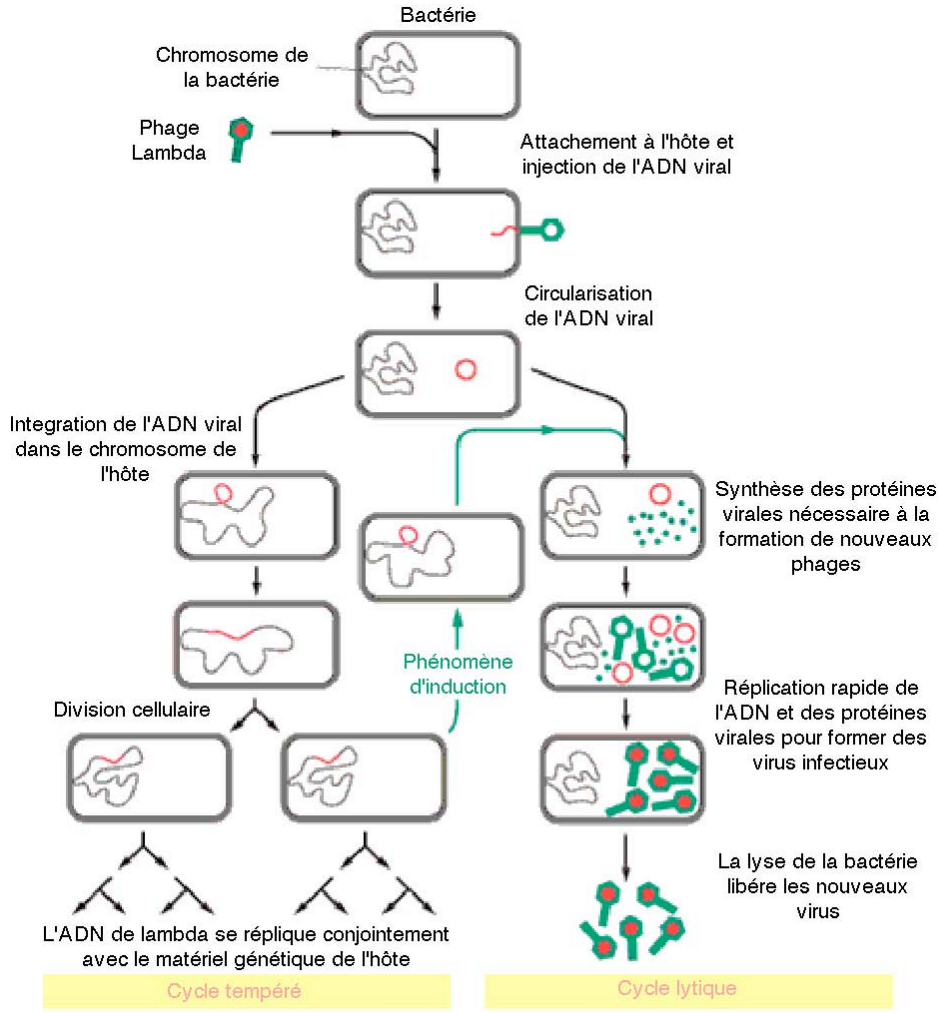


Figure 1 – Schéma général du cycle de vie du bactériophage tempéré λ

II. Découverte et intérêts majeurs dans l'étude des bactériophages

La découverte des bactériophages est attribuée à la fois à l'anglais Frederick Twort en 1915 et au canadien Felix d'Herelle en 1917. Très vite, il apparaît que les bactériophages ont la capacité de tuer les bactéries et ouvrent des possibilités thérapeutiques dans la lutte contre celles-ci. Ces recherches seront menées avec plus ou moins de succès jusque dans les années 1940 où la pénicilline et les premiers antibiotiques chimiques apparaissent, supplantant totalement la thérapie « phagique ». Pour autant, la recherche sur les bactériophages

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

continue ; de nouveaux phages infectant une variété de plus en plus grande de bactérie sont isolés, leur nature virale est clairement mise en évidence ainsi que leurs composants indissociables que sont l'ADN et les protéines. Les phages sont aussi intimement associés au développement de ce qui deviendra plus tard la biologie moléculaire. Ainsi, à partir des années 1950, la recherche sur les bactériophages a un rôle important dans l'élucidation de certains aspects fondamentaux concernant la nature des gènes et la manière dont l'information génétique est lue et détermine les propriétés d'un organisme. De gros efforts sont consentis dans l'étude des phages infectant *E.Coli* comme les bactériophages lytiques de la série T d'*E.Coli* (phage T1, T2, …,T7) et le phage tempéré Lambda. Beaucoup de ces résultats seront réutilisés à partir des années 1970 pour la mise en place des outils modernes de la biologie moléculaire adaptés à la manipulation d'ADN recombinante.

III. Les bactériophages : acteur important dans l'évolution des bactéries

Bien entendu, l'avènement de la biologie moléculaire et la possibilité d'étudier les gènes d'organisme plus complexe notamment eucaryote bouleverse profondément la recherche en biologie et sur les bactériophages. En particulier, de plus en plus de génomes de bactéries sont séquencés et révèlent de manière évidente les liens très forts unissant les prophages à leur bactérie hôte. Ainsi, en 2003, sur les 82 génomes complets de bactéries, 51 contiennent des prophages. En tout, 230 prophages putatifs ont été identifiés. Les prophages peuvent constituer jusqu'à 10-20% de la totalité du génome d'une bactérie et contribue significativement aux différences observées entre bactéries d'une même espèce (Casjens, 2003). Beaucoup de ces prophages sont inactifs, ils sont parfois intégrés au génome bactérien depuis de si longue période qu'ils ont subi des modifications génétiques irréversibles. Au contraire, certains sont actifs et peuvent s'exciser du génome bactérien, se reproduire et infecter de nouveaux hôtes. Lors de son intégration dans le génome de la bactérie, le phage tempéré dirige la synthèse d'un répresseur qui bloque l'expression de certains de ces propres gènes ainsi que ceux d'autres phages lysogènes très proches de lui. Ceci est un bénéfice non négligeable pour la bactérie d'autant que certains prophages aident en plus la bactérie en la protégeant contre l'infection par certains phages lytiques sans rapport avec eux. Occasionnellement, un prophage échappe à la régulation par le répresseur et son ADN est excisé du génome bactérien. Cette opération ne se fait pas toujours de manière précise et

quelques gènes de la bactérie sont transmis à une nouvelle bactérie par l'intermédiaire du phage. Ce phénomène, appelé transduction, joue un rôle significatif dans l'échange génétique entre bactéries au même titre que les éléments génétiques mobiles tels les plasmides (phénomène appelé conjugaison) (Wagner et al., 2002).

IV. Modification de la pathogénie des bactéries par les bactériophages

Bacterial property altered	Mechanism
Colonization/adhesion	
E. coli	The λ-encoded *lom* gene promotes adhesion to buccal epithelial cells.
P. aeruginosa	Phage FIZ15 promotes adhesion to buccal epithelial cells.
S. mitis	The SM1-encoded PblA and PblB surface proteins promote adhesion to platelets.
V. cholerae	The toxin-coregulated pilus may be phage encoded.
Invasion	
S. enterica	Phage SopEϕ transduces a type III secretion system effector that promotes entry into epithelial cells.
	Phage Gifsy-1 encodes *gipA*, a gene that enhances survival in the Peyer's patch.
S. pyogenes	Hyaluronidase is phage encoded.
S. aureus	Fibrinolysin is phage encoded.
Resistance to serum/phagocytes	
E. coli	The λ-encoded *bor* gene confers a survival advantage in animal serum.
P. aeruginosa	Phages encode enzymes that alter the O antigen.
S. enterica	Phage Gifsy-2 encodes SodC, a superoxide dismutase.
	Phages encode enzymes that alter the O antigen.
S. dysenteriae	Phages encode enzymes that alter the O antigen.
S. aureus	Phages encode CHIPS, a phagocytotoxin.
	Phage ϕPVL encodes the Panton-Valentine leukocidin.
S. pyogenes	Lysogeny up-regulates the antiphagocytic M protein.
Exotoxin production	
B. avium	Pertussis toxin is phage encoded in *B. avium*.
C. botulinum	Botulinum toxin is phage encoded.
C. diphtheriae	Diphtheria toxin is phage encoded.
E. coli	The Shiga toxins are phage encoded.
P. aeruginosa	Pseudomonas cytotoxins are phage encoded.
S. dysenteriae	The Shiga toxin genes are associated with phage sequences, probably a defective prophage.
S. aureus	Staphylococcal enterotoxins are phage encoded. Staphylococcal exfoliative toxins are phage encoded. Toxic shock syndrome toxin is encoded by SapI, a mobile pathogenicity island transduced at high frequency by phage 80α.
S. pyogenes	Streptococcal pyrogenic (erythrogenic, scarlatinal) exotoxins are phage encoded.
V. cholerae	Cholera toxin is phage encoded.
Susceptibility to antibiotic	
S. aureus	Generalized transduction contributes to horizontal transmission of gram-positive antibiotic-resistance genes.
S. pyogenes	
Transmission	
V. cholerae	Phage-encoded cholera toxin likely promotes transmission by stimulating copious amounts of watery diarrhea.

Figure 2 – Table résumant les propriétés bactériennes modifiées par la production de protéines apportées par un bactériophage (adaptée de Wagner et al.,2002)

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Avec le temps, de nombreux résultats de recherche montrent que non seulement les phages contribuent à l'évolution des bactéries par le biais de la transduction mais, aussi ceux-ci contribuent directement à la toxicité des bactéries. L'acquisition de nouveaux gènes par l'intermédiaire d'un phage lysogène peut, dans certains cas, modifier sensiblement la pathogénie de la bactérie. Ainsi, il a été montré que certaines toxines contribuant significativement à la nocivité d'une bactérie sont codées par des gènes de bactériophages. Par exemple, la toxine du choléra est contenue dans le génome du bactériophage filamenteux CTXΦ qui infecte les bactéries *Vibrio Cholerae* (Davis et al., 2003). Par ailleurs, certains gènes portés par des phages peuvent modifier profondément n'importe quelle étape du processus infectieux d'une bactérie comme l'adhésion, la colonisation, l'invasion, la résistance aux défenses immunitaires, la sensibilité aux antibiotiques et la transmissibilité entre humains (figure 2).

V. La présentation de peptide à la surface de phages

La présentation de peptides à la surface de phages filamenteux a été démontrée pour la première fois par Georges Smith en 1985. Certains bactériophages peuvent présenter en surface des peptides en fusion avec une des protéines qui les compose tout en conservant leur intégrité et leur caractère infectieux (figure 3). On a ainsi crée des banques de phages recombinants qui sont sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible. Ainsi, il est possible de rapidement caractériser les épitopes d'anticorps monoclonaux, de nouveaux ligands pour des récepteurs ou de nouveaux substrats d'enzymes. Les phages dont les peptides s'accrochent à une nouvelle cible sont ensuite analysés et testés pour l'activité recherchée (Smith et Petrenko, 1997). Aussi, la présentation de peptides à la surface des phages est utilisée en nano biotechnologie pour développer des peptides s'accrochant à la surface de différents semi-conducteurs. Ces peptides sélectionnés pourraient être utilisés pour contrôler à une échelle nanométrique l'assemblage et le placement de matériaux utilisés en électronique (Whaley et al., 2000).

Phage	Fusion protein	Type of fusion	
		N-terminal	C-terminal
Filamentous	P3	y	y
	P8	y	-
	P6	-	y
	P7/P9	y	-
	Jun-Fos	-	y
Lambda	V	-	y
	D	y	y
T4	Wac	-	y
	Soc	y	y
	Hoc	y	-
T7	gp10	-	y

y=yes

Figure 3 – Différentes protéines de phages utilisées pour la présentation de peptides en surface (d'après « The Bacteriophages »)

VI. Diversité et classification

Les bactériophages sont probablement l'une des formes de vie les plus répandus sur Terre. Il y a typiquement ~ 10^7 phages à queue par millilitre dans les eaux de mer côtières. Ceci n'est pas étonnant étant donné que leurs hôtes sont les bactéries qui sont elles-mêmes très courantes quels que soient les milieux. Les phages sont typiquement en excès d'un facteur 5 à 10 par rapport aux bactéries, ils sont associés à quasiment tous les types de bactéries et présentent aussi une très grande diversité de sous genres qui est, en fait, comparable à la diversité qu'il existe chez les virus de plantes ou d'animaux (Hendrix, 2002). Les phages peuvent être classés suivant quelques caractéristiques particulières telles :

- leur morphologie : symétrie de la capside (icosaédrique, hélicoïdale), présence d'une queue ou non, enveloppe de lipides entourant la capside… (figure 4)
- leur gamme d'hôtes
- la nature de leur génome : il peut s'agir soit d'ADN ou d'ARN, sous une forme linéaire ou circulaire, double ou simple brin

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Symmetry	Nucleic Acid	Order and Families	Genera	Members	Particulars
Binary	DNA, ds, L	*Caudovirales*	15	4950	
(tailed)		*Myoviridae*	6	1243	Tail contractile
		Siphoviridae	6	3011	Tail long, noncontractile
		Podoviridae	3	696	Tail short
Cubic	DNA, ss, C	*Microviridae*	4	40	
	ds, C, T	*Corticoviridae*	1	3?	Complex capsid, lipids
	ds, L	*Tectiviridae*	1	18	Internal lipoprotein vesicle
	RNA, ss, L	*Leviviridae*	2	39	
	ds, L, S	*Cystoviridae*	1	1	Envelope, lipids
Helical	DNA, ss, C	*Inoviridae*	2	57	Filaments or rods
	ds, L	*Lipothrixviridae*	1	6?	Envelope, lipids
	ds, L	*Rudiviridae*	1	2	Resembles TMV
Pleomorphic	DNA, ds, C, T	*Plasmaviridae*	1	6	Envelope, lipids, no capsid
	ds, C, T	*Fuselloviridae*	1	8?	Spindle-shaped, no capsid

C, circular; L, linear; S, segmented; T, superhelical; 1, single-stranded; 2, double-stranded.

Figure 4 – Classification et quelques caractéristiques générales sur les bactériophages (d'après « The Bacteriophages »)

Dans ce mémoire, je m'intéresserai plus particulièrement aux phages possédant un génome sous la forme d'un double brin d'ADN linéaire, ayant une queue attachée à leur capside qui, dans la majorité des cas, a une symétrie icosaédrique. Ce type de phage appartient à la famille des *Caudovirales*. Ils sont uniquement composés d'ADN et de protéines, leur génome est d'une taille relativement large pour des virus, environ 50 kbp (50000 paires de bases) en moyenne et peut atteindre environ 500 kbp pour le bactériophage G de *Bacillus megaterium* ce qui est plus grand que le génome des plus petites bactéries. L'ensemble des phages à queue représente certainement le plus important groupe d' « organismes » similaires dans la biosphère. Près de 5000 phages à queue différents ont été décrits à ce jour (Hendrix et al., 1999 ; Ackermann, 2003). La famille des *Caudovirales* se divise en trois sous-familles classées suivant la morphologie de leur queue :

- les *Siphoviridae* (61 % des phages à queue connus) possèdent une longue queue non contractile (exemples : phages Lambda, HK97, T5...)

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

- les *Myoviridae* (25 %) possèdent une longue queue contractile (phages T2, T4, T6, G...)
- les *Podoviridae* (14 %) possèdent une queue courte et trapue (phage T7, P22...)

VII. Architecture d'un bactériophage infectieux de la famille des *Caudovirales*

Avec la mise en place de méthodes biophysiques comme la radio cristallographie et la microscopie électronique, il est possible d'étudier à haute résolution la strucure des protéines composant la capside des virus. L'étude des phages a contribué à une meilleure compréhension des différentes étapes du processus d'assemblage du virus infectieux, des mécanismes et des stratégies d'infection de la bactérie hôte.

Étant donné leur extrême diversité, les bactériophages à queue possèdent des morphologies très variées. Cependant, la structure de ces virus peut être décomposée en 3 domaines principaux : la capside, le connecteur et la queue (figure 5).

A. La capside à symétrie icosaédrique des Caudovirales

Chez les phages à queue, la capside est uniquement constituée de protéines dont l'ensemble forme une enveloppe contenant et protégeant l'ADN viral. En cela, les phages à queue se distinguent des autres familles de bactériophages qui possèdent certains membres ayant des capsides plus complexes constituées par plusieurs couches protéiques et/ou des membranes lipidiques (Ackermann, 2003).

D'une manière similaire à l'ensemble des virus, la capside des phages à queue est constituée par la répétition d'une protéine ou plusieurs protéines de capside s'arrangeant suivant une symétrie icosaédrique (Dokland et al., 1993 ; Conway et al., 1995).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

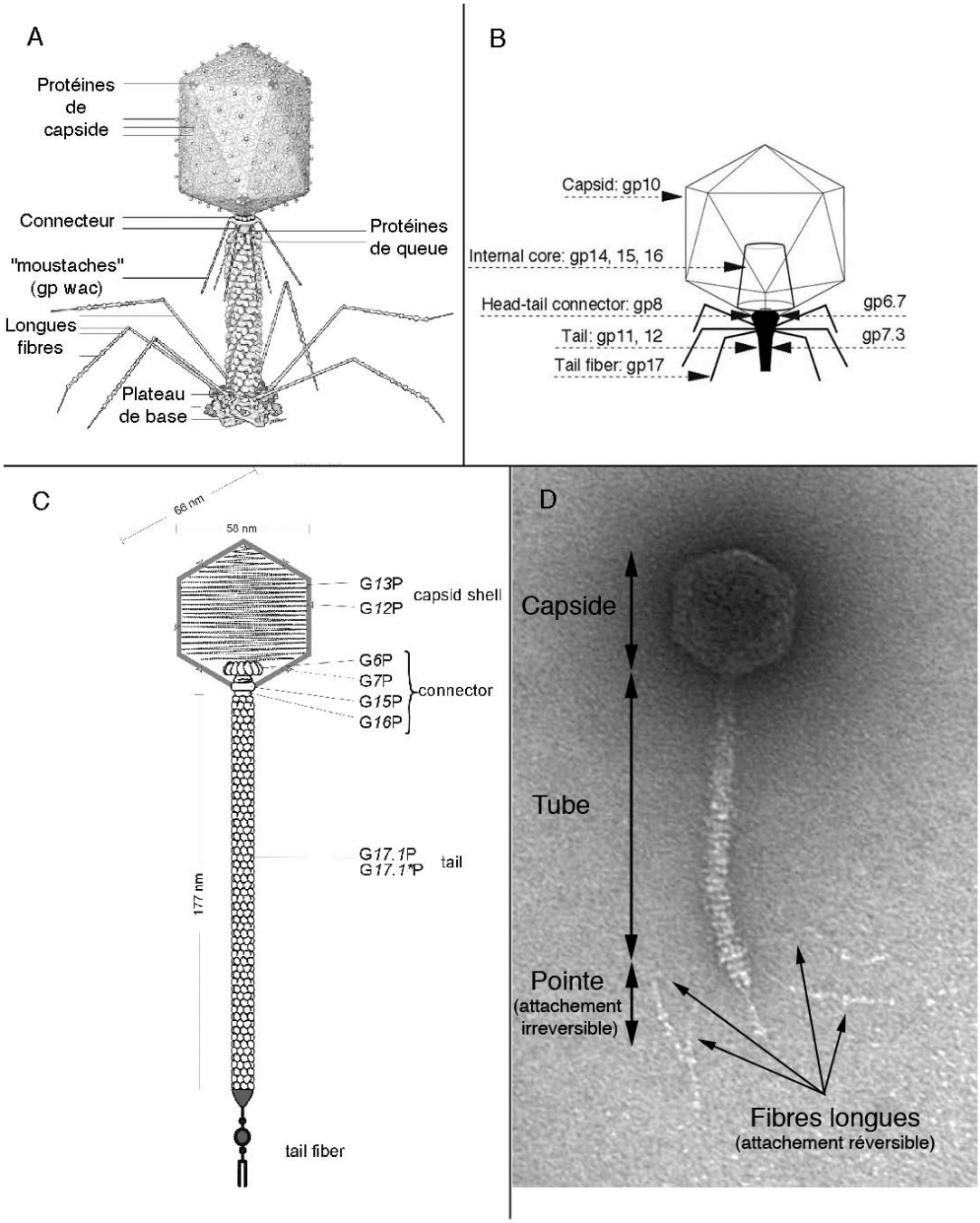


Figure 5 – A, B, C. Schémas illustrant la morphologie et les différentes protéines structurales composant respectivement le phage T4 (Myoviridae, queue contractile), T7 (Podoviridae, queue courte) et SPP1 (Siphoviridae, queue non contractile). D. Image prise en coloration négative du phage λ (Siphoviridae, queue non contractile) illustrant les différentes parties le constituant notamment sa queue.

Les capsides à symétrie icosaédrique, constituées par de multiples copies de la même protéine, sont une solution économique d'un point de vue génétique pour contenir et transporter un génome viral (Caspar & Klug, 1962) et sont très répandues en virologie (Baker

et al., 1999). Dans les cas des phages à queue, l'arrangement icosaédrique ne s'applique pas à toutes les protéines composant la tête du phage. Ainsi, par exemple, le connecteur (voir partie suivante) imbriqué à un sommet de la capside, possède une symétrie différente dont on ne tient pas compte lorsque l'on parle de capside à symétrie icosaédrique (Moody, 1999).

L'icosaèdre (figure 6) est une figure géométrique d'aspect sphérique délimité par 20 triangles équilatéraux identiques et 12 sommets. Chaque icosaèdre possède un ensemble de symétries fixes passant par son centre : 6 axes d'ordre 5 à chaque sommet, 10 axes d'ordre 3 au centre des 20 faces triangulaires et 15 axes d'ordre 2 au milieu des 30 arêtes (figure 6).

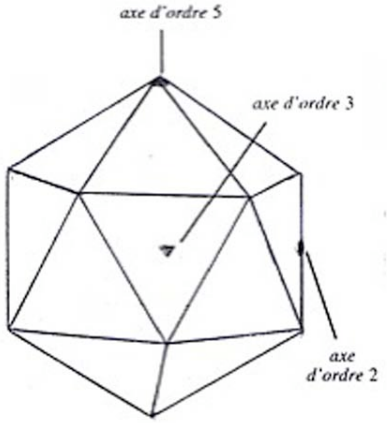


Figure 6 – Schéma d'un icosaèdre

Au sein d'une capside virale à symétrie icosaédrique, en appliquant les éléments de symétrie de l'icosaèdre à une sous unité protéique ne passant pas par un axe de symétrie, on obtient 60 équivalents. Ceci signifie qu'un virus à symétrie icosaédrique peut être obtenu à partir d'une unité asymétrique représentant 1/60ème du volume total (Baker et al., 1999).

La capside virale la plus simple, ayant une structure icosaédrique, comprend 60 sous unités de la même protéine, en tous points équivalentes. Pour décrire l'arrangement icosaédrique des sous unités d'un virus plus gros, contenant plus de 60 répétitions de la même protéine, il faut introduire le principe de quasi-équivalence entre les sous unités (Caspar & Klug, 1962 ; Johnson & Speir, 1997). Les sous unités protéiques sont chimiquement identiques, mais il y a de légères variations moléculaires régulières entre certaines sous unités et dans les interactions entre ces sous unités. Ces variations de conformation ordonnées et précises font que les sous unités ne sont plus symétriquement dans des positions équivalentes (quasi-équivalence).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Ainsi, par exemple, la capside d'un virus composée de 180 répétitions de la même protéine contiendra 3 types de positions dites quasi-équivalentes qui forme l'unité asymétrique du virus.

D'un point de vue géométrique, une capside à symétrie icosaédrique peut être formée à partir d'un réseau 2D d'hexagones (Figure 7a). Pour incurver ce réseau et générer le volume, certains hexagones doivent être convertis en pentagones. La position de ces pentagones sur le réseau 2D original (et des 12 sommets de l'icosaèdre final) est définie par les entiers h et k (Figure 7b-c-d). Caspar et Klug ont démontré que pour certaines valeurs du nombre de triangulation ($\mathbf{T = h^2 + hk + k^2}$ où h et k sont 2 entiers positifs), il était possible de former une structure à symétrie icosaédrique en disposant les sous unités avec seulement de légères différences dans les façons d'établir les liaisons entre elles (respectant ainsi le principe de quasi-équivalence). Le nombre total de sous unités est donné par 60*T et le nombre de sous unités dites quasi équivalentes par unité asymétrique est égal à T.

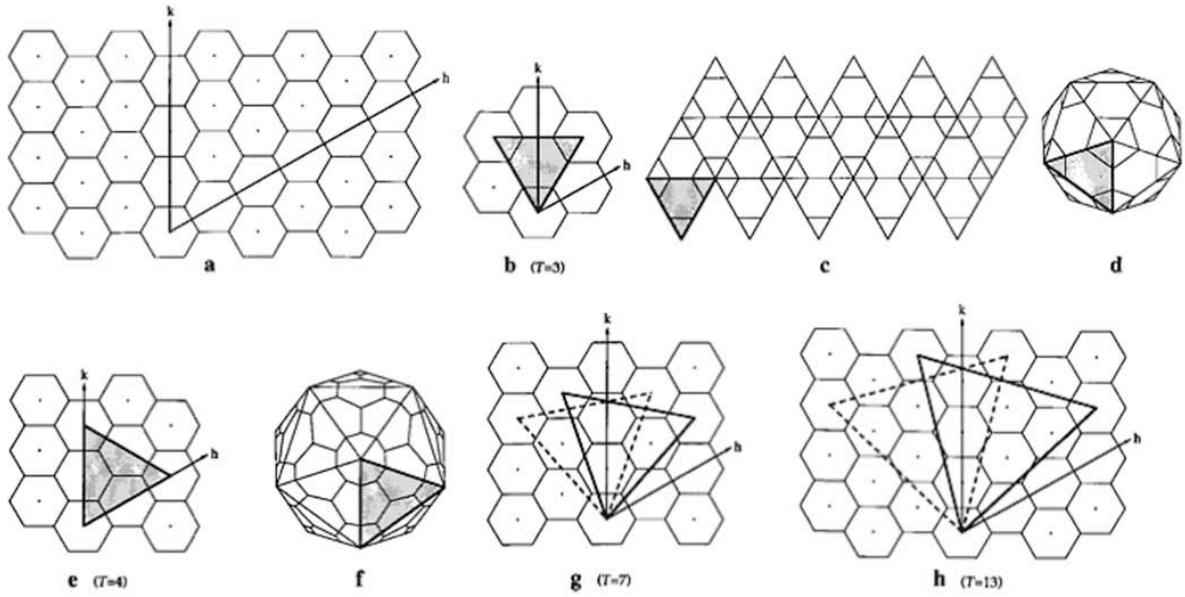


Figure 7 – (a) – Réseau 2D d'hexagones dont les centres sont fonctions des axes de coordonnées h et k. (b, c, d) – Construction d'une capside T = 3 (h, k = 1,1) : un triangle équilatéral unique peut être défini pour chaque hexamère indexé (b) – Un ensemble de 20 triangles équilatérales définis en (b) peut être formé (c) et peut être replié de manière à générer une particule ayant une symétrie icosaédrique (d)

e, f – T=4 (h, k = 2,0).

g – triangle continue T = 7l (h, k = 2,1), triangle pointillé T = Td (h, k = 1,2).

h – triangle continu T = 13l (h, k = 3,1), triangle pointillé T = 13d (h, k = 1,3)

(adapté d'après Johnson, 1996)

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

B. Le connecteur

Le connecteur est un complexe multi protéique situé à l'un des sommets de la capside (figure 5). Il est à la fois en interaction avec la capside mais aussi avec l'ADN et les éventuelles protéines internes ainsi qu'avec la queue du phage (Lurz et al., 2001). Le connecteur est l'élément central de la machinerie servant à l'incorporation de l'ADN viral dans la capside lors de la réplication des phages dans la bactérie. Et c'est aussi en passant par le connecteur puis la queue que l'ADN viral est injecté dans le cytoplasme de la bactérie (Ponchon et al., 2005).

Le composant principal du connecteur est la protéine portail à laquelle s'ajoute d'autres protéines de compléments suivant les phages. La structure atomique du connecteur du phage phi29 montre que cette protéine s'assemble sous la forme d'un dodécamère ayant un canal central de 35 Å suffisamment large pour le passage d'un double brin d'ADN (Simpson et al., 2000 ; Guasch et al., 2002). Bien que différente du point de vue de leur séquence primaire, la structure du connecteur de plusieurs phages à queue (T3, T7, P22, SPP1) par cryo-microscopie électronique suggère une architecture commune à celle du phage phi29 pour ce composant essentiel dans l'assemblage des virions et dans l'infection de nouvelles bactéries (Valpuesta et al., 2000 ; Agirrezabala et al., 2005 : Tang et al., 2005).

C. La queue

La queue est un complexe multi protéique assemblé indépendamment de la capside et du connecteur. L'ancrage de la queue sur la capside au niveau du connecteur termine le cycle d'assemblage des bactériophages. La queue des phages est impliquée dans la reconnaissance et l'attachement aux bactéries hôtes, dans le transpercement des membranes bactériennes ainsi que dans le transfert de l'ADN viral de la capside dans le cytoplasme (Ackermann et al., 2003).

L'analyse de la structure de plusieurs queues de phage a montré que la partie se fixant au connecteur forme, chez les *Siphoviridae* et les *Myoviridae*, un tube à symétrie hélicoïdale se terminant par une structure distale contenant les fibres responsables de l'attachement à la surface de bactéries ainsi que les protéines impliquées dans le transpercement des membranes bactériennes (Muller et al., 1994 ; Guénebaut et al., 1997).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Suivant le type de sous famille (*Siphoviridae*, *Myoviridae* ou *Podoviridae*), les mécanismes de transpercement des parois bactériennes et de transferts de l'ADN sont distincts.

Le phage T4 (*Myoviridae*) possède une queue contractile constituée d'approximativement 20 protéines différentes. Ce type de queue contractile fait penser à une seringue de par leur mode d'injection de l'ADN. La fixation de manière irréversible à la surface d'*E.Coli* des fibres courtes situées à l'extrémité de la queue induit une réaction en chaîne entraînant un changement de conformation du plateau de base (« baseplate », voir aussi figure 5) d'une forme hexagonale vers une forme en étoile (Kostyuchenko et al., 2003). La contraction de la gaine externe de la queue commence alors et entraîne le tube interne, rigide jusqu'à la surface bactérienne (Leiman et al., 2004). Ensuite, ce tube passe au travers des différentes couches composant la paroi des bactéries sous l'action d'un complexe protéique constituant « l'aiguille » de la seringue (Kanamaru et al., 2002).

Pour les queues courtes caractéristiques des *Podoviridae*, la formation du canal au travers des membranes bactériennes est initiée, chez le phage T7, par l'éjection de plusieurs protéines mineures contenues dans la capside (protéines gp14, gp15 et gp16 ; figure5) et possédant une activité enzymatique (Molineux, 2001).

Chez le phage T5 appartenant à la sous famille des *Siphoviridae*, la paroi bactérienne est traversée par la pointe de la queue (pb2) au voisinage du récepteur du phage, FhuA, créant ainsi le passage pour l'ADN viral (Böhm et al., 2001). Un scénario possible est qu'une fois les membranes transpercées par pb2, l'interaction de pb5 avec FhuA est stériquement possible déclanchant par la suite une réaction en chaîne provoquant l'ouverture du connecteur.

VIII. Infection d'une bactérie par un phage de la famille des *Caudovirales*

Dans un premier temps, les bactériophages s'accrochent de manière réversible à la surface des bactéries par l'intermédiaire des longues fibres de leur queue qui reconnaissent spécifiquement certains récepteurs membranaires. Ensuite, le virus se fixe de manière irréversible et par des mécanismes propres à chaque type de queue, impliquant de larges changements de conformation, la membrane bactérienne est percée et l'ADN directement transféré de la capside dans le cytoplasme. Une fois le passage ouvert au niveau du connecteur et de l'extrémité de la queue, le transfert de l'ADN est gouverné par la différence

de pression entre la capside et l'intérieur de la bactérie. Cependant, chez certains phages, le transfert de l'ADN se fait en plusieurs étapes et ne peut donc pas s'expliquer par la seule différence de pression. Chez le phage T5, 8 % de l'ADN est d'abord injecté dans le cytoplasme puis les protéines codées par ce fragment sont transcrites avant que le reste du génome (92 %) ne soit transféré (Ponchon et al., 2005). Le transfert de l'ADN du phage T7 se fait en 3 étapes successives avec l'aide dans un premier temps de l'ARN polymérase d'*E.Coli* avant que l'internalisation finale soit réalisée par l'ARN polymérase du phage (Molineux, 2001). Ce transfert en plusieurs fois laisse le temps au virus de synthétiser certaines protéines nécessaires pour se protéger des enzymes de restriction de l'hôte.

IX. Cycle d'assemblage de la capside d'un bactériophage

L'assemblage de beaucoup de virus consiste en une succession d'événements qui peuvent se décomposer en la formation d'une particule précurseur, non infectieuse qui par suite est convertie en une forme mature, infectieuse. Cette dernière transition est appelée maturation. L'étude des cycles d'assemblage de phages est fondamentale afin d'isoler les protéines ayant une fonction cruciale voir inhibitrice dans les assemblages viraux.

Le cycle menant à la production d'une capside mature contenant l'ADN varie d'un bactériophage à un autre. Plusieurs cycles d'assemblage de C*audovirales* ont été étudiés en détail parmi lesquelles ceux des bactériophages T4, T7, HK97, λ d'*E.Coli*, P22 de *Salmonella Typhimurium*, ϕ29 et SPP1 de *Bacillus Subtilis*. Ces études et d'autres ont montré que chaque bactériophage adopte ses propres stratégies pour la construction de sa capside. Néanmoins, d'un phage à un autre, des protéines ayant des fonctions similaires sont utilisées pour l'assemblage de la capside de phages qui au final ont des tailles et formes variées (Steven et al., 2005, figure 8).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

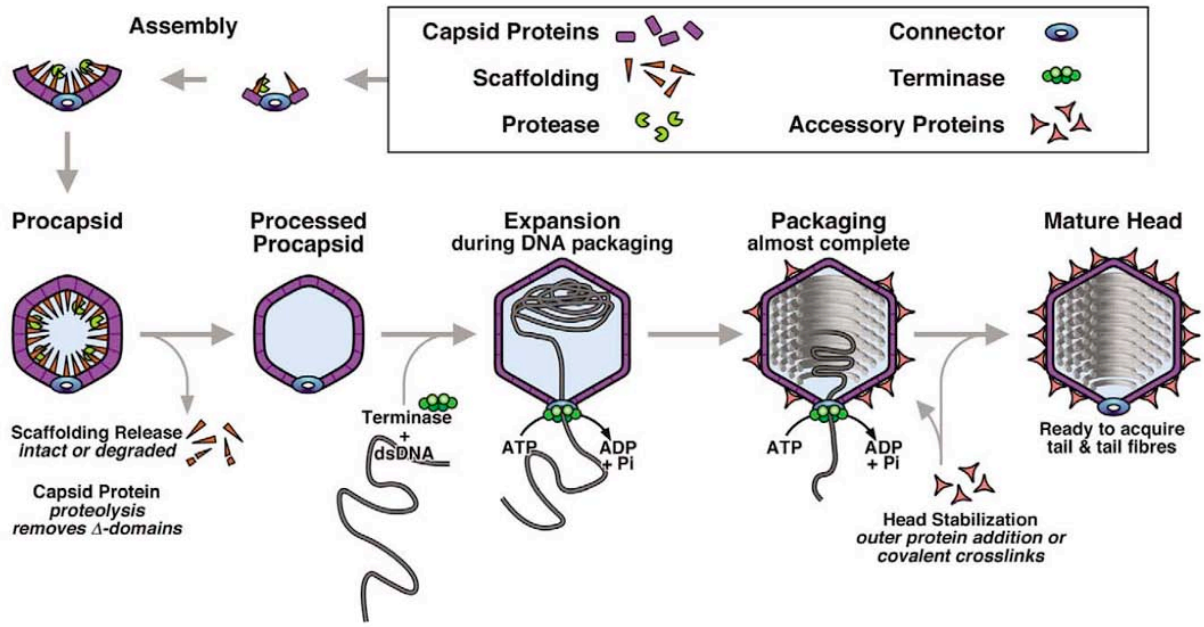


Figure 8 – Schéma général des différentes étapes dans l'assemblage des capsides des phages de la famille des Caudovirales ainsi que les différentes protéines invariablement impliquées : protéines de capside, protéine d'échafaudage, protéase, terminases, protéine (s) formant le connecteur, protéine de décoration (d'après Steven et al., 2005)

A. La formation d'un précurseur : la procapside

In vivo, le point de départ de la construction de la procapside est généralement admis comme étant chez beaucoup de phages la protéine portail. Cette protéine forme un dodécamère en forme d'anneau (Moore et al., 2001 ; Agirrezabala et al., 2005) qui par la suite deviendra le composant central du connecteur (Orlova et al., 2003). Ce dodécamère sert en quelque sorte de point de nucléation à la polymérisation de la (ou les) protéine (s) de capside majeure sous le contrôle de la protéine d'échafaudage (ou du domaine N-terminal de la protéine de capside majeure dans le cas où le phage ne posséderait pas de protéine d'échafaudage indépendante (Conway et al., 1995)). En l'absence de protéine d'échafaudage, les structures formées sont souvent aberrantes et non fonctionnelles (Hohn et al.,1975). Pour le phage P22, l'assemblage d'une procapside correcte se fait par ajout successif des protéines de capside, seule ou en complexe avec la protéine d'échafaudage suivant le type d'interactions locales possible (Thuman-Commike et al., 1999). La procapside des phages à queue est une capside virale non infectieuse, instable, de taille plus petite que la capside finale (Dokland et al., 1993 ; Conway et al., 1995 ; Zhang et al., 2000).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

B. Clivage protéolytique

D'une manière générale, une procapside de bactériophage est constituée par le connecteur à l'un de ces sommets, les multiples copies de la (les) protéine (s) de capside majeure et les protéines d'échafaudage. La totalité des protéines de capside majeure s'arrange suivant une symétrie icosaédrique contrairement au connecteur (Morais et al., 2001 ; Fokine et al., 2004) et aux protéines d'échafaudage (Morais et al., 2003 ; Thuman-Commike et al., 1999) qui sont autant de brisure de symétrie.

L'étape suivante dans le cycle d'assemblage des bactériophages à queue est l'élimination des protéines d'échafaudage ou des domaines ayant cette fonction soit par clivage par la protéase virale contenue dans la procapside (Duda et al., 1995 ; Miller et al., 2003) ou soit sous une forme intacte lorsqu'il n'y a pas de protéase virale (phage T7 (Cerritelli et al., 2003) et P22 (Fane et Prevelige, 2003) par exemple). Entières ou fragmentées, les protéines d'échafaudage sont évacuées par les pores de la procapside et il en résulte donc un volume interne plus grand, nécessaire à l'incorporation de la totalité de l'ADN viral.

C. L'expansion : transition procapside – capside

L'étape concomittante à l'élimination des protéines d'échafaudage est l'incorporation de l'ADN viral dans la capside. Cette entrée se fait par le connecteur formé dans les cas les plus simples par la protéine portail et les petite et grande sous unités d'enzymes virales appelées terminases. Ce processus a été beaucoup étudié et l'un des scénario est que le connecteur se comporte comme un moteur moléculaire qui, à chaque hydrolyse d'ATP, tourne d'un certain pas entraînant avec lui l'ADN à l'intérieur de la capside (Simpson et al., 2000). Une fois la totalité de l'ADN introduite, celle-ci est clivée par les terminases et l'ouverture du connecteur est bloquée par l'ajout de protéines de complément et de la queue du phage.

In vivo, l'entrée d'une molécule fortement chargée négativement comme l'ADN à l'intérieur de la procapside, déjà déstabilisé par le départ des protéines d'échafaudage, force progressivement les protéines de capside majeure à se réorganiser, tout en conservant l'intégrité de celle-ci, jusqu'à ce que s'établissent de nouvelles interactions entre sous unités comme cela a été montré in vitro avec le phage HK97 (Lata et al., 2000). D'une manière

générale, la capside obtenue à ce niveau est plus grande, de forme plus angulaire que la procapside et les protéines de capside la composant s'organisent toujours suivant les symétries icosaédriques, à l'exception toujours du connecteur et de l'ADN confiné. Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire l'arrangement de l'ADN au sein de la capside, mais une variété de reconstructions de capsides obtenues en cryo-microscopie électronique supporte le modèle en bobine co-axiale où l'ADN s'enroule autour d'un axe normal au connecteur (Cerritelli et al., 1997 ; Zhang et al., 2000)

D. La stabilisation

Pour s'accommoder de la présence de l'ADN emmagasiné sous pression dans sa capside (environ 6MPa pour une concentration maximale de 500 mg/mL (Smith et al., 2001)), la plupart des bactériophages ont recours à une dernière étape visant à augmenter la stabilité de l'ensemble capside/ADN. Deux stratégies différentes sont employées :

- L'addition en surface d'une ou plusieurs protéines de capside mineure (la protéine GpD pour le phage λ (Dokland et al., 1993 ; Yang et al., 2000), les protéines Hoc et surtout Soc pour le phage T4 (Iwasaki et al., 2000 ; Olson et al., 2001)) qui augmentent la résistance globale de la capside.
- L'établissement de nouvelles liaisons covalentes, par un mécanisme auto catalytique, entre toutes les sous unités de la protéine de capside majeure créant un enchevêtrement des sous unités les unes avec les autres à la manière des anneaux d'une chaîne (phage HK97 (Duda, 1998) et D3 (Gilakjan et al., 1999))

X. Similarités entre les virus procaryotes et eucaryotes

Il existe une énorme diversité de virus infectant tout type de cellules. Chaque genre de virus possède ses propres caractéristiques et stratégies d'infection. Néanmoins, au fur et à mesure que s'accumulent de nouvelles informations sur les virus notamment en raison du nombre croissant de génomes séquencés, il devient possible de déduire certains mécanismes de l'évolution virale. Cependant, la situation est encore compliquée par le fait que les

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

séquences primaires de protéines virales de différents organismes, qui semblent similaires d'un point de vue structural et fonctionnel, sont souvent très divergentes à tel point qu'aucune similarité de séquence n'est détectable (Hendrix, 2004). Il y a tout de même des évidences suggérant que des virus actuels très différents descendent d'un ancêtre commun

Ainsi, les phages à queue infectant les bactéries partagent avec la famille des virus de l'herpès certaines similarités morphologiques et certains mécanismes d'assemblage. En particulier, lors de l'assemblage des virions dans la cellule, les virus de l'herpès et les bactériophages s'assemblent tout d'abord sous la forme d'une procapside qui devient par la suite la capside mature. Dans les deux cas, la formation de la procapside est guidée par la présence de protéines d'échafaudage et la transition procapside/capside est irréversible et implique une forte réorganisation des sous unités au sein de la capside lorsque l'ADN viral est incorporé par le connecteur (Newcomb et al., 2001 ; Heymann et al., 2003).

Un autre exemple illustrant de possibles connexions ancestrales entre virus procaryotes et eucaryotes est donné par la similarité du repliement dans l'espace de la protéine de capside composant les hexons de l'adénovirus humain (Athappilly et al., 1994), du bactériophage PRD1 (Benson et al.,1999) et du virus d'algue PBCV-1 (Nandhagopal et al., 2002). Pour ces trois virus, les hexons composant leur capside sont des trimères dont chaque sous unité est constituée par deux domaines similaires en tonneaux β (motif « jelly roll ») (Nandhagopal et al., 2002). La même organisation des hexons a aussi été trouvée récemment pour le virus STIV infectant une archébactérie (Rice et al, 2004). Ainsi, cet exemple montre qu'il existe des relations de conformation entre les protéines de capside de quatre virus infectant les trois grands genres du vivant en dépit de toutes similarités de séquence. Ceci suggère que certains virus ont un ancêtre commun précédant la division entre les genres eucaryote, procaryote et archéobactérie il y a environ 3 milliards d'années et renforce l'intérêt des études sur les bactériophages en tant que système modèle de virus eucaryotes.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

La microscopie électronique en transmission appliquée à l'observation d'échantillons biologiques – Introduction

I. Quelques rappels historiques

La microscopie électronique en transmission dédiée à la caractérisation d'objets biologiques est aujourd'hui une méthode bien établie et couramment employée qui a nécessité plus d'un siècle de développement. Dès 1878, Ernst Abbe réalise que les microscopes optiques ont atteint leur limite fondamentale, et qu'il était nécessaire de trouver de nouveaux outils pour pouvoir accéder à l'infiniment petit. La microscopie électronique en transmission prend ses sources dès 1899 par l'observation par Wiechert que des rayons cathodiques (électrons) peuvent être concentrés en un point par l'application d'un champ magnétique produit par un solénoïde fixé sur un tube. Les premiers éléments nécessaires à la fabrication de lentilles électromagnétiques sont ainsi posés et en 1926, Hans Bush montrent de manière théorique qu'un court solénoïde focalise un faisceau d'électrons de la même manière qu' « un verre brûlant fait converger les rayons du soleil ». En 1928, Ruska et Knoll mettent en place un banc optique pour électrons, sous vide, consistant en une petite ouverture illuminée par un faisceau d'électrons plus un écran fluorescent pour observer l'image. Un petit solénoïde était utilisé pour former l'image de l'ouverture. En 1931, ils réussirent à grandir l'image formée par le premier solénoïde au moyen d'un second placé entre l'image intermédiaire et l'écran. Le grandissement était de 17x. En 1933, Ruska obtint pour la première fois une résolution supérieure au meilleur des microscopes optiques bien que peu de matériaux pouvaient résister à l'énergie produite par l'impact du faisceau. Knoll, parti travailler au développement de la télévision, publia en 1935 les premières images obtenues à partir du balayage d'un échantillon solide par un faisceau d'électrons. Cependant, le véritable premier microscope électronique à balayage fut mis en place par Von Ardenne en 1938.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Quelques dates importantes dans l'histoire de la microscopie électronique

1897 Découverte de l'électron par *J.J. Thompson*

1924 *P. De Broglie:* dualité onde-particule

1927 *Hans Busch*: un faisceau d'électron peut être focalisé dans un champ magnétique inhomogène

1931 *Max Knoll* et *Ernst Ruska* construisent le premier microscope électronique à transmission

1938 Microscope Electronique à transmission par balayage (STEM) (*M. Von Ardenne*)

1939 Première commercialisation d'un TEM par Siemens (*Ruska*, *Von Borries*)

~1940 Travaux théoriques fondateurs en optique électronique et sur les lentilles électromagnétiques (*W. Glaser*, *O. Scherzer*)

1943 Spectroscopie par perte d'énergie des électrons (EELS) (*J. Hillier*)

1944 *Williams* et *Wyckoff* introduisent l'ombrage métallique.

1945 *Porter*, *Claude* et *Fullam* utilisent un microscope électronique pour examiner des cellules après coloration avec OsO4.

1959 *Singer* utilise des anticorps pour détecter des molécules cellulaires avec un microscope électronique.

1959 *Brenner* et *Horne* développent la coloration négative, inventée par *Hall* quatre plus tôt, et l'appliquent à la visualisation des virus, bactéries et protéines filamentaires.

1964 Première commercialisation d'un microscope électronique à balayage par Cambridge Instruments

~1970 *Crowther*, *de Rosier* et *Klug* décrivent des techniques pour la reconstruction tridimensionnelle d'objets biologiques à partir de micrographies prises en microscopie électronique.

~1970 Microscope électronique en transmission à haute résolution (HRTEM) avec une résolution inférieure à 4 Å

1975 *Henderson* et *Unwin* déterminent la première structure d'une protéine membranaire par reconstruction d'images prises sur des échantillons non colorés à température ambiante.

~1980 Début de la cryo-microscopie électronique (*Dubochet*)

1986 Prix nobel à *E.Ruska* (conjointement avec *G. Binning* et *H. Rohrer* qui ont développé la microscopie à effet tunnel)

1994 Détermination de la première structure atomique d'une protéine membranaire par cristallographie des électrons sur des cristaux bidimensionnels (*Kuhlbrandt*)

Au cours des décennies suivantes, la résolution des microscopes électroniques s'est progressivement améliorée grâce aux interactions multiples entre les besoins des utilisateurs et les progrès scientifiques et technologiques dans de nombreux domaines tels l'optique électronique, les détecteurs, l'informatique et l'électronique, le vide, la micromécanique,

l'usinage de précision. En biologie, l'intérêt de pouvoir visualiser « in vivo » des complexes macromoléculaires à haute résolution a poussé les microscopistes à développer des techniques adaptées à l'étude des objets biologiques, intrinsèquement peu résistants aux électrons. Ainsi, l'ombrage (Williams & Wyckoff en 1944) puis la coloration négative (Hall en 1955) sont mis au point avant que le développement de la cryo-microscopie électronique permette de visualiser des objets biologiques à basse température, dans un état hydraté, se rapprochant ainsi des conditions physiologiques (Lepault et al., 1983 ; Adrian et al. 1984 ; Dubochet et al., 1988).

II. La microscopie électronique en transmission

La possibilité de réaliser un microscope avec des électrons résulte de plusieurs propriétés comme la nature ondulatoire des électrons, l'existence de lentilles adaptées à ce type de rayonnement (lentille électromagnétique) et de sources d'électrons (canon).

Les microscopes en transmission, quels que soient leurs domaines d'application, sont construits de la même façon. D'une manière très schématique, de haut en bas, on retrouve le canon à électrons, la colonne sous vide contenant tout le système optique permettant le grossissement de l'image de l'échantillon, puis les dispositifs pour visualiser et enregistrer les images agrandies (écran fluorescent, caméra, plan film, détecteur CCD).

A. Le canon à électrons

Le canon à électrons doit produire un faisceau d'électrons parallèle, ayant une énergie haute et la plus constante possible. On distingue deux types de canons à électrons :

- Émission thermoélectrique (figure 1a): les électrons sont émis à partir d'un filament (cathode) chauffé à une température suffisante (2500°C pour du tungstène, 1700°C pour un monocristal d'hexaborure de lanthane (LaB_6)) pour extraire les électrons du métal. Le wehnelt entourant le filament est chargé négativement, il permet de concentrer les électrons en un point situé entre la pointe du filament et l'ouverture du wehnelt. Les électrons passant par l'ouverture du wehnelt sont ensuite guidés vers l'entrée de la colonne au travers de l'anode (plaque métallique trouée, chargée positivement).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

- Émission de champ (figure 1b): les électrons sont émis à la pointe d'un filament de tungstène recouvert d'oxyde de zirconium. En appliquant une tension d'environ 3 kV entre la pointe et l'anode, on obtient dans cette région un champ électrique extrêmement intense (10^9 V/m) suffisant pour extraire les électrons de la pointe qui sont ensuite accélérés et dirigés vers la colonne au travers de l'anode.

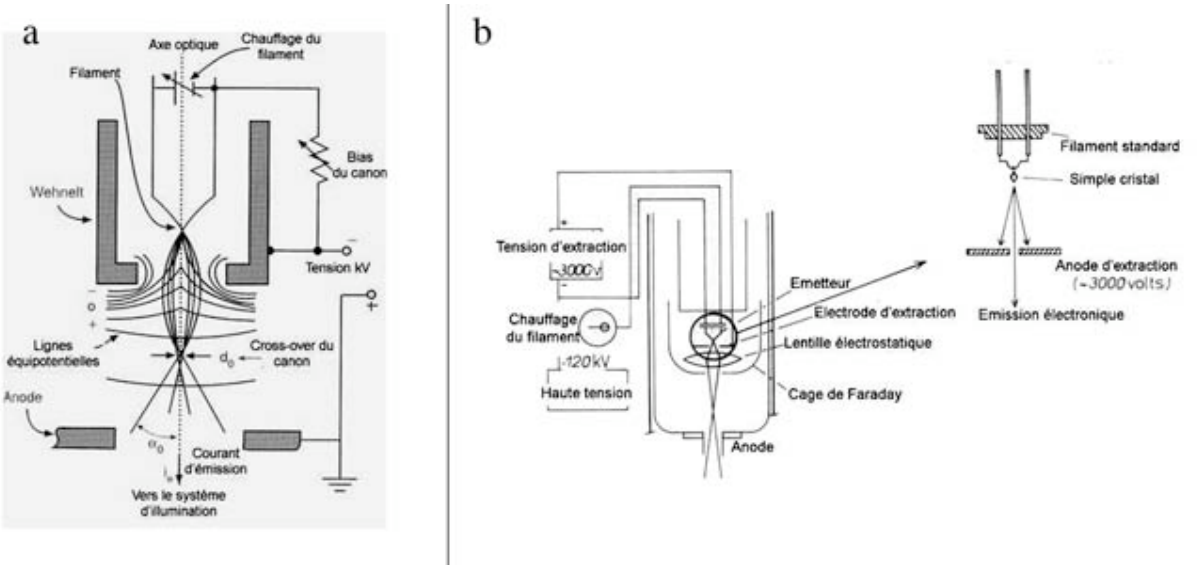


Figure 1 – Schéma d'un canon à électron type thermoélectrique (a) et type émission de champ (b)

Filament	Tungstène	LaB_6	FEG
Travail de sortie (eV)	4.5	2.4	4.5
Température (°C)	2500	1700	1500
Taille de la source (nm)	30000	5000	3-20
Courrant maximum (nA)	1000	500	300
Brillance (A/m^2)	10^9	5.10^{10}	10^{13}

Quelques caractéristiques pour 3 types de filament utilisés dans les MET – La taille de la source d'émission des électrons ainsi que la brillance du rayonnement obtenu sont deux des caractéristiques importantes expliquant les meilleures performances des canons à émission de champs dans la transmission du signal à haute résolution.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

B. Les lentilles électromagnétiques et les défauts limitant la résolution

Les lentilles électromagnétiques sont constituées d'un bobinage en cuivre et de pièces polaires en alliage magnétique. Lorsqu'un courant circule dans le bobinage, un champ magnétique est créé entre les pièces polaires et agit directement sur la trajectoire des électrons. En dépit des différences évidentes avec les lentilles en verre, les lentilles électromagnétiques obéissent aux lois de l'optique géométrique photonique. Ainsi, elles possèdent un plan image où se forme l'image de l'objet et un plan focal où tous les rayons parallèles incidents se focalisent. En modifiant le courant circulant dans la lentille, celle-ci devient plus ou moins focalisante.

Comme pour leurs homologues utilisées en optique photonique, les lentilles électromagnétiques présentent des défauts ou aberrations qui altèrent la résolution des images. On distingue différents types de défauts :

- L'aberration de sphéricité provient d'une différence de convergence entre les faisceaux proches et éloignés de l'axe optique de la lentille. Malgré une forme optimale, les bords de la lentille sont trop convergents et le faisceau focalisé ne sera pas un point mais un disque. Ce type de défaut est caractérisé par un coefficient d'aberration de sphéricité (Cs) qui varie suivant le type de microscope électronique.
- L'astigmatisme se traduit par des distances focales différentes suivant les directions surtout lorsque les faisceaux incidents s'éloignent de l'axe optique. Ce défaut est corrigé à l'aide de stigmateurs.
- L'aberration chromatique est due au fait que le faisceau d'électrons incident n'est pas strictement monocinétique (vitesse initiale légèrement différente, fluctuation de la tension d'accélération, perte d'énergie par interaction avec la matière). Elle n'est donc pas directement causée par les lentilles. Mais, si les électrons ont des énergies différentes ; ils se comporteront de manière distincte pendant la traversée d'une lentille électromagnétique, on aura donc des différences de focalisation entre les électrons. (L'utilisation de canon à émission de champ (FEG) diminue ce défaut).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

C. La colonne du microscope

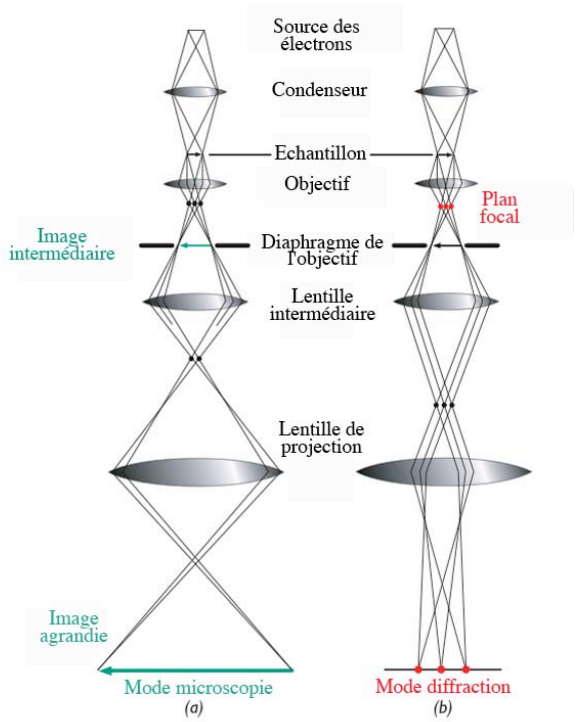


Figure 2 – Schéma du cheminement des électrons dans la colonne du microscope (d'après Philips Research Materials Analysis)

Venant du canon, les électrons pénètrent par le haut de la colonne où règne aussi un vide très poussé pour éviter au maximum que les électrons interagissent avec des impuretés. Dans un premier temps, les électrons sont guidés vers l'échantillon par un système appelé condenseur. Il est composé de plusieurs lentilles électromagnétiques qui modifient la convergence et la taille du faisceau (spot) qui frappe l'échantillon. Le diaphragme du condenseur, après les lentilles, permet de régler l'intensité de l'illumination. Une fois que les électrons ont traversé l'échantillon, la lentille objectif forme une image initiale inversée. Dans son plan focal, il se forme un motif de diffraction qui peut être visualisé suivant le mode dans lequel on travaille. Le diaphragme de l'objectif, placé dans le plan focal permet de sélectionner les électrons qui contribuent à la formation de l'image et augmente le contraste de celle-ci. Ensuite, l'image formée par l'objectif est agrandie par une ou plusieurs lentilles (lentille(s) intermédiaire(s) et de projection). Finalement, l'image en sortie de colonne est visualisée par l'utilisateur sur un écran fluorescent et/ou sur un téléviseur relié à une caméra et/ou sur un plan film (photo).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

III. Principes de la formation d'une image agrandie par microscopie électronique en transmission

A. Interactions électrons/matière

Les interactions entre les électrons et la matière sont significatives et multiples (figure 3) étant leurs faibles longueurs d'onde (λ= 0.02509 Å pour une tension d'accélération de 200 kV) et donnent accès à de nombreuses informations sur l'échantillon (voir table différents types de microscopie).

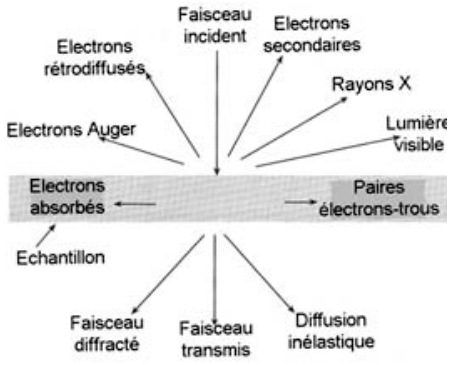


Figure 3 – Schéma des différents rayonnements émis par l'interaction d'un faisceau incident d'électrons avec un échantillon

Microscopie à balayage (échantillon massif)			***Microscopie en transmission (échantillon mince)***		
Mode	**Rayonnement utilisé**	**Application**	**Mode**	**Rayonnement utilisé**	**Application**
S.E.I	Électrons secondaires	Topographie	H.R.E.M.	Électrons transmis	Imagerie haute résolution
B.E.I.	Électrons rétrodiffusés	Imagerie en fonction du numéro atomique	E.D.S.	Rayons X	Analyse chimique
E.D.S.	Rayons X	Analyse chimique	E.E.L.S.	Diffusion inélastique	Analyse physico-chimique
A.E.S.	Électrons Auger	Analyse chimique de surface	A.E.M.	Rayon X ou diffusion inélastique	Imagerie par les techniques EDS ou EELS
S.T.E.M. Imagerie d'échantillons minces par une méthode de balayage (SEI, BEI, EDS, EELS)					

Exemple de différents modes utilisés dans les 2 types d'imagerie électronique (balayage et transmission)

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

En microscopie électronique en transmission, les faisceaux transmis et diffusés élastiquement et inélastiquement sont à l'origine de la formation de l'image. Tous les autres rayonnements ne sont pas utilisés en MET appliquée à la reconstruction 3D d'objets biologiques. Les électrons diffusés de manière inélastique (avec transfert d'énergie) sont éliminables si le microscope est équipé d'un filtre en énergie.

De manière à travailler en transmission, l'épaisseur de l'échantillon doit rester faible (0.2 – 0.4 μm) et la tension d'accélération doit être élevée afin d'augmenter la distance moyenne du trajet d'un électron au travers de l'échantillon avant qu'il ne soit diffusé.

B. Fonction d'onde associée au trajet du faisceau d'électron dans la colonne du microscope (d'après Frank, 1996)

1. Interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon

En microscopie électronique en transmission, la formation d'une image à haute résolution provient essentiellement du signal transmis par la diffusion élastique des électrons au travers de l'échantillon. Dans ce cas, les électrons ne subissent aucune perte d'énergie, ils sont simplement déviés de leur trajectoire incidente en fonction de l'environnement électrostatique local qu'ils ont rencontré, lui-même étant décrit par la distribution tridimensionnelle du potentiel de Coulomb dans l'échantillon. Les électrons diffusés inélastiquement (avec perte d'énergie) contribuent aussi au signal transmis, mais leur contribution n'est pas prise en compte hormis à basse résolution. La diffusion élastique des électrons au travers de l'échantillon s'exprime par un changement de phase $\phi(r)$ de la fonction d'onde des électrons incidents $\Psi(r)$ voyageant dans la direction z (normale au plan de l'échantillon) :

(1) $\Psi' = \Psi \exp[i\phi(r)]\cdot$ où r est un vecteur bidimensionnel fonction de (x,y)

En considérant les électrons comme des objets de phase faible ($\phi(r) << 1$), le développement limité de Ψ' donne:

(2) $\Psi' = \Psi [1 + i\phi(r) - 1/2\phi(r)^2 + \ldots]$

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

La fonction d'onde transmise est donc dominée par l'interférence entre les ondes non modifiées (1er terme) et diffusées (2nd terme). On parle alors d'imagerie par microscopie électronique à champ brillant. Si les ondes non modifiées sont bloquées au niveau du plan focal de l'objectif, le mode est alors dit à champ sombre.

2. Fonction d'onde associée au passage des électrons à travers l'objectif

L'approximation de Frauenhofer de la théorie de la diffraction décrit la fonction d'onde des électrons dans le plan focal de la lentille objectif ($\Psi_{ob}(k)$) comme la transformée de Fourier de la fonction d'onde (Ψ'). Cependant, en pratique, les défauts associés aux lentilles et la sous focalisation introduisent des décalages dans la phase de l'onde diffusée ($\gamma(k)$) qui sont utiles pour générer du contraste dans l'image agrandie et dont il faut tenir compte (contraste de phase).

(3) $\Psi_{ob}(k) = F\{\Psi'\} \exp [i(\gamma(k)]$ avec

k : fréquence spatiale

F{} : transformée de Fourier

et

$$\gamma(k) = \frac{2\pi}{\lambda}\left(\frac{C_s k^4 \lambda^4}{4} - \frac{\delta_z k^2 \lambda^2}{2} - \frac{C_a \lambda^2}{2}(k_x^2 - k_y^2)\right)$$

avec
C_s : coefficient d'aberration sphérique
λ : longueur d'onde
δz : sous focalisation
C_a : coefficient d'astigmatisme axial
k_x, k_y : décrivent le degré d'astigmatisme

3. Fonction d'onde dans le plan image

Finalement, la fonction d'onde dans le plan image $\Psi_i(r)$ est obtenue par la transformée de Fourier inverse de la fonction d'onde dans le plan focal de l'objectif

(4) $\Psi_i(r) = F^{-1}\{\Psi_{ob}(k)\}$ avec F^{-1} : transformée de Fourier inverse

Enfin, l'intensité dans le plan image s'exprime sous la forme

(5) $I(r) = \Psi_i(r)\, \Psi_i{}^*(r)$

C. La théorie du transfert de contraste

1. La fonction de transfert de contraste (CTF)

En tenant compte des différentes approximations faites, les équations ci-dessus montrent que la relation entre le contraste de l'image I(r) et le potentiel de l'objet projeté $\phi(r)$ est linéaire et est fonction des paramètres liés à l'optique électronique employée (lentilles, diaphragmes). L'équation (5) mène à une relation linéaire entre la transformée de Fourier de $\phi(r)$ (O(k)) et celle de I(r) (F(k)) :

(6)- $F(k) = O(k)C(k)$ avec $C(k) = 2\sin\gamma(k)$

La fonction C(k) est appelée fonction de transfert de contraste (CTF) et entraîne une alternance du signal transmis, et donc du contraste de l'image, entre zones positives et négatives lorsque les fréquences spatiales augmentent. Au niveau des inversions de phase (appelées aussi « zéros »), aucune information n'est transmise. À haute résolution, les oscillations deviennent de plus en plus rapides rendant l'exploitation de cette information plus difficile.

La CTF décrite ci-dessus ne tient compte que des effets de phase (contraste de phase) auxquels il faut ajouter les effets d'amplitude (contraste d'amplitude) causés par la perte d'électrons lors de la traversée de l'échantillon (diffusion inélastique) et par les électrons diffusés aux grands angles bloqués par le diaphragme de l'objectif. En conséquence, les images prises en microscopie électronique ont un fort contraste à basse résolution, dû au signal inélastique. La composante de la CTF due à la diffusion élastique peut donc être écrite (figure 4)

(7) $C(k) = 2\,(A * \sin\gamma(k) - (1 - A) * \cos\gamma(k))$

avec A représentant la proportion du signal résultant du contraste de phase

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

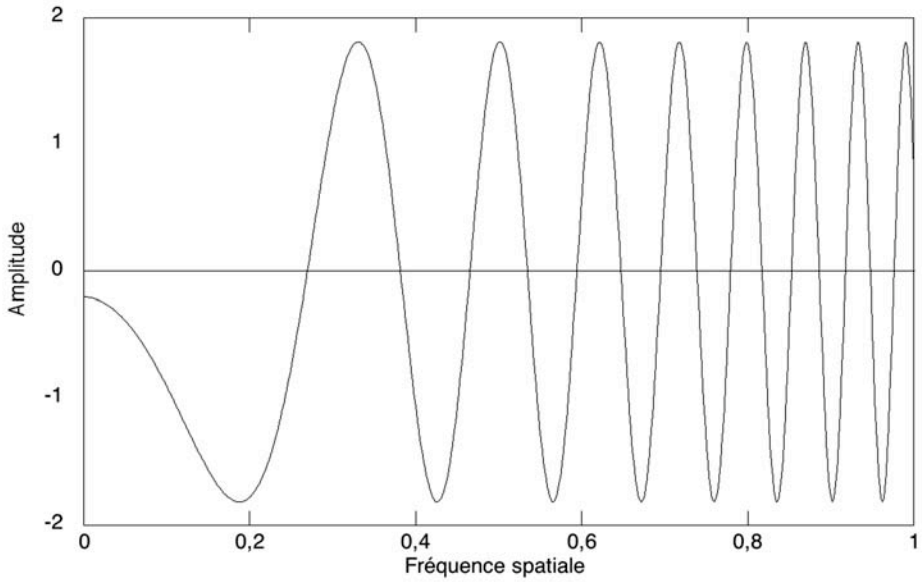


Figure 4 – Représentation de la fonction de transfert de contraste non amortie d'après l'équation (7) avec :

(1 – A) = 10 % ; Cs = 2mm ; δz = -3 μm ; λ = 0.025 Å

2. La fonction enveloppe

L'équation (6) est déduite en considérant une source d'électrons « parfaite », monochromatique et ponctuelle. Dans ce cas, l'information est transmise à très haute résolution sans perte de signal. Cependant, en pratique, la taille de la source des électrons et l'étalement en énergie du faisceau limite aussi la résolution des images.
Théoriquement, un moyen de modéliser cette décroissance du signal est d'introduire dans l'équation (6) la fonction enveloppe E(k).

(8) $F(k) = O(k)C(k)E(k)$ avec $E(k) = E_i(k)E_e(k)$

$E_i(k)$ est la fonction enveloppe due aux défauts de parallélisme du faisceau et $E_e(k)$ est due à l'étalement en énergie du faisceau. L'origine de la décroissance du signal à haute résolution étant avant tout instrumentale, il est impossible de s'en affranchir totalement. Néanmoins, l'utilisation de canon à émission de champ réduit cet effet étant donné qu'à la fois l'illumination et l'étalement en énergie sont plus petits.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

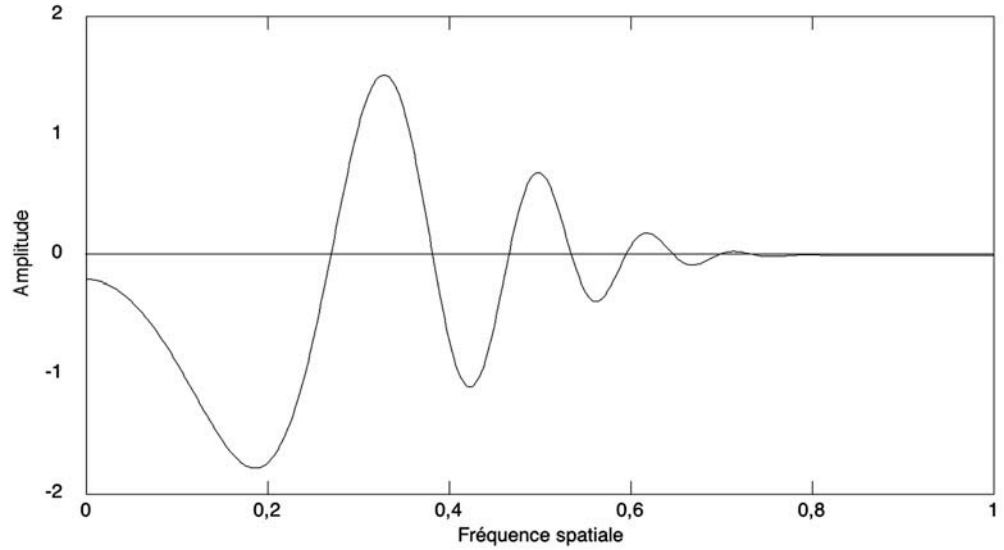


Figure 5 – Représentation de la fonction de transfert de contraste amortie aux hautes fréquences spatiales d'après l'équation (8) avec :
(1 – A) = 10 % (contraste d'amplitude) ; Cs = 2mm ; δz = -3 μm ; λ = 0.025 Å ; taille de source = 50000 Å ; étalement en sous focalisation = 100 Å

3. Correction de la fonction de transfert de contraste

Quelle que soit la qualité du microscope électronique utilisé, on ne peut pas totalement s'affranchir des effets de la CTF qui empêche un transfert fidèle des informations en phase et en amplitude de l'objet imagé. Néanmoins, des méthodes informatiques ont été développées pour corriger la CTF lors de l'analyse des données. Toutes ces méthodes reposent sur la connaissance précise des paramètres définissant la CTF telles la longueur d'onde (λ), la sous focalisation de l'objectif (Δz), la différence focale due à l'astigmatisme axial (Δza), la constante d'aberration sphérique (Cs) et la décroissance du signal aux hautes fréquences spatiales.

La correction la plus couramment appliquée consiste à corriger les images des effets de la CTF en appliquant un filtre Wiener qui est une division (à une constante près) de la transformée de Fourier de l'image par sa CTF. Les phases ne seront plus alternativement positives et négatives mais soit toutes positives ou toutes négatives. Les régions entourant les zéros de la CTF (aucune amplitude transmise) sont légèrement rehaussées tout en évitant une amplification trop forte du bruit.

Cependant, au voisinage de ces zéros, l'information reste très incomplète malgré la correction. Ce problème est partiellement résolu en utilisant deux (ou plus) images de la même zone mais

ayant des sous focalisations différentes (paire focale). Comme les zéros de ces images sont différents, elles se complètent de manière à obtenir une information en amplitude plus uniforme sur une plus grande gamme de résolution. Néanmoins, malgré la combinaison de paire focale, et si une étude à moyenne – haute résolution est envisagée (< 15 Å), il est aussi nécessaire de sur amplifier le signal pour compenser l'atténuation de celui-ci aux hautes fréquences spatiales. Ceci entraîne inévitablement aussi une amplification du bruit contenu aux hautes fréquences qui peut cependant être compensé en utilisant plus de particules lors de la reconstruction (Conway et Steven, 1999).

IV. La microscopie électronique en transmission appliquée à l'observation d'objets biologiques

A. La coloration négative

La coloration négative consiste à observer un échantillon biologique préalablement enrobé par un sel métallique. Les sels utilisés sont à base de métaux lourds possédant un numéro atomique élevé par comparaison avec les atomes composant les protéines (N, C, O, H). Ces métaux lourds interagissent donc fortement avec les électrons et en conséquence, le contraste des images prises en coloration négative est important entre les zones où le colorant est présent et celles où il est exclu par l'échantillon. Ainsi, en coloration négative, l'objet biologique est observé par l'intermédiaire du colorant.

La coloration négative est plus facile à mettre en œuvre que la cryo-microscopie électronique ; elle est très utile pour observer un nouvel échantillon et pour juger de sa concentration, de son homogénéité et de sa pureté. Par contre, l'ajout de colorant provoque quelques artefacts limitant les applications de la coloration négative. Ainsi, lors du séchage de l'échantillon préalable à l'observation sous le microscope, il se produit une inévitable déshydratation déformant les particules biologiques. De plus, l'information recueillie en coloration négative est essentiellement de surface ce qui limite son utilisation pour obtenir des reconstructions tridimensionnelles de complexes protéiques à haute résolution. Néanmoins, sa facilité de mise en œuvre et le fort contraste des images font de la coloration négative une méthode très utile pour obtenir un premier modèle tridimensionnel à basse résolution. Ceci fait de la coloration négative un outil complémentaire à la cryo-microscopie électronique qui

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

reste la technique la mieux adaptée à l'étude à moyenne ou haute résolution de molécules isolées.

B. La cryo-microscopie électronique

Cette méthode consiste à déposer l'échantillon seul en solution dans son tampon sur une grille à trou en cuivre recouverte d'une fine couche de carbone trouée puis, à éliminer l'excès de solution avec un papier filtre afin que ne subsiste par capillarité qu'une fine couche de solution dans les trous. Enfin la grille est congelée dans l'éthane liquide. Le but est d'obtenir au final une très fine couche hydratée congelée de l'échantillon. La congélation quasi instantanée de l'échantillon dans l'éthane liquide provoque la formation de glace vitreuse ne possédant pas de structure ordonnée (contrairement à la glace cristalline). L'échantillon est donc figé dans un état proche de ses conditions physiologiques et est très peu déformé si la température ne passe pas au-dessus de -160°C (transition glace amorphe/glace cristalline).

La dose totale d'électrons reçue par l'échantillon lors de l'exposition à fort grossissement doit être contrôlée de manière à ne pas endommager les particules en suspension. Typiquement, lorsqu'on prend deux images d'une même zone (une paire focale), la dose reçue ne doit pas dépasser 30-40 électrons/$Å^2$. Aussi, l'épaisseur de la zone photographiée doit rester de l'ordre de 100 nm pour que le signal transmis soit suffisamment important. Par ailleurs, pour générer un bon contraste, la prise d'image doit se faire à une sous focalisation plus importante qu'en coloration négative. Ceci se fait au détriment de la résolution des images et un bon compromis entre le contraste et la résolution doit être trouvé. Par exemple, sur le microscope électronique FEI/Philips CM200, sous une tension d'accélération de 200kV, une gamme de sous focalisation allant de -1.3 à -2.5 μm correspond un signal transmis jusqu'à respectivement 18 et 25 Å au 1^{er} zéro de la fonction de transfert de contraste.

La cryo-microscopie électronique est la méthode de choix si on envisage de faire une reconstruction tridimensionnelle de la particule observée à haute résolution (ie 8 – 15 Å) puisque à la fois des informations sur la structure interne et externe sont accessibles tout en maintenant la structure native de l'objet observé.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

C. Principe général de la reconstruction tridimensionnelle de molécules isolées à partir d'images prise en microscopie électronique en transmission

En prenant des images d'un échantillon pur, homogène et concentré, on obtient sur les micrographies de nombreuses et distinctes projections bidimensionnelles (2D) d'objets ayant la même structure (3D). Or, une micrographie prise en microscopie électronique en transmission représente une projection de la densité diffusée sur toute l'épaisseur du spécimen dans un plan normal à la direction du faisceau d'électrons. Donc, la structure tridimensionnelle d'un objet peut être obtenue à partir de la combinaison de l'information contenue dans une ou plusieurs projections 2D du spécimen (Crowther, 1971).

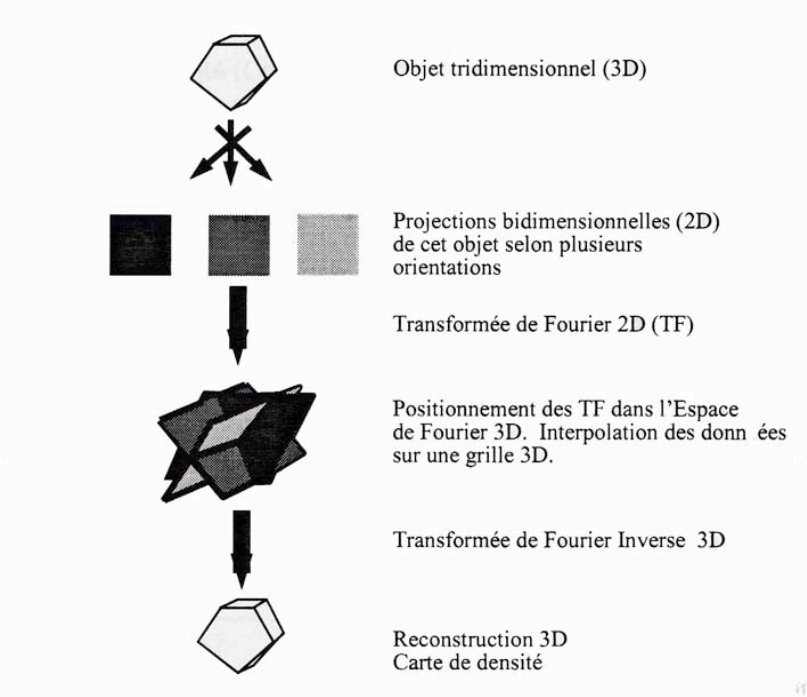


Figure 6 – Schéma représentant la méthode générale utilisée pour la reconstruction 3D d'un objet à partir d'images prises en microscopie électronique en transmission

La méthode de reconstruction dépend du fait que la transformée de Fourier d'une projection 2D d'un objet 3D est identique à la section centrale correspondante de la transformée 3D de l'objet. La transformée 3D de l'objet peut donc être reconstituée en plaçant correctement les transformées 2D de différentes vues de l'objet, et en utilisant les éventuelles symétries de l'objet et certaines procédures d'interpolation. À la condition que l'espace de Fourier soit suffisamment bien échantillonné (pour une résolution donnée), la structure 3D de

l'objet est calculée, dans l'espace réel, par transformée de Fourier inverse (Crowther et al., 1970)

V. La cryo-microscopie électronique en biologie structurale

Avec le développement de méthodes biophysiques puissantes telle la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire, les biologistes ont des outils supplémentaires à disposition pour mieux disséquer les relations structure/fonction de molécules d'intérêts. De nos jours, un nombre grandissant de structures à haute résolution est disponible. En 2002, la banque de données sur les protéines (PDB) contenait plus de 16000 structures parmi lesquelles seulement 93 avaient une masse moléculaire supérieure à 250 kDa (Chiu et al., 2002). Or, il apparaît de plus en plus fondamental de pouvoir déterminer la structure de complexes moléculaires d'une complexité croissante afin d'acquérir une compréhension détaillée de processus globaux. La cristallographie aux rayons X reste la méthode de choix pour obtenir le repliement dans l'espace de larges complexes macromoléculaires, mais cette approche est souvent limitée par l'obtention de cristaux convenables. La cryo-microscopie électronique est une alternative lorsqu'on s'intéresse à des molécules d'une masse supérieure à 250 kDa (Unger, 2001). Elle permet d'obtenir des informations sur des molécules isolées sur une large gamme de résolution. Le développement méthodologique et instrumental de la cryo-microscopie électronique a permis ces dernières années d'obtenir un nombre croissant de structures de larges macromolécules à des résolutions intermédiaires (6-9 Å) (Zhou & Chiu, 2003 ; Ludtke et al., 2005). À de telle résolution, il devient possible de déterminer certaines structures secondaires telles les hélices α (Conway et al, 1997 ; Bottcher et al., 1997). D'autre part, la structure d'un large complexe macromoléculaire peut être détaillée en déterminant la structure atomique par RMN ou cristallographie des éléments constitutifs du complexe. Ensuite, l'interaction entre ces éléments peut être modélisée en les plaçant correctement dans la densité électronique du complexe totale déterminée par microscopie électronique (Conway et al., 2001). Par ailleurs, la microscopie électronique peut être appliquée à la compréhension détaillée de processus dynamiques. Ainsi, pour un système biologique dont le développement dans le temps est connu et maîtrisé, différents états d'un même système peuvent être isolés en congelant dans l'éthane liquide à différents temps (Heymann et al., 2003, 2004).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Caractérisation de la structure de la capside de Gifsy-2 à différentes étapes de son assemblage par microscopie électronique en transmission

I. Le bactériophage Gifsy-2

A. Introduction

Le bactériophage Gifsy-2 est un phage tempéré infectant les bactéries du genre Salmonella. Ces bactéries sont très répandues, plus de 2 000 genres différents sont recensés et d'un point de vue épidémiologique, elles sont classées en fonction de leur adaptation à l'hôte humain ou animal :

- Le groupe 1, par exemple *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi*, provoque des fièvres entériques uniquement chez les primates supérieurs.
- Le groupe 2 donne des maladies chez certains animaux, *Salmonella dublin* chez les bovidés, *Salmonella cholerae-suis* chez le porc, mais rarement chez l'homme. Toutefois lorsque l'affection touche l'être humain, elle prend souvent un caractère invasif et peut mettre la vie du sujet en danger.
- Le groupe 3 comprend les souches restantes. Celles-ci provoquent classiquement des gastro-entérites, souvent bénignes et guérissant spontanément, mais pouvant devenir graves chez les enfants, les personnes âgées et les patients fragiles. On trouve dans ce groupe *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*, les deux principales souches de salmonellose transmise de l'animal à l'homme.

Le prophage Gifsy-2 (**GIF**-**S**ur-**Y**vette) a été mis en évidence la première fois dans le génome de *Salmonella Enterica* sérotype *Typhimurium* (*Salmonella Typhimurium)* souche LT2 en même temps que son homonyme Gifsy-1 (Figueroa-Bossi et al., 1997). Malgré leur capacité d'excision et de recombinaison mises en évidence, ces deux prophages ne rentrent pas en phase de réplication et ne sont donc pas fonctionnels chez LT2. Gifsy-2, comme Gifsy-

1, se retrouve à la même position que chez LT2 dans les génomes de différentes souches de *S. Typhimurium* comme ATCC14028, SL1344 et C52. Dans ces 3 dernières souches, Gifsy-2 est un bactériophage fonctionnel capable de se reproduire par un cycle lytique et d'infecter des bactéries non immunes (Figueroa-Bossi & Bossi, 1999). Gifsy-2 est aussi capable d'infecter et de se reproduire chez des bactéries Salmonella ayant un sérotype autre que *Typhimurium* et participe, au même titre que les autres bactériophages tempérés, à la diversité génétique observée chez les bactéries Salmonella (Figueroa-Bossi et al., 2001).

Le potentiel pathogénique de Salmonella est dépendant de multiples facteurs de virulence. Beaucoup d'entre eux ont été acquis avec le temps par des transferts horizontaux d'ADN entre bactéries. Cependant, les bactériophages contribuent aussi de manière significative à l'évolution, à l'adaptation et à la virulence de Salmonella et d'autres bactéries en permettant l'échange et l'acquisition de facteurs de virulence sur une échelle de temps courte. Ainsi, Gifsy-2 joue un rôle non négligeable dans la pathogénie de *S. Typhimurium*. Chez la souris, une souche mutante où Gifsy-2 a été enlevée du génome est 100 fois moins pathogène que la souche sauvage. L'infection par Gifsy-2 et son intégration dans le génome de la souche mutante rétablie la virulence initiale (Figueroa-Bossi & Bossi, 1999)

Le génome de Gifsy-2 (45 500 paires de base) inclut certains gènes codant pour des protéines modifiant fortement la virulence de la bactérie hôte. Ainsi, le gène SodCI code pour une superoxyde dismutase périplasmique. Cette enzyme catalyse la conversion des radicaux superoxydes ($0_2^{\cdot}$) en eau oxygénée (H_20_2). Or, les superoxydes et le monoxyde d'azote (NO) produit par les macrophages peuvent donner des peroxynitrites ($ONOO^-$) toxiques pour la bactérie. SodCI, en réduisant le stock d'anions superoxydes réduit ou prévient la formation de péroxynitrites et prive l'hôte d'un de ces moyens de défense contre Salmonella (Ho & Slauch, 2001).

Gifsy-2 code pour plusieurs autres facteurs de virulence tel le gène GtgE (Ho et al., 2002. De plus, le génome de Gifsy-2 présente de nombreuses similarités de séquence avec d'autres séquences pathogènes notamment au niveau de la région « b » comprise entre les gènes tfaO/tfaT (protéines servant à l'assemblage des fibres de la queue) et attR (site d'attachement au génome) (Figueroa-Bossi et al., 2001).

Enfin, toujours par analyse de séquence et par microscopie électronique, Gifsy-2 est relié au phage lambda d'*E.Coli* en termes d'organisation générale du génome et de sa morphologie (Figueroa-Bossi et al., 2001).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

B. Contexte, intérêts et objectifs de l'étude de Gifsy-2 en microscopie électronique

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à un autre aspect de Gifsy-2. Le contexte général de cette étude s'inscrit dans la compréhension des différents processus et mécanismes d'assemblage de la capside de bactériophages par la caractérisation de différents intermédiaires de réaction.

Ainsi, plusieurs cycles de reproduction de différents phages sont étudiés de manière détaillée tels ceux des bactériophages infectant *E.Coli* comme λ (Murialdo et al., 1975 ; Hendrix et al., 1975 ; Hohn et al., 1975), HK97 (Duda et al., 1995a, 1995b) , T4 (revu dans Miller et al., 2003), T7 (revu dans Cerritelli et al., 2003), ou bien ceux du phage P22 de *Salmonella* (Thuman-Commike et al., 1999; Zhang et al., 2000) ou SPP1 (Becker et al., 1997 ; Dröge et al., 2000) et phi29 de *Bacillus Subtilis* (Tao et al., 1998).

De toutes ces études, certaines similarités et grands principes régissant la construction de la capside des phages de la famille des *Caudovirales* peuvent être déduits (voir aussi figure 8, page 21). Lors de la construction de leur capside, tous ces phages utilisent une forme intermédiaire plus petite et plus sphérique appelée procapside qui par la suite devient la capside mature plus grande et plus angulaire. L'ADN viral est incorporé dans la procapside en maturation par un complexe multi protéique appelé le connecteur situé à l'un de 12 sommets de la capside. Une fois l'ADN introduit, la queue du phage, assemblée par un chemin indépendant, est fixée sur la capside au niveau du connecteur donnant ainsi le virus infectieux.

Tous ces processus dynamiques menant à la production d'une capside virale contenant son ADN sont gouvernés par des interactions entre un nombre limité de protéines dont chacune a un rôle bien précis. In vivo, la **protéine portail** qui sera plus tard le composant central du connecteur, sert de point de nucléation à la polymérisation de la **protéine de capside majeure** pour donner la procapside. L'obtention d'une procapside fonctionnelle est liée à la présence de la **protéine d'échafaudage** qui en quelque sorte guide de manière correcte l'ajout successif de monomères ou capsomères de la protéine de capside majeure. Ensuite, la protéine d'échafaudage est éliminée par la **protéase** virale et l'ADN commence à être introduit dans la capside par le connecteur composé in vivo par un dodécamère de la protéine portail et des **petite** et **grosse sous unité** d'enzymes appelées **terminases**. L'assemblage de la capside se termine par une dernière étape de stabilisation du produit final.

Ainsi, ce schéma global et commun d'assemblage tend vers une origine commune pour tous les bactériophages indépendamment de leurs bactéries hôtes. De plus, avec le

séquençage des génomes de bactéries, il a été observé que les gènes impliqués dans l'assemblage des capsides de phage sont, d'une manière générale, adjacents et dans le même ordre à savoir : protéine portail, protéase, protéine d'échafaudage et protéine(s) de capside (Hendrix et al., 1998).

Néanmoins, les séquences respectives en acides aminées des protéines citées ci-dessus diffèrent grandement à tel point que, dans certains cas, aucune similarité significative n'est détectable. Ce point ajouté au fait que la fonction de ces protéines est néanmoins conservée montre que les relations génétiques entre les bactériophages de la famille des *Caudovirales* sont sûrement très anciennes (Hendrix, 2004).

Par ailleurs, l'hypothèse d'un ancêtre commun très lointain à tous ces phages est appuyée par l'observation que chaque phage possède ces propres particularités et stratégies d'assemblage qui se sont développées au fil du temps. En effet, il a été montré par exemple que le phage T7 n'a pas de mécanisme spécifique pour stabiliser sa capside (Cerritelli et al., 2003) alors que le phage λ possède une seconde protéine de capside mineure (gpD) qui se fixe en surface et stabilise la capside mature étant donné que gpD est nécessaire pour que la totalité du génome soit incorporée (Dokland et al., 1993). Quant à lui, le phage T4 possède deux protéines de capside supplémentaires Hoc et Soc s'accrochant en surface (Fokine et al., 2004). Chez HK97 et son homologue D3, les capsomères (hexamères et pentamères) de la capside se lient de manière covalente les uns aux autres conférant à celle-ci une stabilité accrue (Wikoff et al. 2000 ; Gilakjan et al., 1999).

Une autre stratégie adoptée par les bactériophages pour réduire au minimum l'information génétique requise pour ces protéines structurales est la suppression de fonction ou la fusion de différents gènes en un seul. Par exemple, le phage T7 ne possède pas de protéase (Ceritelli et al., 2003). Chez le phage λ, la protéase gpC et la protéine d'échafaudage gpNu3 sont exprimés au sein du même gène et se recoupent sur plus 100 acides aminés (Ziegelhoffer et al., 1992). HK97 ne possède pas de protéine d'échafaudage indépendante, mais il a été proposé que ce rôle soit tenu par l'extension N-terminale de la protéine de capside majeure (Conway et al., 1995 ; Benevides et al., 2004)

En tenant compte des différentes observations ci-dessus, le prophage Gifsy-2 semble posséder un nouvel arrangement au sein de ces gènes structuraux. Ainsi, les gènes codant pour les petite et grosse sous unité des terminases ainsi que pour la protéine portail sont clairement identifiables par les nombreuses similarités de séquences plus ou moins fortes avec des protéines de phages connus. Étant donné que dans les génomes de phages actifs les gènes utiles à l'assemblage de la capside sont adjacents et souvent dans le même ordre, le gène

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

suivant celui de la protéine portail devrait être celui codant pour la fonction protéase et/ou la protéine d'échafaudage. Or, dans le génome de Gifsy-2, on trouve un inhabituel gros gène couvrant les régions correspondant normalement aux gènes codant pour la protéase, la protéine d'échafaudage et la (les) protéine(s) de capside. Cette particularité fait de Gifsy-2 un phage dont le processus d'assemblage de la capside est intéressant à étudier plus en détail.
Dans cette partie, nous présenterons les premiers résultats dans l'élucidation des protéines impliquées dans l'assemblage de la capside de Gifsy-2. La structure 3D de la capside de Gifsy-2 a été déterminée pour différents états de son cycle d'assemblage par cryo-microscopie électronique. Ceci permet une description fine de l'organisation des protéines au sein de la capside ainsi qu'une comparaison détaillée avec d'autres phages de la famille des *Caudovirales* pour lesquels des informations structurales sont disponibles.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

II. Résultats

A. Production et purification du bactériophage Gifsy-2

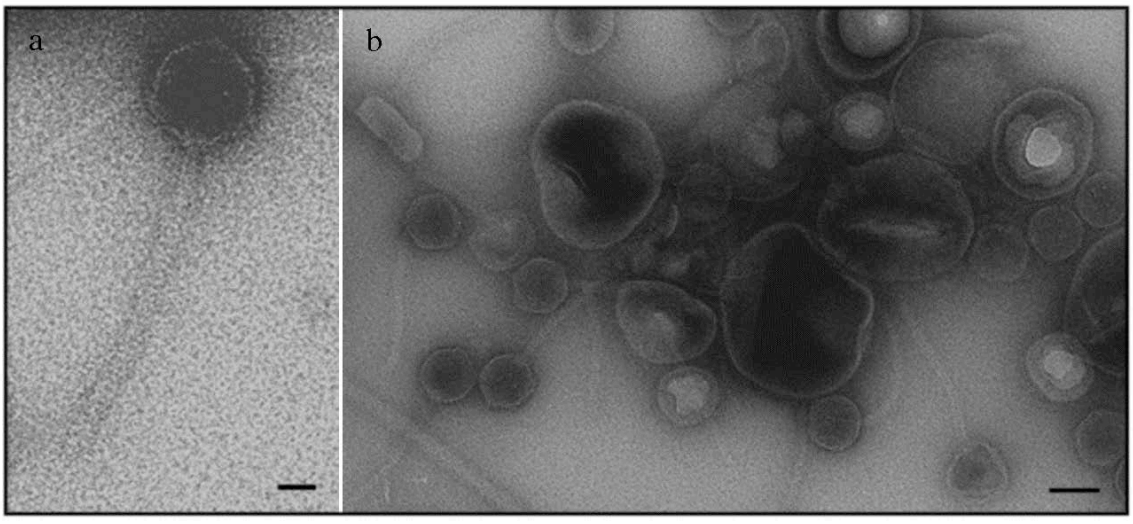


Figure 1 – a- Exemples d'images prises en coloration négative du phage Gifsy-2 (barre = 200 Å). b- Illustration de l'attachement irréversible des phages Gifsy-2 à des résidus de membrane (barre = 500 Å)

Le protocole de purification suivit (voir matériels et méthodes page 84) conduit à une solution concentrée contenant en large majorité des procapsides de Gifsy-2 et aussi des capsides matures vides. Les phages infectieux (avec de l'ADN et une queue) n'ont pu être

séparés suivant ce protocole (figure 1a). Des étapes supplémentaires notamment par centrifugation sur gradient de chlorure de césium n'ont pas permis de récupérer suffisamment de phages infectieux pures principalement à cause de l'attachement irréversible des phages sur des résidus de bactéries lysées (figure 1b).

B. Les protéines structurales de Gifsy-2

1. Organisation générale de la région du génome de Gifsy-2 codant pour les protéines structurales

Le génome du prophage Gifsy-2 est connu par le biais du séquençage complet du génome de la souche LT2 de *Salmonella Typhimurium* (McClelland et al., 2001) (code Genbank : NC_003197). Par similarités de séquence, différents gènes impliqués dans la morphogenèse de la capside de Gifsy-2 sont annotés dans le génome de LT2 (voir tableau ci-dessous).

Gène	**Protéine traduite**	**Fonction**
STM1031	NP_460006, 712 acides aminés	Grosse sous unité de terminase
STM1032	NP_460007, 437 acides aminés	Protéine portail
STM1033	NP_460008, 693 acides aminés	Protéine de la famille des protéases Clp

Fonction présumée des gènes structuraux de Gifsy-2

On retrouve la grosse sous unité de la terminase et la protéine portail qui sont parmi les protéines les mieux conservées entre les différents bactériophages (Casjens, 2003).

Le gène STM1033 est lui très intéressant puisqu'il présente des similarités de séquence avec la famille des protéases Clp (partie N-terminale) et la famille des protéines de capside majeure des phages similaires à Mu (partie C-terminale).

Chez *E.Coli*, la protéase Clp fonctionnelle est constituée par l'assemblage de Clp-P, le domaine protéolytique et de différents domaines régulateurs possédant une activité ATPasique (Clp A ou Clp X). Le clivage des protéines à dégrader se fait généralement après des résidus hydrophobiques et produit des peptides de 7 à 10 acides aminés (Wang et al., 1997).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Lorsque l'on compare la partie N-terminale du gène STM 1033 de Gifsy-2 avec le modèle atomique de la sous unité A de la protéase Clp-P d'*E.Coli*, les similarités de séquence sont de 23% sur 193 acides aminés (figure 2). Aussi, les 3 résidus, composant le site catalytique de la protéase Clp-P (S97, H122 et D171), sont conservés chez Gifsy-2 (à l'exception de l'acide aspartique remplacé par un acide glutamique) (figure 2). Enfin, les similarités de séquences entre Gifsy-2 et Clp-P sont essentiellement concentrées entre les résidus 58 à 163 de Clp-P, excluant ainsi les parties N et C terminales qui, chez Clp-P *d'E.Coli*, sont impliquées dans son oligomérisation (Wang et al., 1997).

En effet, Clp-P d'*E.Coli* est composée de 14 sous unités assemblées sous la forme de deux anneaux superposés de 7 sous unités chacun. Chez les bactériophages ayant recours à une protéase, celle-ci intervient une fois la procapside formée pour éliminer certaines parties ou des protéines entières localisées à l'intérieure de la procapside. Ainsi, il est peu probable que la protéase de Gifsy-2 agisse d'une manière identique à la protéase Clp-P d'*E.Coli* mais la conservation de certains résidus directement impliqués dans la dégradation des protéines montre bien que la fonction protéolytique associée à chaque monomère de Clp-P se retrouve chez Gifsy-2.

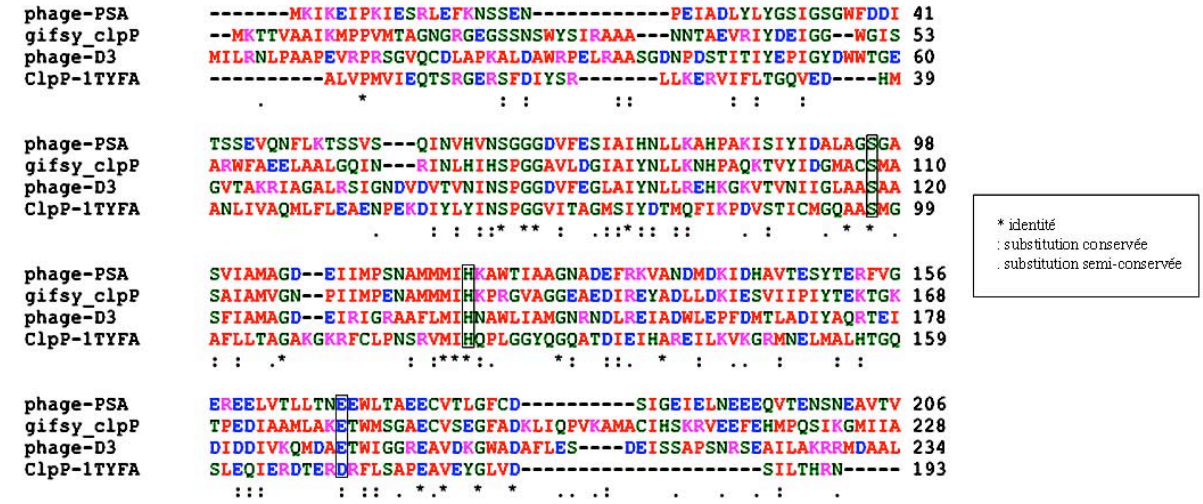
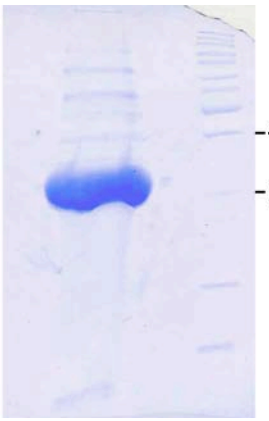


Figure 2 – Alignement de séquences entre les fonctions protéase des phages PSA (CAC85560), Gifsy-2 (NP_460008), D3 (AAD38956) et la sous unité A du modèle cristallographique de la protéase Clp d'E.Coli (code PDB : 1TYFA). La triade catalytique conservée est entourée en noir.

2. Identification de la protéine de capside majeure

À partir de l'échantillon pur contenant en majorité des procapsides de Gifsy-2, nous avons essayé d'identifier quelles protéines composent la capside de Gifsy-2 par séquençage N-terminal et par corrélation avec le génome de Gifsy-2 compris dans celui séquencé de *Salmonella Typhimurium* souche LT2 (NC_003197)



	Séquence déterminée	Résidue de départ (/693)
-40	---AFTHSTSDFG	401
-30	--MAFTHSTSDF	400
	IGMAFTHSTS	398

Figure 3 – Gel SDS 15% et résultat du séquençage N-terminal de la bande principale

Le principal résultat est obtenu pour la bande la plus grosse du gel (Mw ~ 32 kDa) (figure 3). La séquence N-terminale déterminée et sa masse moléculaire correspondent à une séquence couvrant la partie C-terminale (entre 292 et 295 acides aminés) de la protéine putative NP_460008 comptant au total 693 acides aminés. Ce résultat couplé aux similarités locales de séquences (utilisant BLASTP, Altschul et al., 1997) avec la protéine de capside majeure (NP_050638) du bactériophage Mu (28% d'identité sur 70 acides aminés) et celle du phage Pnm1 (NP_284557) (36 % d'identité sur 75 acides aminés) suggèrent que cette protéine est la protéine de capside majeure de Gifsy-2.

Chaque séquençage effectué montre que le début de la séquence se situe entre les résidus 398 et 401. Cette variabilité suggère que la protéine de capside majeure identifiée résulte d'une maturation par clivage protéolytique d'un précurseur plus long. La fonction protéase prédite au niveau des 200 premiers acides aminés du gène STM1033 (cf. partie précédente) va aussi dans le sens d'une maturation protéolytique de la protéine de capside majeure lors de la transition procapside - capside.

Le recours à une protéase lors de l'assemblage de capside de bactériophage a déjà été décrit pour d'autres phages tels HK97 et Lambda. Chez ce dernier, plusieurs modifications protéolytiques, impliquant différentes protéines, se produisent durant la maturation de la

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

procapside (Hendrix & Casjens, 1975). Chez HK97, chaque copie de la protéine de capside majeure gp5 composant la procapside est « amputée » de ses 103 premiers acides aminés par l'intermédiaire de la protéase virale gp4 (Duda et al., 1995).

C. Reconstruction de la capside de Gifsy-2 par cryo-microscopie électronique

1. Les différents types de capside en solution

L'échantillon obtenu en fin de purification contient en majorité des procapsides. Quand la bactérie lyse, différents genres de particules sont libérés : il y a, bien entendu, les phages infectieux, mais aussi des particules non finies tel les procapsides, les capsides matures sans ADN, des particules aberrantes... Dans la plupart des cas, les souches sauvages libèrent en majorité des phages complets et infectieux. Cependant, en théorie, lors deau moment de la lyse, toutes sortes de capsides correspondant à des intermédiaires d'assemblage peuvent être libérées.

Concernant Gifsy-2, sa capside semble posséder une cinétique de maturation lente. En effet, en pratique et avec le protocole de purification suivi, nous avons obtenu un échantillon contenant en grande majorité des particules au stade procapside et aussi des capsides matures vides (figure 4a). Après deux semaines de stockage à 4°C, nous observons au microscope électronique beaucoup plus de capsides en phase d'expansion, malformées ou partiellement closes (figure 4b). Après 1 mois de stockage, la population des particules est de nouveau plus uniforme, mais la proportion de capside mature en solution a fortement augmenté (figure 4c).

Quasiment indiscernable à l'oeil nu, le processus de reconstruction 3D des capsides matures a l'identification de 2 genres distincts de capside mature vide : celles produites dans la cellule (appelées capsides matures native) (figure 4g) et celles provenant d'une expansion de certaines procapsides lors du stockage (appelées procapside maturée) (figure 4f).

Par ailleurs, il y a aussi en solution une seconde classe de procapside (figure 4d) plus foncée ce qui indique la présence de densité supplémentaire à l'intérieur de la capside.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

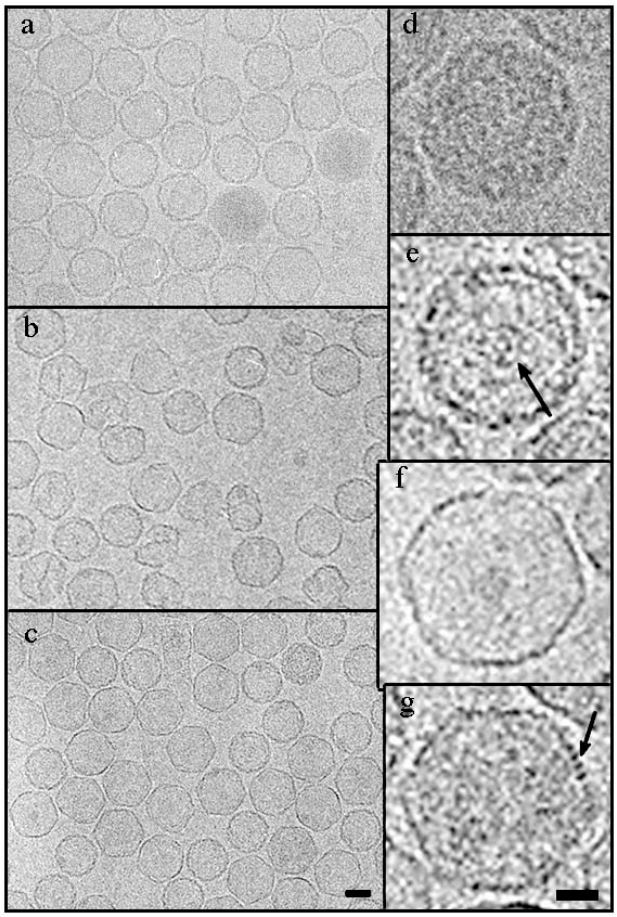


Figure 4 – Extraits d'images prises en cryo-microscopie électronique après une période de stockage nulle (a), de 2 semaines (b) et d'un mois (c) (barre = 300 Å)
Petits encadrés : d – procapside pleine e – procapside vide (la flèche pointe le connecteur situé à un des sommets) f – procapside maturée g – capside mature vide (la flèche pointe sur des décorations extérieures) (barre = 175 Å)

Au total, nous avons donc 4 grands genres différents de capsides de Gifsy-2 en solution : les procapsides partiellement pleines (en très petite quantité) (figure 4d), les procapsides « vides » (figure 4e), les capsides matures provenant d'une expansion de certaines procapsides lors du stockage (figure 4f) et les capsides matures produites par le processus d'assemblage normal (figure 4g).

Les 4 formes de capside ont été caractérisées par cryo-microscopie électronique et analyse d'images (voir matériel et méthode microscopie électronique page 71). Toutes les reconstructions ont été obtenues en imposant les symétries icosaédriques. La géométrie des capsides est décrite par un nombre de triangulation T = 7, la main dextro (d) ou laevo (l) n'a pas été déterminée. En conséquence, le nombre de triangulation T = 7l (figure 5) a été choisi pour toutes les reconstructions et correspond à la main de la reconstruction de la capside

mature du phage HK97 déterminée par cryo-microscopie électronique (Lata et al., 2000) et cristallographie aux rayons X (Wikoff et al., 2000).

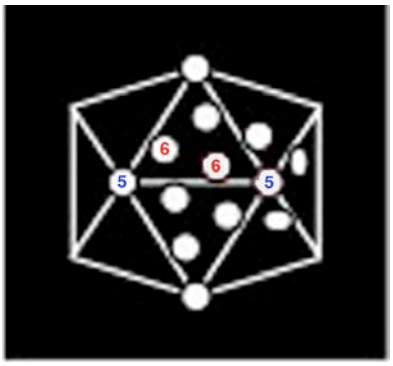


Figure 5 – Schéma de l'arrangement des pentamères (5) et des hexamères (6) pour une capside icosaédrique T = 7l

2. Reconstructions de la procapside de Gifsy-2

a. Les procapsides « vides »

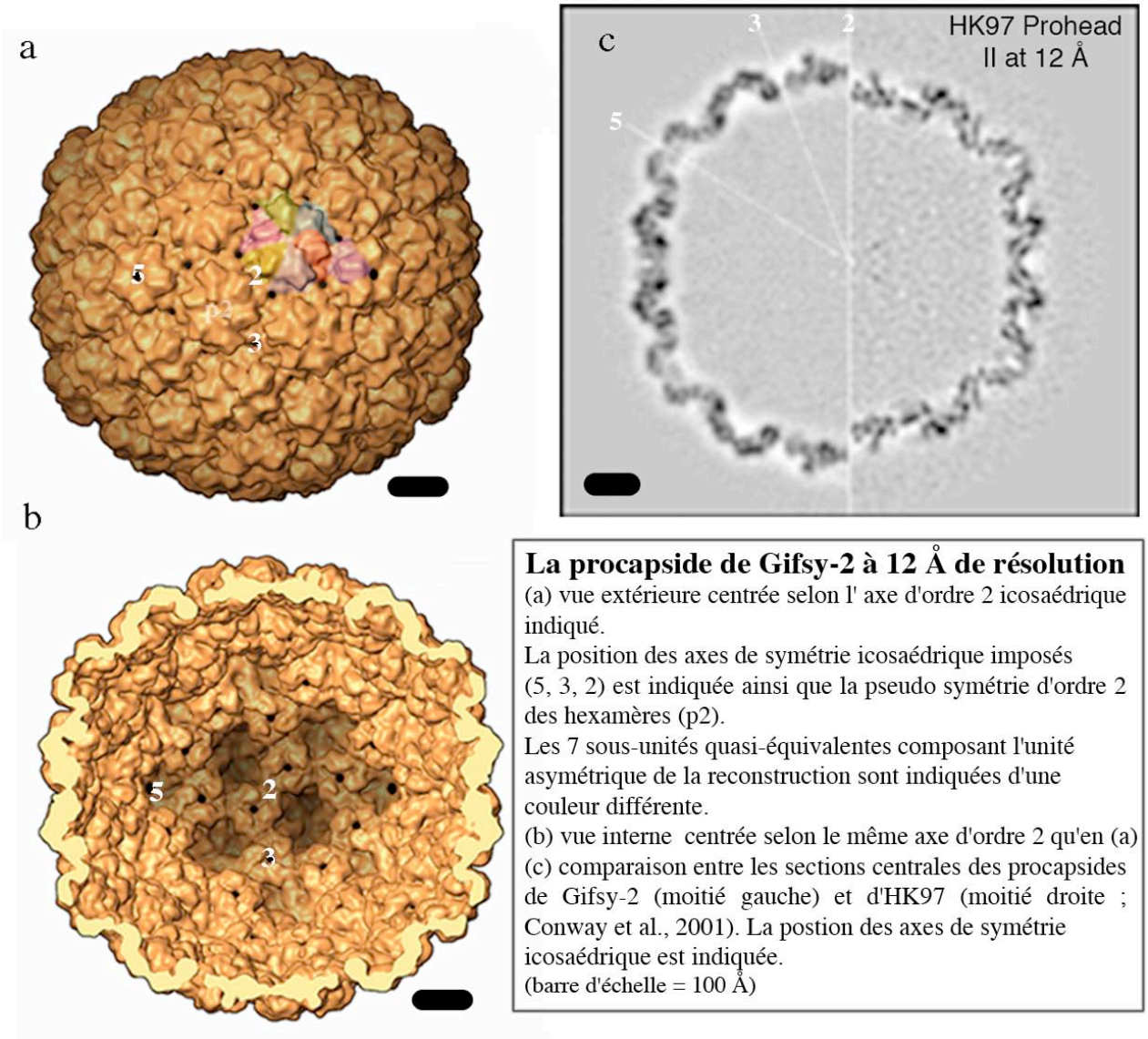
Étant donné que les procapsides sont le genre majoritaire en solution, la résolution finale du modèle a atteint 12 Å en moyennant 6200 particules. Le diamètre maximum de cette procapside est de 550 Å pour une épaisseur de l'enveloppe de protéines de 40 Å en moyenne. La procapside de Gifsy-2 reconstruite est uniquement composée par 420 répétitions de la protéine de capside majeure, étant donné que le connecteur, situé à un des 12 sommets, n'apparaît pas du fait de la symétrie icosaédrique imposée. La reconstruction montre clairement l'arrangement des capsomères en une succession de pentamères au niveau des axes 5 et d'hexamères ailleurs (Figure 6a). Les hexamères sont déformés par cisaillement et suivent plutôt une symétrie d'ordre 2. Ceci est une caractéristique commune aux procapsides des phages HK97, λ, P22, T7 ainsi que pour la procapside du virus de l'herpès simplex type 1 (Trus et al., 1996). Sur une vue de coupe du virus, on distingue clairement les contacts s'établissant entre les sous unités de différents capsomères au niveau des axes de symétrie d'ordre 3 (Figure 6b).

La structure ainsi formée possède déjà une résistance élevée du fait des contacts multiples entre les sous unités. Cependant, cette forme de capside n'est pas totalement étanche puisque l'on distingue des trous dans la structure au niveau des pentamères et des axes d'ordre 3 pour permettre la sortie d'éventuelles molécules. En effet, la plupart des phages au recours à une étape de protéolyse de différentes protéines (protéine d'échafaudage,

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

protéine de capside majeure...) avant que l'ADN ne soit introduit. L'élimination et l'évacuation par les pores de la structure de ces molécules ou partie de molécules modifient la stabilité de la structure et constituent donc une étape dans le cycle d'assemblage des capsides de phages.

La structure de la procapside de Gifsy-2 semble fortement similaire à celle d'HK97 (Conway et al., 2001) (figure 6c). La procapside II d'HK97 est composée par 420 répétitions de la protéine de capside gp5 (Mw =31 kDa). Bien que les protéines composant leur capside soit de taille similaire, la procapside de Gifsy-2 est légèrement plus grande que celle d'HK97. Cependant, la forme et l'organisation générales de ces deux procapsides se ressemblent fortement.



La procapside de Gifsy-2 à 12 Å de résolution
(a) vue extérieure centrée selon l' axe d'ordre 2 icosaédrique indiqué.
La position des axes de symétrie icosaédrique imposés (5, 3, 2) est indiquée ainsi que la pseudo symétrie d'ordre 2 des hexamères (p2).
Les 7 sous-unités quasi-équivalentes composant l'unité asymétrique de la reconstruction sont indiquées d'une couleur différente.
(b) vue interne centrée selon le même axe d'ordre 2 qu'en (a)
(c) comparaison entre les sections centrales des procapsides de Gifsy-2 (moitié gauche) et d'HK97 (moitié droite ; Conway et al., 2001). La postion des axes de symétrie icosaédrique est indiquée.
(barre d'échelle = 100 Å)

Figure 6 – Reconstruction de la procapside de Gifsy-2

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

b. Les procapsides « pleines »

Sur toutes les images prises en cryo-microscopie électronique, seulement une centaine de procapsides foncées ont pu être extraites (à comparer des 12000 procapsides vides). Il est donc plus difficile d'interpréter les résultats car la reconstruction obtenue est de moins bonne qualité. Néanmoins, il s'agit sans aucun doute d'un autre genre de procapside, un état intermédiaire différent, ayant un temps de vie plus court mais possédant une certaine stabilité étant donné que la concentration de ces procapsides n'évolue pas dans le temps même après plus d'un mois de stockage.

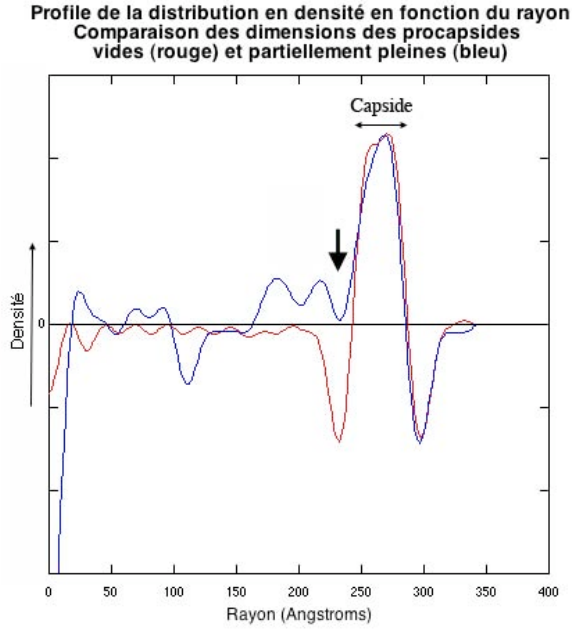


Figure 7 – Comparaison des dimensions des procapsides vides et pleines. La flèche indique les densités internes présentes chez les procapsides foncées (courbe bleu) et absentes chez les procapsides vides (courbe rouge).

La surface des procapsides denses est identique à celle des procapsides vides, leur diamètre externe est aussi le même (dmax = 550 Å). Par contre, à l'intérieur, on distingue des structures internes qui ont cependant une intensité plus faible que les protéines composant la procapside seule (figure 7, flèche). Sur une vue intérieure de la reconstruction (figure 8a), il apparaît que la répartition de ces densités n'est pas uniforme. Le lien de ces densités avec la capside se fait au niveau des trimères internes à l'exception de ceux qui sont situés sur les axes d'ordre 3 stricts (figure 8a). Ces structures internes ne s'arrangent pas suivant les symétries icosaédriques imposées lors du calcul de la reconstruction ce qui rend d'autant plus difficile leur localisation précise et les interprétations en découlant. De plus, à un contour de

surface donné, ces densités sont contre balancées par la frange d'interférence généré par la variation du contraste de phase (effet de la fonction de transfert de contraste). Néanmoins, sur une section centrale, les connexions de ces structures internes avec la capside sont visibles au niveau des axes d'ordre 5 et 2 (figure 8c – flèches).

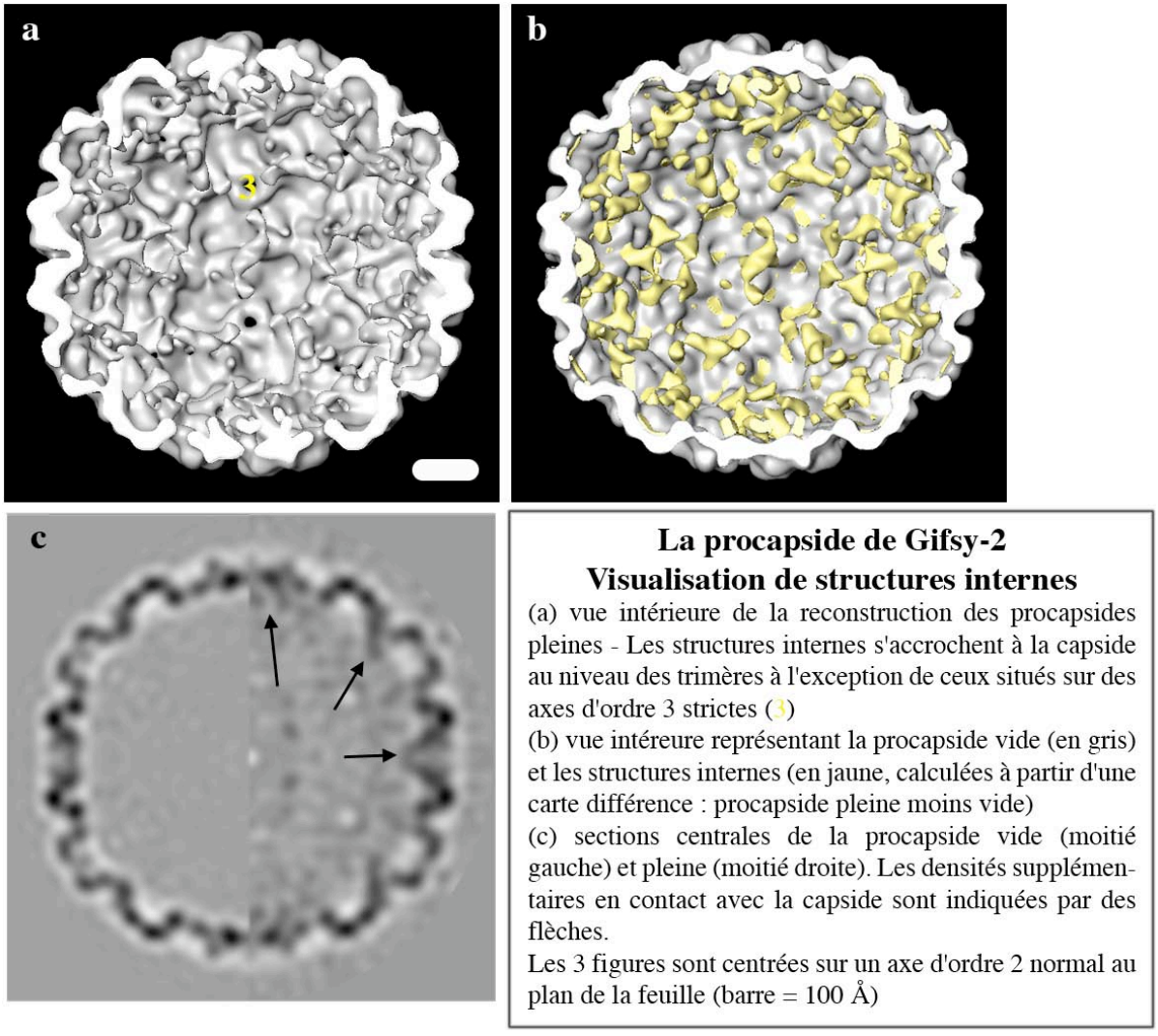


Figure 8 – Reconstruction des procapsides pleines

Il est difficile de conclure sur la nature précise de ces densités supplémentaires, mais il s'agit sûrement d'un état précédant la procapside vide. En fait, cette procapside pleine fait fortement penser à une procapside contenant la protéine d'échafaudage ou une extension tenant ce rôle. Ce type de structure intermédiaire a déjà été visualisé en cryo-microscopie électronique pour d'autres bactériophages. Chez le phage T7, la protéine d'échafaudage gp9 a été localisée à l'intérieure de la capside au niveau des hexamères mais pas des pentamères (Ceritelli et al., 2003). Chez le phage P22, l'accrochage de la protéine d'échafaudage gp8 (200 - 300 copies

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

par capside) se fait au niveau des trimères internes sur certaines des 7 sous – unités composant l'unité asymétrique (Thuman-Commike et al., 1999, 2000). Enfin, chez HK97, le premier état formé appelé procapside I contient des structures internes situées au niveau du centre des hexons (Conway et al., 1995).

En résumé, ces procapsides partiellement pleines, contenant une structure interne, sont certainement une étape dans l'assemblage de la capside de Gifsy-2. Le fait qu'on les retrouve en solution en très faible quantité et même après une longue période de stockage témoigne d'un état intermédiaire ayant une courte durée de vie et possédant une certaine stabilité. La disposition interne de ces densités accrochées au niveau des trimères de certaines protéines de capside majeure fait fortement penser à la fonction tenue par les protéines d'échafaudage de bactériophage guidant l'assemblage correct des procapsides.

3. Reconstructions des capsides de Gifsy-2 après expansion

a. Les procapsides maturées

Ce type de capsides matures provient de l'expansion naturelle de certaines procapsides lors du stockage à 4°C de l'échantillon. Mais toutes les procapsides n'ont pas subit cette transformation ce qui signifie que seulement certaines procapsides, se trouvant dans un état bien particulier, ont subi l'expansion. Ceci est un exemple de plus du caractère métastable des procapsides de phage. Ainsi, pour le phage HK97 dont le cycle d'assemblage de la capside a été étudié dans le détail, de nombreux traitements chimiques provoquent l'expansion partielle ou totale de la procapside in vitro (Duda et al. 1995). L'expansion de procapside lors du stockage dans un tampon contenant peu de sel a aussi été décrit pour certains mutants du phage T7 (Cerritelli et al., 2003)

Une des conséquence de cette maturation progressive in vitro est l'obtention d'une population de capsides plus hétérogène à en juger par le nombre de capsides plus ou moins malformées (figure 4). Bien que les particules aient été sélectionnées pour leur absence de déformation, cette observation est l'une des raisons pour lesquelles la résolution reste limitée à 15 Å avec pourtant 3281 particules incluses dans la modèle finale.

La surface extérieure des procapsides maturées exhibe des changements considérables par rapport à la procapside. Ainsi, le relief de cette capside est beaucoup moins accidenté que celui de la procapside. L'épaisseur de l'enveloppe protéique passe de 40 Å chez la procapside

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

à 30 Å chez la procapside maturée. Dans le même temps, le volume intérieur augmente d'environ 60%.

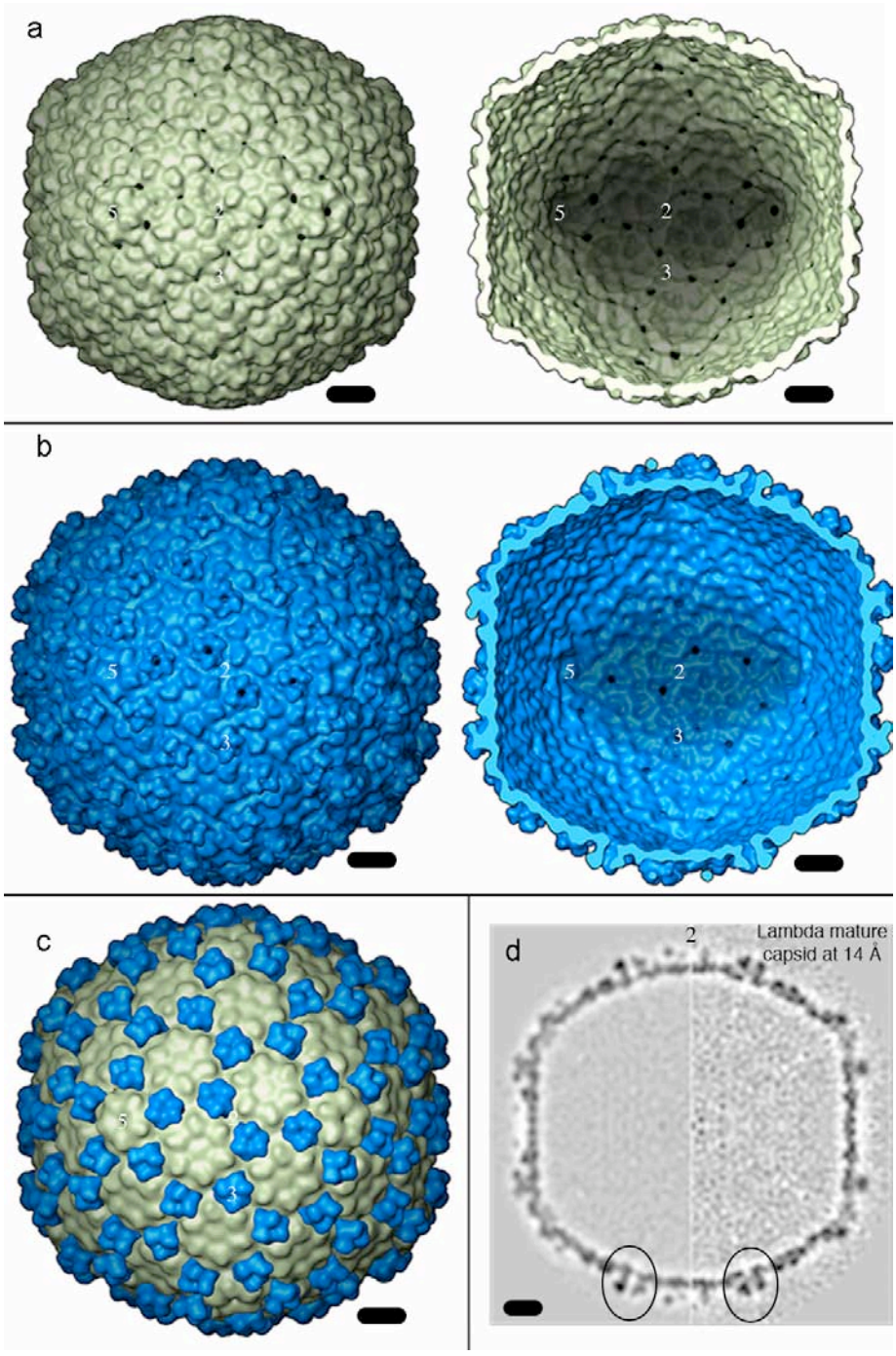


Figure 9 – Reconstructions 3D des procapsides maturées (a – vue extérieure et intérieure) et des capsides matures vides (b – vue extérieure et intérieure) centrées selon un axe de symétrie d'ordre 2 normal au plan de la feuille. (c) – Carte composite de la capside mature de Gifsy-2 représentant l'arrangement des protéines de capside majeure (en vert) et les protéines de capside mineure (en bleu). (d) - Comparaison entre la section centrale de la capside mature de Gifsy-2 (gauche) et de Lambda (droite) (Yang et al., 2000). Une protéine de décoration est entourée pour chacun des phages (barres = 100 Å).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

La capside est toujours organisée en pentamères et en hexamères mais ces derniers ne sont plus cisaillés et possèdent une symétrie d'ordre 6. Chaque capsomère est délimité de ses voisins par un petit sillon continu (figure 9a).
Cette transition procapside / capside mature est générale à tous les bactériophages de la famille des *Caudovirales* étudiés à ce jour mais aussi aux virus de l'herpès (Trus et al., 1996). Cette transformation implique des changements de conformation significatifs à la fois au niveau des structures secondaires et tertiaires de la protéine de capside majeure (Tuma et al., 2001 ; Benevides et al., 2004). D'un point de vue global, la réorganisation des sous unités pour former la capside mature se fait par des mouvements de rotation et de translation concertés des différents domaines composant chaque sous unité (Conway et al., 2001)

b. Les capsides matures vides

En solution, ce type de capside se retrouve en faible proportion comparée aux procapsides maturées et aux procapsides vides. On peut penser qu'au moment de la lyse, une faible quantité de capsides pleines ou partiellement pleines en ADN sont libérées et étant donné que la maturation de ces particules n'est pas totalement finie (fermeture du connecteur par exemple), l'ADN empaqueté sort de la capside. Au final, on obtient donc des capsides matures vides. Ce type de capside a été assemblé et maturé dans la bactérie, *in vivo*, au contraire des procapsides maturées dont l'expansion s'est produite *in vitro*. Au même titre que les procapsides maturées, les capsides matures vides sont le résultat de la transformation procapside / capside. Il n'est donc pas étonnant de retrouver sur la reconstruction des capsides matures vides des caractéristiques communes avec les procapsides maturées. Ainsi, les capsides matures vides ont la même organisation en pentamères et hexamères qui eux-mêmes ont les mêmes formes (figure 9b). Cependant, une différence majeure entre les procapsides maturées et les capsides matures vides est la présence de densité supplémentaire au niveau de tous les axes d'ordre 3 (figure 9b - c). Par comparaison avec les reconstructions des procapsides vides et maturées, cette densité ne peut qu'être une protéine supplémentaire venant se fixer en surface vers la fin de l'assemblage de la capside de Gifsy-2.

En comparant les vues intérieures des procapsides maturées et des capsides matures, on ne distingue aucune différence ce qui signifie que l'accrochage de cette protéine de capside mineure se fait uniquement en surface (figure 9).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

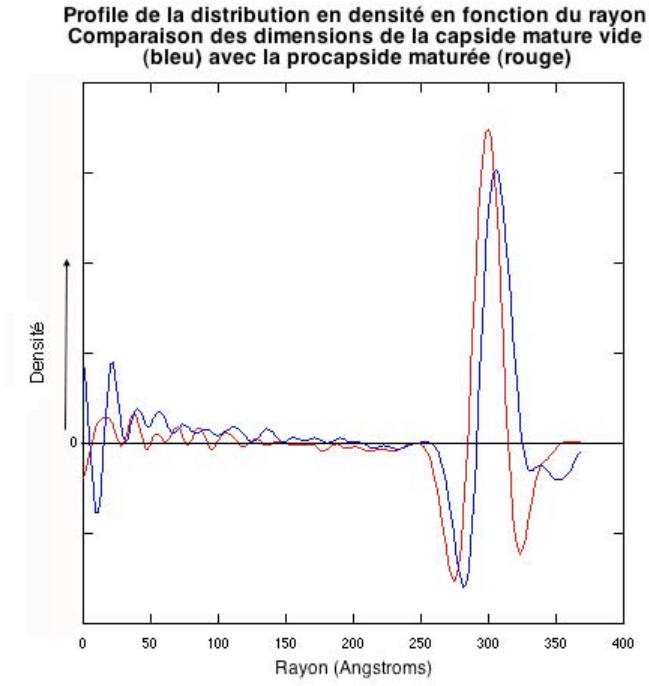


Figure 10

Par ailleurs, les capsides matures vides ont un volume intérieur 7% plus grand que celui des procapsides maturées (figure 10). Cette observation laisse à penser que lorsque la protéine de capside majeure est présente en surface, la capside de Gifsy-2 peut atteindre une taille un plus grande. Cette légère différence de taille est probablement causée par l'empaquetage de l'ADN dans la capside qui impose au fur et à mesure du remplissage des contraintes de plus en plus fortes sur les parois de la capside.

L'utilisation de protéines de capside mineure pour la stabilisation des capsides matures est une stratégie qui a déjà été décrite pour d'autres bactériophages.

Notamment, le bactériophage Lambda possède une protéine de capside mineure, GpD, se fixant sur la surface du phage exactement à la même position que celle de Gifsy-2. GpD est une protéine de 115 acides aminés se fixant sur la capside sous la forme d'un trimère. En l'absence de cette protéine, le phage Lambda est toujours capable de se reproduire dans la cellule, mais par contre, in vitro, seulement 80% de l'ADN viral peut être introduit dans ces capsides sans GpD (Dokland et al., 1993), supportant l'idée que l'augmentation de la tension associée au confinement de la totalité du génome requiert que la capside soit stabilisée par GpD.

En comparant les sections centrales de Gifsy-2 et Lambda, les similarités morphologiques entre les 2 phages sont évidentes tout particulièrement au niveau des protéines de capside mineure (figure 9d - cercles).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

c. Mécanisme de l'attachement et de la stabilisation par la protéine de capside mineure de Gifsy-2

De manière à mieux visualiser comment s'attache la protéine de capside mineure sur la surface de Gifsy-2, une carte différence entre la capside mature vide et la procapside maturée a été calculée (figure 9c). Le résultat est montré à travers différentes sections icosaédriques (vues selon un axe d'ordre 3) de la procapside maturée, de la capside mature et de la carte différence (figure 11).

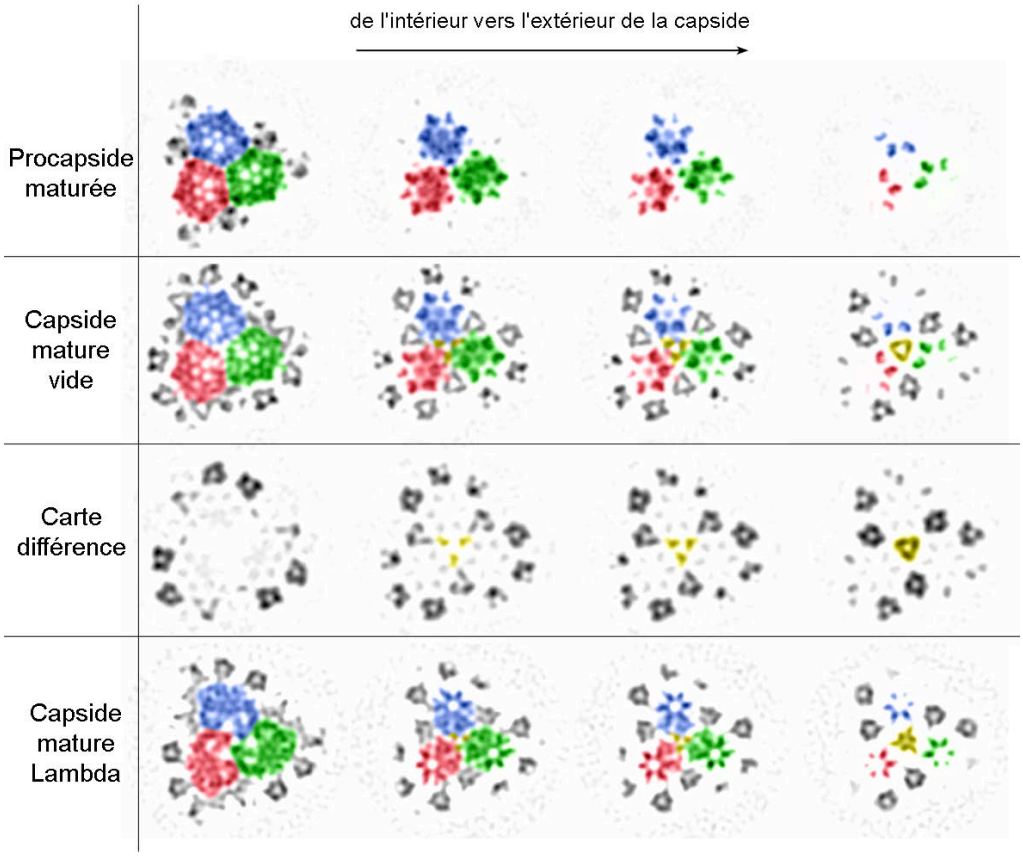


Figure 11 – Portions de sections icosaédriques sélectionnées à différents rayons au travers des reconstructions et centrées selon un axe d'ordre 3 où 3 hexamères interagissent (les densités représentant les protéines sont foncées). Les couleurs bleue, rouge et verte représentent, dans chaque section, la densité occupée par un hexamère de la protéine de capside majeure. La couleur jaune correspond, dans chaque section, à la densité occupée par la protéine de capside mineure. Le même code de couleur est utilisé pour Lambda pour une comparaison avec Gifsy-2.

On voit que l'encrage de la protéine de capside mineure se fait au niveau des espaces existants entre les 3 sous unités de la protéine de capside majeure interagissant à chaque axe

d'ordre 3 (seconde colonne). L'attachement de la protéine mineure crée de nouveaux contacts avec toutes les sous unités voisines (troisième colonne). Enfin, par analogie avec Lambda, il semble aussi que la protéine de capside mineure de Gifsy-2 soit un trimère (quatrième colonne).

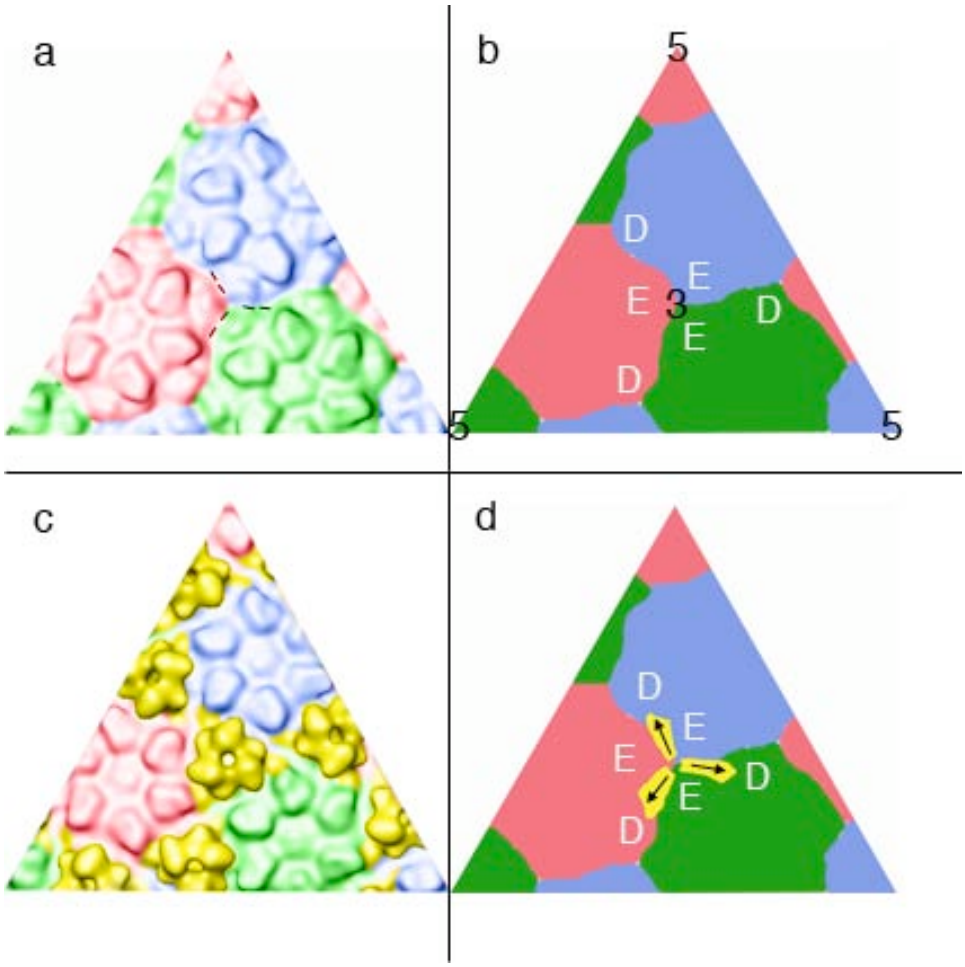


Figure 12 – (a – c) 1 des 20 faces extraite des reconstructions 3D (figure 10) de la procapside maturée (a) et de la capside mature vide (c). Les hexamères de la protéine de capside majeure sont colorés en bleu, rouge et vert. La protéine de capside mineure est colorée en jaune. Les lignes pointillées en (a) représentent la position estimée de l'accrochage de la protéine de capside mineure à la surface.

(b – d) Représentation schématique de (a) et (c) respectivement, utilisant le même code de couleur. Les numéros en (b) indiquent la position de certains axes de symétrie icosaédriques. Les lettres D et E représentent la position approximative de sous unités de la protéine de capside majeure. Les flèches en (d) pointent les sous unités D semblant être liées à la protéine de capside mineure après son accrochage.

Une autre représentation de l'attachement est illustrée figure 12. La protéine de décoration se fixe sur la capside à chaque axe icosaédrique d'ordre 3 au niveau des petits sillons marqués

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

par des lignes pointillées (figure 12a). En se fixant, elle s'attache ainsi aux 3 sous unités de la protéine de capside majeure interagissant à ce site (illustré schématiquement figure 12b par les trois sous unités nommées E appartenant à 3 hexamères différents). De plus, elle crée des contacts supplémentaires par l'intermédiaire de petites extensions (figure 12c et d) avec les 3 sous unités voisines (illustré figure 12d par les trois sous unités nommées D). En tout, on pourrait dire que la protéine de capside mineure agit comme un « bouchon » en se liant à 6 sous unités à chaque axe d'ordre 3 et augmentant de ce fait la stabilité de la capside.

D. Similarités structurales entre les protéines composant la capside des bactériophages de la famille des Caudovirales

La famille des *Caudovirales* regroupe en 3 sous genres (*Podoviridae*, *Myoviridae* et *Siphoviridae*) la majorité des bactériophages recensés. Des travaux notamment en cryo-microscopie électronique montrent que les capsides de ses phages se ressemblent bien que celles-ci soient de tailles très variées et que les protéines les composant soient très différentes du point de vue de leur séquence primaire.

La structure atomique du phage HK97 d'E.Coli (*Siphoviridae*) (Wikoff et al., 2000 ; Helgstrand et al., 2003) a révélé un repliement jamais encore décrit pour sa protéine de capside majeure. Celle-ci est composée d'une structure mixte en feuillets β (28%) et en hélices α (32%) dont le corps principal est composé par deux domaines axial (A) et périphérique (P). Récemment, à partir de reconstructions obtenues en cryo-microscopie électronique, il a été montré que la protéine de capside du phage P22 (*Podoviridae*) de *Salmonella* possède des éléments de structure secondaire à la même position qu'HK97 (Jiang et al., 2003). Durant la rédaction de ce mémoire, les mêmes observations ont été faites pour la protéine de capside du phage ϕ29 (*Podoviridae*) de *Bacillus Subtilis* (Morais et al., 2005). Enfin, la structure atomique de la protéine (gp24) composant les pentamères du phage T4 (*Myoviridae*) d'*E.Coli* a été résolue par cristallographie (Fokine et al., 2005) et le résultat montre que le repliement de cette protéine est proche de celui de la protéine de capside d'HK97.

Ainsi, le repliement de la protéine de capside d'HK97 est vraisemblablement très répandu chez les phages à queue et pourrait être aussi présent chez Gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

1. Ajustement du modèle atomique d'HK97 dans la densité électronique de la procapside et de la capside mature de Gifsy-2

Le bactériophage Gifsy-2 appartient à la famille des *Siphoviridae* comme HK97 et de manière à tester l'hypothèse émise ci-dessus, nous avons essayé d'ajuster le modèle atomique d'HK97 (code PDB : 1OHG) et le pseudo modèle atomique de la procapside d'HK97 (code PDB 1IF0) dans la densité électronique des capsides matures et des procapsides de Gifsy-2 obtenues par microscopie électronique.

Les résultats obtenus en utilisant les programmes O et SITUS (Chacon et al., 2002) montrent qu'HK97 peut être raisonnablement incorporé dans la densité électronique de Gifsy-2 (figure 13). Les séquences protéiques de la protéine de capside majeure de Gifsy-2 et HK97 sont très différentes (moins de 20% d'identité) mais elles sont de taille similaire (292-295 acides aminés pour Gifsy-2 et 282 pour HK97). En tenant compte des similitudes entre les structures déterminées par microscopie électronique (même nombre de triangulation T = 7, organisation en pentamères et hexamères...), on peut penser qu'HK97 et Gifsy-2 partage un repliement commun au niveau de leur protéine de capside. Bien entendu la résolution de 17 Å pour la capside mature et de 12 Å pour la procapside limite quelque peu l'interprétation des résultats.

Cependant, sur les 4 grands domaines composant la structure atomique d'HK97, les domaines A et P, regroupant la majorité des structures secondaires, semblent les mieux conservés. Le domaine N-terminal et celui contenant la boucle E sont plus reliés aux spécificités propres d'HK97. Ainsi, la boucle E est impliquée dans la formation de liaisons covalentes entre les sous unités de la capside. Ce mécanisme de stabilisation n'est pas utilisé par Gifsy-2 qui, à la place, possède une seconde protéine de capside. Il n'est donc pas surprenant que la boucle E soit en dehors de la densité électronique de la procapside de Gifsy-2 (figure 13d). Par ailleurs, au niveau de la boucle E, Gifsy-2 possède une zone supplémentaire non occupée par HK97 (figure 13b, c et d), ce vide peut être expliqué en partie par la différence dans les mécanismes de stabilisation et par les 15 acides aminés supplémentaires de la protéine de capside majeure de Gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

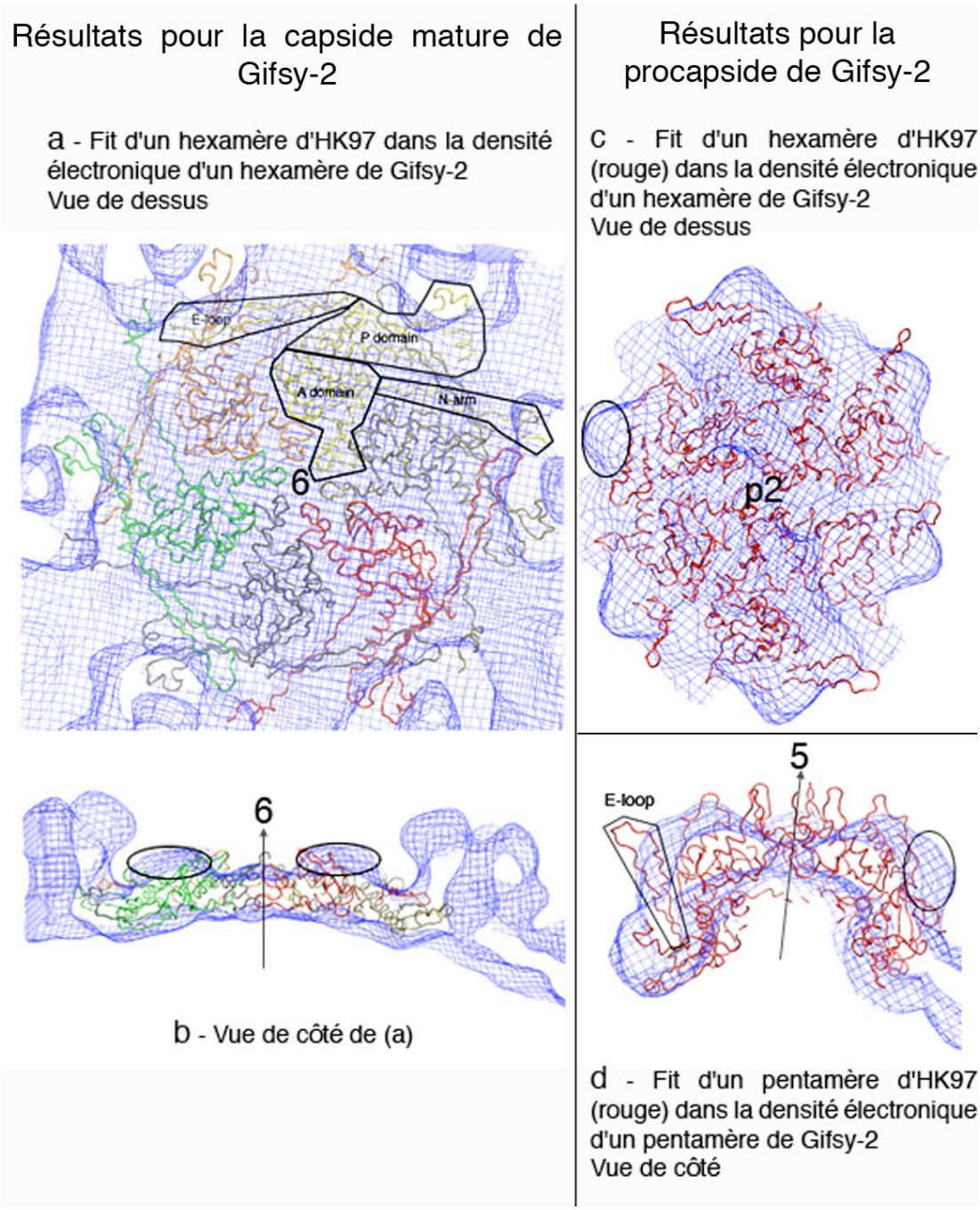


Figure 13 – illustrant les résultats obtenus pour l'ajustement des modèles atomiques d'HK97 dans la densité électronique de Gifsy-2 (la position des axes de symétrie selon lesquelles les figures sont centrées est indiquée).

(a – b) Chaque monomère d'HK97 est coloré différemment et seule la chaîne principale est représentée. Les limites approximatives des 4 domaines A, P, E et N composant un monomère d'HK97 sont illustrées en (a). Un exemple de 2 des 6 zones de la densité électronique de Gifsy-2 non occupées par HK97 est représenté en (b)

(c) La partie entourée représente 1 des 6 zone non occupée par un monomère d'HK97.

(d) Une des 6 boucle E de chaque monomère d'HK97 pointant en dehors de la densité est entourée. La seconde zone vide entourée correspond à la zone entourée en (c).

Aussi, il semble que la différence de taille entre les 2 phages soit encore plus visible pour la procapside. Le pentamère d'HK97 est moins large et plus épais imposant une courbure plus importante que chez Gifsy-2 au niveau des axes 5 (figure 13d et aussi figure 6c). La différence de courbure entre les deux phages est la principale raison expliquant l'impossibilité d'ajuster directement l'unité asymétrique d'HK97 (7 sous unités : 6 hexamériques et 1 pentamérique) dans celle de Gifsy-2.

2. Ajustement du modèle atomique de la protéine de décoration GpD du phage Lambda dans la densité électronique de la capside mature de Gifsy-2

Gifsy-2 possède une seconde protéine de capside, absente des procapsides, qui se fixe en surface des capsides matures et aide présumément à la stabilisation de la capside en se liant aux sous unités de la protéine de capside majeure. Le phage Lambda d'*E.Coli* a lui aussi recours à une protéine de décoration GpD dont la structure atomique a été résolue par cristallographie (Yang et al., 2000). Sur les reconstructions obtenues en microscopie électronique pour ces 2 phages, les deux protéines de décoration se ressemblent beaucoup et il n'est pas étonnant que le modèle atomique de GpD s'ajuste très bien dans la densité électronique correspondant chez Gifsy-2 (figure 14a). Par analogie avec Lambda, il semble bien que la protéine de décoration de Gifsy-2 soit un trimère. Par ailleurs, il semble y avoir une légère différence de taille entre les deux protéines. Une zone au sommet de la densité de la protéine de décoration de Gifsy-2 n'est pas occupée par GpD (figure 14a) et aussi, l'interface entre la protéine de décoration et la capside sous jacente est mal définie en partie à cause du fait que dans le modèle atomique de GpD, les 14 premiers acides aminés de chacune des 3 chaînes ne sont pas définis. Cependant, chez Lambda, l'interaction entre GpD et la protéine de capside majeure GpE semble se faire au centre de chaque axe 3 alors que chez Gifsy-2, nous avons montré que la protéine de décoration interagit en plus avec 3 sous unités voisines (figure 14b).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

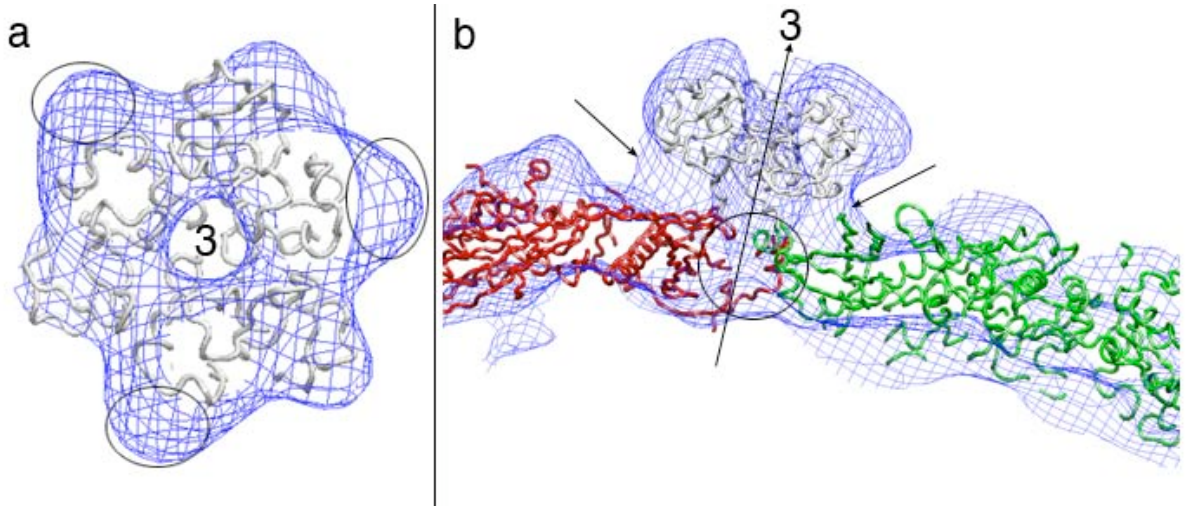


Figure 15

a - vue de face du fit du modèle atomique de la protéine de capside mineure GpD (argent) du phage Lambda dans la densité correspondant à la protéine mineure de Gifsy-2. Les 3 zones entourées correspondent au sommet de la protéine de capside mineure de Gifsy-2 non occupée par GpD. b- vue de côté, centrée au niveau d'un axe de symétrie icosaédrique d'ordre 3, montrant le fit de 2 hexamères d'HK97 (rouge et vert) ainsi que celui de la protéine gpD de Lambda (argent) dans la densité électronique de la capside mature de Gifsy-2. D'une manière globale, cette figure illustre les différences entre HK97 et Gifsy-2 au niveau des interactions entre les capsomères (le cercle central montre des parties chevauchantes) et les différences entre Lambda et Gifsy-2 au niveau de l'accrochage des protéines de capside mineure sur la capside (flèches).

III. Conclusion et perspectives

A. Structure des capsides de phage

Avec le temps, de nombreuses reconstructions tridimensionnelles de capsides ont été calculées et les similarités dans la construction des capsides de bactériophages présentant un nombre de triangulation T = 7 sont évidentes notamment pour ce qui concerne les procapsides (phages HK97, P22, T7 et Lambda). Elles sont toutes composées d'une seule protéine formant des pentamères à chaque sommet et des hexamères possédant une symétrie d'ordre 2 pour les procapsides et une symétrie d'ordre 6 pour les capsides matures. À l'intérieur de la procapside de Gifsy-2, les interactions les plus fortes se trouvent au niveau des axes d'ordre 3 qui sont aussi les sites d'attachement des protéines internes telle la protéine d'échafaudage (Thuman-Commike et al., 1999) et l'ADN viral (Katsura, 1989).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Une forme plus angulaire, une diminution de l'épaisseur de la paroi, une réorganisation des sous unités et un accroissement de la stabilité de l'édifice sont les conséquences majeures de la transition procapside / capside chez les phages.

De plus, les protéines de capside majeure semblent posséder un repliement tridimensionnel commun basé sur celui du phage HK97. Gifsy-2 semble aussi respecter ce modèle et possède en plus un petit domaine supplémentaire au niveau de la boucle E d'HK97. Lorsque l'on s'intéresse de plus près aux résultats obtenus entre les protéines de capside des phages HK97, P22 (Liang et al., 2003), ϕ29 (Morais et al., 2005) et T4 (Fokine et al., 2005), il apparaît aussi que les domaines A et P sont les mieux conservés et que la zone occupée par la boucle E est très variable d'un phage à l'autre (différence entre les interactions inter et intra capsomères). L'insertion d'un domaine propre à chaque phage au niveau de la boucle E est aussi observée pour les phages ϕ29, P22 et T4. Ce domaine détermine les interactions entre les sous unités d'un capsomère et semble plus variable d'un phage à un autre. Il est donc fort probable que Gifsy-2 suit aussi ce schéma, impliquant une conservation des domaines A et P qui donnent leur forme caractéristique en L aux sous unités des bactériophages à queue.

B. Stabilisation de la capside mature des bactériophages par une protéine externe

L'utilisation de protéines supplémentaires pour obtenir la forme mature de capside virale a déjà été observée pour d'autres phages comme les protéines Hoc et Soc du phage T4 (Iwasaki et al., 2000; Olson et al., 2001 ; Fokine et al., 2004) ou GpD du phage Lambda (Dokland et al., 1993).

La protéine Hoc s'accroche à la surface de la capside du phage T4 au centre des hexamères mais pas des pentamères. Cette protéine n'a pas d'effet marqué sur la stabilité de la capside et n'est pas requise pour obtenir un phage infectieux. La protéine Soc forme des trimères s'accrochant à la périphérie des hexamères mais pas des pentamères. Soc n'est pas indispensable pour le phage T4 bien que cette protéine contribue à la stabilité de la capside de T4 contre les températures et pH alcalins extrêmes (Iwasaki et al., 2000).

Chez le phage Lambda, gpD s'accroche au niveau des axes de symétrie d'ordre 3 tout comme la protéine de décoration de Gifsy-2. Les similarités morphologiques entre ces deux protéines sont fortes. Cependant, aucune protéine du génome de Gifsy-2 ne donnent d'homologie détectable avec la séquence primaire de gpD.

Pour Gifsy-2, la protéine de décoration n'est pas nécessaire à la transition procapside/capside tout comme GpD. L'organisation générale des protéines de capside majeure au sein de la procapside maturée et de la capside mature de Gifsy-2 est très similaire. Cependant, la procapside maturée est d'une taille légèrement inférieure à la capside mature suggérant que la protéine de capside mineure a un rôle essentiel dans cette différence de volume.
De plus, l'accrochage de la protéine de décoration à chaque axe 3 renforce l'étanchéité de cette zone où il apparaît des zones de densité moindre (pores) sur les vues intérieures de la procapside maturée et même de la capside mature (figure 9). La reconstruction de la capside mature suggère que la protéine de décoration établie aussi des liens avec des sous unités n'interagissant pas au niveau de l'axe 3 où elle s'attache. Ainsi, l'ajout de la protéine de capside mineure permet vraisemblablement aux différents capsomères de la protéine de capside majeure de s'organiser d'une manière légèrement différente. La conséquence de ce réarrangement est une cavité plus grande à même de pouvoir contenir la totalité du génome de Gifsy-2.

C. Les gènes structuraux impliqués dans l'assemblage de la capside de Gifsy-2

La structure des capsides de phage respecte certaines caractéristiques attestant de leur lointaine descendance commune tel le repliement de leur protéine de capside (Fokine et al., 2005). Aussi, l'organisation générale des gènes impliqués dans l'assemblage des capsides est généralement similaire (figure 15). Bien qu'il y est peu de similarités de séquences entre les protéines des différents phages illustrés figure 15, la fonction de celles-ci est fortement conservée. Cependant, différentes variantes touchant ce cycle d'assemblage ont perduré avec le temps quand elles confèrent un léger avantage au virus.

Ainsi, Gifsy-2 semble présenter un nouvel agencement au niveau de ses gènes structuraux étant donné que la région codant chez les autres phages pour la protéase, la protéine d'échafaudage et les protéines de capsides est occupée par un seul gène. La totalité des fonctions regroupées sur ce gène n'est pas connue à l'heure actuelle, mais la partie C-terminale contient la protéine de capside majeure alors qu'il est prédit que la partie N-terminale contient la protéase.

Des études sur des phages similaires à Gifsy-2 ont montré que la fusion de deux fonctions en une seule est possible et par analogie, cette situation pourrait se retrouver chez Gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Ainsi, chez le phage λ, la protéase et la protéine d'échafaudage sont exprimées à partir du même gène et ces 2 protéines ont un tiers de leurs acides aminés en commun (Ziegelhoffer et al., 1992). De plus, chez le phage HK97 il n'y a pas de protéine d'échafaudage indépendante mais ce rôle semble tenu par la partie N-terminale (le domaine Δ, 104 acides aminés) de la protéine de capside majeure. L'élimination de ce domaine par la protéase est une étape indispensable à la transition procapside – capside (Duda et al., 1995 ; Conway et al., 1995).

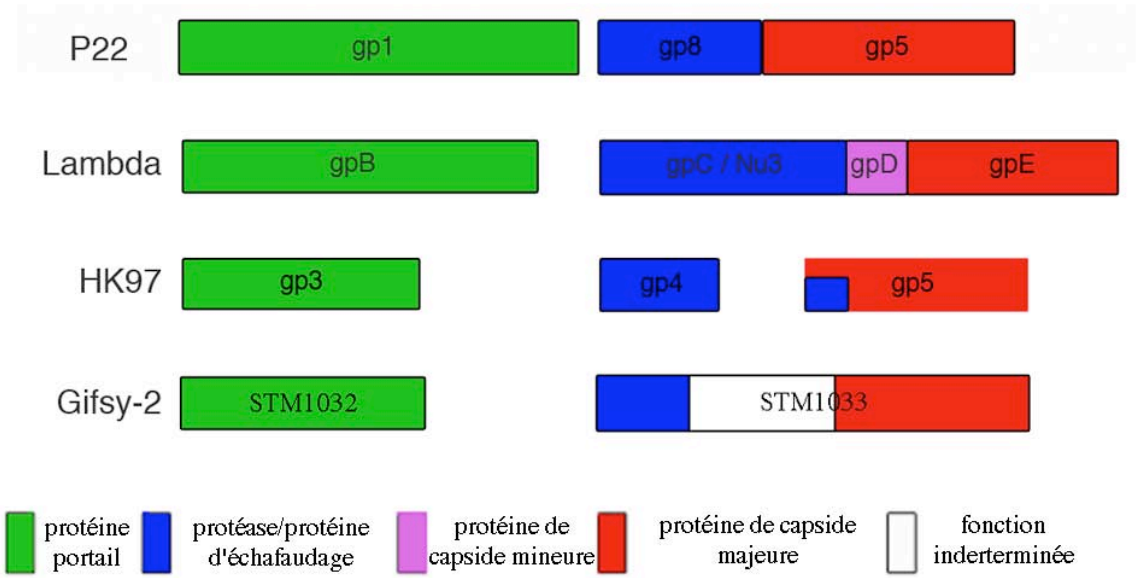


Figure 15 – Représentation schématique de l'organisation des protéines structurales des phages P22, Lambda, HK97 et Gifsy-2 (toutes les barres sont mises à l'échelle par rapport à la protéine portail d'HK97 gp3, 424 acides aminés)

La protéine d'échafaudage comme la protéase sont des protéines difficiles à mettre en évidence lorsque l'on travaille avec le phage sauvage car ces 2 protéines sont éliminées au cours de l'assemblage de la capside et ne sont donc plus présentes chez la capside mature. Cependant, l'étude de mutants a montré l'importance de la protéine d'échafaudage pour la construction de la procapside et de la protéase pour la maturation de la procapside.

Pour Gifsy-2, le protocole de purification suivi a mené à une solution contenant différentes formes de capside correspondant à différents intermédiaires dans le processus d'assemblage. En particulier, deux formes de procapsides sont distinguables à l'oeil nu étant donné que l'une d'elles est plus foncée, dense. La quantité des procapsides denses en solution a toujours été très faible à comparer des procapsides « vides », mais cette quantité est restée constante avec le temps indiquant que ce type de procapside est stable. Nous pensons que

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

parmi tous les types de capside en solution, les procapsides partiellement pleines sont chronologiquement l'état venant en premier. La reconstruction 3D obtenue montre clairement que des protéines internes sont associées à certaines protéines de capside suggérant que ces densités tiennent le rôle des protéines d'échafaudage décrites chez la majorité des phages à queue et qui sont associées à la construction des procapsides de phage. La répartition non uniforme de ces densités fait penser à la situation observée chez d'autres phages tel P22. Gp8, la protéine d'échafaudage de P22 s'attache sur des trimères internes situés autour des axes d'ordre 5 et des axes d'ordre 2. Mais elle ne s'attache pas au niveau des trimères situés sur les axes d'ordre 3 stricts (Thuman-Commike et al., 1999, 2000) tout comme les densités observées chez Gifsy-2. Les données disponibles actuellement ne sont cependant pas suffisantes pour identifier les sous unités en interaction avec ces structures internes et ce point particulier sera examiné dans de futures analyses (cf. perspectives).

En se basant sur les nombreux résultats montrant que l'élimination des structures internes aux procapsides est une étape nécessaire pour l'expansion procapside/capside, les autres formes de procapside, qui apparaissent « vides », seraient alors à un stade plus avancé de maturation.

Le fait que seulement certaines procapsides subissent une expansion lors du stockage indique aussi que la population de procapsides vides n'est pas totalement homogène. Une hypothèse est que seules les procapsides ayant perdues suffisamment de leurs protéines internes soient capables d'une expansion spontanée et efficace en solution. Ceci implique que chez Gifsy-2, le facteur limitant expliquant l'obtention de toutes ces formes intermédiaires à partir du virus sauvage, serait la protéase qui est généralement la protéine impliquée dans la modification et/ou la dégradation des protéines internes et des protéines de capside majeures.

D. Perspectives

Il semble donc bien que chez Gifsy-2 les fonctions tenues par la protéase, la protéine d'échafaudage et les protéines de capside mineure et majeure soient toutes exprimées au sein du même gène. Cette situation où la quasi totalité des protéines nécessaires à l'assemblage de la capside sont codées à partir d'un même gène n'est pas unique à Gifsy-2 puisque plusieurs prophages identifiés dans des génomes de bactéries semblent aussi posséder ce gène unique. Ainsi, les protéines putatives des phages CP-933K (NP_286515) d'*E.Coli* O157 : H7 et Fels-1

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

(NP_45889) de *Salmonella Typhimurium* LT2 sont respectivement à 69% (sur 668 résidus) et 72% (sur 713 résidus) identiques à la protéine traduite du gène STM 1033 de Gifsy-2.

Durant mon stage de DEA, je m'étais également intéressé à la capside du phage Fels-1. La reconstruction obtenue pour la capside mature de Fels-1 avait montré que celui-ci et Gifsy-2 formaient des capsides d'une taille similaire possédant toutes les deux une géométrie T=7. Dans les deux cas, des densités supplémentaires au niveau des axes d'ordre 3 étaient présentes en surface. Étant donné les fortes similarités de séquences entre ces deux phages et que la procapside de Gifsy-2 ne possédait pas ces densités, nous en avions conclu que Gifsy-2 et Fels-1 possédaient une seconde protéine de capside mineure.

Sur les échantillons observés durant mon DEA, ceux correspondant à Fels-1 contenaient essentiellement des capsides matures et pas de procapsides contrairement à Gifsy-2 où une quantité importante de procapsides était observée. Cette constatation nous avait amené à poursuivre seulement dans l'analyse en cryo-microscopie électronique de Gifsy-2 présentée dans ce mémoire. Les résultats obtenus ont effectivement permis de mieux comprendre à la fois la structure de la procapside et de la capside de Gifsy-2 et de mettre en évidence 2 autres états intermédiaires que sont la procapside pleine et maturée.

Cependant, à l'heure actuelle, il est impossible de dire si les différentes fonctions (protéase, protéine d'échafaudage et les protéines de capside majeure et mineure) contenues au sein du même gène sont exprimées indépendamment ou en une ou plusieurs protéines qui sont modifiées au fur et à mesure de l'avancement de l'assemblage de la capside.

Aussi, il serait intéressant dans le future d'éclaircir cette situation. En premier lieu, les données relatives au génome de Gifsy-2 sont contenues dans la souche LT2 de *Salmonella Typhimurium*. Or, il apparaît que Gifsy-2 n'est pas un prophage actif dans cette souche (Figueroa-Bossi et al., 1997). Il serait donc intéressant de vérifier la séquence nucléotidique de la région codant pour les protéines de capside de Gifsy-2 dans la souche ATCC14028. Par ailleurs, le génome complet de la souche SL1344 de *Salmonella Typhimurium* est en cours de finition de séquençage. Il a été montré que Gifsy-2 est un virus actif dans cette souche (Figueroa-Bossi & Bossi, 1999). Or, la comparaison du gène STM1033 contenu dans la souche LT2 est 100 % homologue à une séquence nucléotidique du génome de SL1344 attestant que Gifsy-2 n'est pas inactif chez LT2 à cause de mutations présentes dans le gène STM1033.

Une méthode envisageable afin d'identifier les protéines impliquées dans l'assemblage de Gifsy-2 serait tout d'abord de purifier le phage complet (et non les procapsides) et d'identifier les protéines le composant, notamment la protéine de capside mineure.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Ensuite, une compréhension fine des protéines impliquées dans la construction et la maturation des procapsides passent par la caractérisation de mutants dans le gène STM1033. Notamment, des mutations introduites en N-terminal au niveau de la fonction protéase prédite devraient fournir des phénotypes intéressants à caractériser et qui pourraient éventuellement être comparés aux résultats obtenus avec les procapsides pleines dans cette étude.

IV. Matériels et méthodes pour la microscopie électronique - Reconstruction tridimensionnelle d'objets biologiques par microscopie électronique en transmission

Les protocoles et méthodes décrites ci-dessous ont été utilisés à la fois pour les reconstructions des capsides à symétrie icosaédrique du phage Gifsy-2 et T5. Toute spécificité dans l'analyse d'image propre à l'un ou l'autre des 2 projets est décrite dans les parties « matériel et méthode » de chaque projet (page 83 pour Gifsy-2 et page 121 pour T5)

A. Préparation des échantillons

1. La coloration négative

Environ 2 µl d'échantillon est introduit par capillarité entre une fine de couche de carbone (préalablement déposée par évaporation) et une feuille de mica. Le tout est ensuite plongé délicatement dans un puit contenant le colorant de manière à ce que la feuille de mica se sépare du carbone sur lequel sont fixées les particules à observer. Ensuite, une grille en cuivre (3.05 mm de diamètre, maillage de 400 trous carrés, AGAR Scientific) est déposée sur le carbone flottant et le tout est récupéré par absorption à l'aide d'un petit bout de papier journal. Une fois la grille sèche, elle peut être observée avec le microscope Philips CM12 qui est dédié à la coloration négative au LMES. Différents types de colorants peuvent être utilisés. Pour regarder des bactériophages, l'acétate d'uranyle (2% v/v) donne en général le meilleur contraste alors que le molybdate d'ammonium (1% v/v) offre un contraste légèrement plus faible mais une meilleure préservation de la forme des particules.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

2. La cryo-microscopie électronique

a. Préparation des membranes à trou

Le but est d'obtenir une grille de cuivre recouverte d'une fine couche de carbone troué. Et ce sont ensuite ces trous contenant l'échantillon congelé qui seront observés au microscope. Le protocole utilisé au LMES pour la préparation des grilles est le suivant :

- Une solution de chloroforme à 0.5% (w/v) en Formvar est préparée.
- Une vingtaine de gouttes de glycérol (50% v/v) sont ajoutées à la solution de Formvar à 0.5% et les gouttes de glycérol sont cassées en microgouttelettes par sonication pendant 60 secondes. Enfin, des lames de verre sont immédiatement plongées dans le liquide.
- Une fois séché, le film plastique est séparé du verre par flottaison dans l'eau. Les grilles de cuivre sont déposées sur le film à la surface de l'eau et le tout est récupéré à l'aide d'un morceau de papier journal.
- L'ensemble grille/film plastique/papier journal est plongé dans du méthanol pendant 30 minutes pour éliminer le glycérol.
- Enfin, une couche de carbone est évaporée sur les grilles et le plastique est enlevé en plongeant les grilles 1minute dans du chloroforme

Une alternative à l'utilisation de ces grilles est d'acheter des grilles à trous type « quantifoil » (Quantifoil Micro Tools), l'avantage de ces grilles est d'avoir une répartition uniforme de trous sur le carbone (typiquement des trous de 2 μm de diamètre avec 1 μm entre les bords de chaque trou).

b. Congélation des grilles

La grille à congeler est placée à l'extrémité d'un système de guillotine à l'aplomb du puit contenant l'éthane liquide. 2 à 4 μl d'échantillon sont déposés sur la grille et l'excès de liquide est éliminé avec un papier filtre juste avant que la grille soit plongée dans l'éthane liquide. Le temps de contact du papier filtre avec la grille et à un degré moindre le temps d'évaporation juste avant la congélation de la grille sont cruciaux pour obtenir une épaisseur de glace vitreuse suffisamment fine. L'excès d'éthane liquide est ensuite enlevé à l'aide de papiers filtre. La grille est enfin installée sur le porte échantillon qui est lui-même introduit

dans le microscope. Toutes ces étapes de transfert se font sous atmosphère d'azote à basse température et les inévitables passages à température ambiante entre les transferts doivent être minimisés de manière à ne pas former trop de glace cristalline.

B. Prise d'images en microscopie électronique en transmission

Une fois l'échantillon introduit dans le microscope et avant de commencer à prendre des photos, certains réglages doivent être faits pour optimiser les conditions de prise d'images :

- Réglage de la position eucentrique de l'objet afin de placer l'axe de rotation du porte échantillon à la même hauteur que la zone à photographier. Celle-ci correspond aussi aux conditions dans lesquelles le grossissement du microscope a été calibré.
- Alignement du canon à électrons pour obtenir la meilleure illumination
- Correction de l'astigmatisme des lentilles condenseur et objectif

La recherche d'une zone intéressante se fait à faible grossissement (x3400) et le point de focalisation se fait sur une zone adjacente à celle qui est à imager (à 4-5 μm de distance) à fort grossissement (x27500 ou x38000). Enfin, la sous focalisation est réglée et s'il n'y a pas de dérive, la première image la moins sous focalisée est prise (x27500 ou x38000) ainsi que la seconde après avoir augmentée la sous focalisation (paire focale).

Les images ainsi enregistrées sur des plans films (KODAK electron image film, 8,3 * 10,2 cm) sont développés en chambre noire en les passant successivement dans du révélateur (KODAK D19, 12 min) puis du fixateur (KODAK, 4-5 min) et en les rinçant 20 min à l'eau.

C. Sélection des micrographies et numérisation

Les plans films développés et séchés sont sélectionnés qualitativement suivant différents critères comme la concentration, la pureté, la présence de cristaux de glace, le chevauchement des particules, le contraste. L'intensité transmise à haute résolution, l'astigmatisme, la sous focalisation et la dérive éventuelle lors de la prise d'image sont appréciés plus précisément en observant la transformée de Fourier en temps réel des plans films.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Les micrographies ainsi sélectionnées sont ensuite numérisées avec un scanneur Zeiss PhotoScan TD à un pas de 7 ou 14 μm ce qui représente un échantillonnage nominal de l'image de respectivement 1.84 ou 3.68 Å/pixel pour un grandissement de 38000.

D. Analyse des données enregistrées en microscopie électronique en transmission

1. Sélection des particules

La sélection manuelle des meilleures particules se fait sous le logiciel **x3d** (Conway et al., 1999). Celles-ci sont sélectionnées suivant des critères visuels (forme, état d'endommagement...). À cette étape, une première estimation des dimensions des particules est nécessaire pour définir l'aire de sélection et de masquage et ne pas inclure trop de bruit de fond autour des phages ou pour au contraire ne pas perdre de l'information en imposant une sélection trop petite.

Le résultat final de la sélection est sauvegardé dans un fichier de sortie où entre autres, les pixels anormalement brillants ou foncés sont éliminés (poussière), un gradient linéaire est calculé pour passer de la particule à l'arrière-plan, les particules voisines et trop proches sont masquées et, la moyenne et la variance sur les pixels de la sélection sont normalisées.

2. Spectre de puissance et calcul de la sous focalisation

Pour chaque particule sélectionnée à partir d'une même micrographie, un spectre de puissance est calculé puis ces spectres sont moyennés en amplitude afin d'augmenter le signal (programme **SumPS**, Conway et al., 1999). Ce spectre permet une nouvelle estimation de la qualité de l'image de départ (figure 1). Sur le spectre de puissance ci-dessous, il y a une alternance d'anneaux clairs et sombres, les anneaux clairs correspondant au signal transmis et les anneaux sombres aux positions des inversions de phase de la CTF (aucune information transmise). Aussi, un anneau incomplet témoigne d'une légère dérive du porte échantillon lors de la prise d'image, un anneau ovale témoigne un problème d'astigmatisme.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

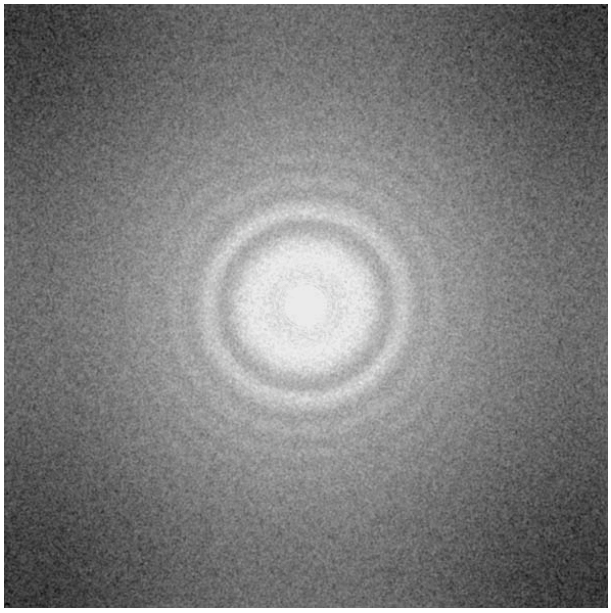


Figure 1 – Spectre de puissance d'une micrographie du phage T5

À partir de ce spectre de puissance calculé pour chaque micrographie, différents paramètres liés aux réglages du microscope lors de la prise de l'image sont déterminés. Il est tout particulièrement important de connaître précisément la valeur de la sous focalisation. Celle-ci est fonction de la CTF qui représente l'amplitude et la phase du signal transmis en fonction de la fréquence spatiale.

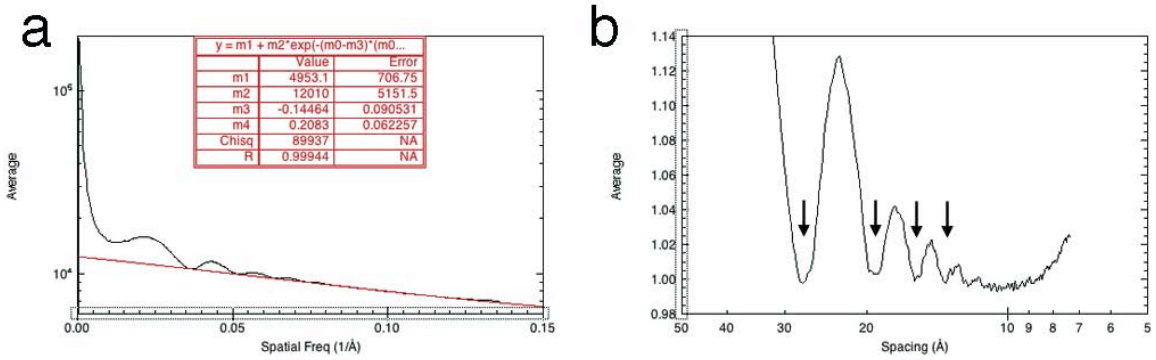


Figure 2 – Graphique de gauche Amplitude du signal (échelle log) en fonction de la fréquence spatiale (CTF, courbe noire) avec en rouge le fit gaussien sur ces minimums et les paramètres le décrivant dans l'encadré rouge

Graphique de droite : moyenne des amplitudes divisée par le fit gaussien en fonction de la résolution. Les zéros de la CTF, correspondant aux minimums locaux sur ce graphique (flèches), sont plus précisément mesurables que sur le graphique de gauche.

L'atténuation du signal de la CTF est modélisée par une courbe gaussienne dont les paramètres sont calculés à partir de la sélection des minima de la courbe spectrale (figure 2a).

Ensuite, les minimas correspondant aux zéros de la CTF sont mesurés à partir de la courbe déconvoluée (figure 2b). Enfin, à partir de la mesure des zéros de la CTF, du contraste d'amplitude, de la tension d'accélération et du coefficient d'aberration sphérique (programme **ctfzeros**, Conway et al., 1999), la sous focalisation est calculée.

3. Correction de la fonction de transfert de contraste

De manière à corriger les effets de la CTF dans les transformées de Fourier des images, les inversions de phases entraînant une alternance du contraste doivent être rectifiées et les amplitudes doivent être restaurées de manière à ce qu'elles aient des valeurs les plus proches possibles de celles qu'elles auraient eues en l'absence de CTF (programme **ctfmix**, Conway et al., 1999).

a. Inversion de phase

La première correction est appliquée à chaque particule de chaque paire focale (figure 3a-b) et consiste en une inversion des phases de la CTF. L'amélioration du contraste dans les images ci-dessous (figure 3c-d) est le résultat d'un filtre appliqué pour éliminer les données à haute fréquence (qui sont essentiellement du bruit) et de re-normalisations de l'intensité des images. Dans l'exemple ci-dessous, le filtre est limité à 16.0 Å (± 0.5 Å).
Ces images sont utilisées à la place des images brutes pour déterminer l'origine (et les orientations) initiale de chaque particule.

b. Combinaison de paire focale

Une fois le centre de chaque particule déterminé, les images d'une même paire focale sont combinées pour obtenir une seule image en utilisant l'angle existant entre les 2 micrographies qui provient de la façon dont les films sont placés sur la vitre du scanneur. Le bénéfice de cette approche est de combler les fréquences spatiales peu ou pas représentées dans une image par l'information correspondante de l'autre image. De plus, en moyennant deux images en une seule, le rapport signal sur bruit est amélioré. La combinaison des deux images se fait de deux manières différentes suivant le type de correction de CTF :

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

- Dans un premier cas (figure 3e), les phases de la CTF de chaque image de la paire focale sont inversées (cf. section 4.4.1.). L'image combinée obtenue est ensuite utilisée pour l'affinement des paramètres d'orientations des particules.
- Dans le second cas (figure 3f), l'atténuation du signal aux hautes fréquences spatiales est compensée en appliquant à la CTF les paramètres gaussiens modélisant la décroissance du signal. Les images sont ensuite corrigées des effets de cette CTF déconvoluée.

  L'image combinée obtenue est beaucoup plus bruitée du fait de la déconvolution qui augmente toutes les composantes, notamment à haute résolution, le signal comme le bruit. Cependant, cette image représente de manière plus juste la densité projetée et elle est utilisée pour le calcul des reconstructions seulement.

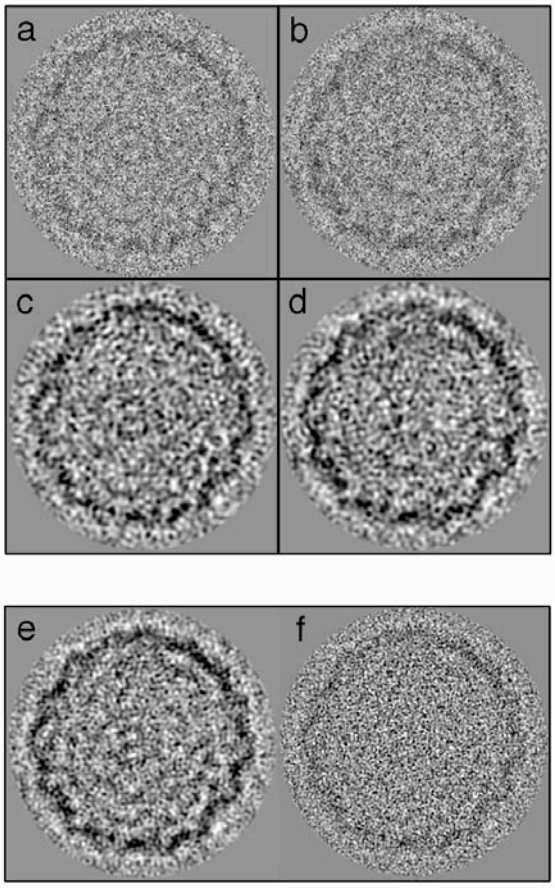


Figure 3 – Exemple de particules extraites d'une micrographie et illustrations de l'effet des différentes corrections de CTF sur une paire focale de procapside du phage Gifsy-2. a – Particule brute la plus proche de la focalisation. b – Particule brute la plus sous focalisée. c – d Particules a et b respectivement après inversion des phases de la CTF et filtre passe bas. e – f Combinaison de la paire focale avec inversion des phases de la CTF seulement (e) et avec une déconvolution du signal (f).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

4. Détermination des paramètres d'orientation de chaque particule

La méthode de reconstruction en microscopie électronique produit une structure tridimensionnelle en combinant les différentes particules extraites de micrographies qui sont des vues distinctes de la même structure. La détermination de cette structure se fait en trois étapes fondamentales (Baker et al., 1999) :

- Détermination des premiers paramètres d'orientation et d'origine pour chaque particule
- Affinement de ces paramètres par comparaison avec les différentes reprojections d'un premier modèle
- Combinaison d'un nombre suffisant de particules possédant des vues distinctes pour produire la reconstruction finale

Ces trois étapes sont d'autant plus « facilitées » que la symétrie interne de l'objet étudié est importante. Des particules symétriques, orientées aléatoirement peuvent être analysées pour produire une reconstruction tridimensionnelle en déterminant la position relative de leurs éléments de symétrie. La méthode est d'autant plus puissante dans le cas d'objet à symétrie icosaédrique où le haut degré de symétrie facilite la détermination de la position des éléments de symétrie dans chaque image et réduit le nombre d'images nécessaires pour calculer une structure tridimensionnelle à une résolution donnée (Fuller et al., 1996).

Lors d'une reconstruction d'un objet à symétrie icosaédrique, 5 paramètres doivent être déterminés pour chaque particule : 3 angles définissant l'orientation sous laquelle la particule est vue (θ, ϕ, ω) et 2 coordonnées (x, y) définissant le centre de la particule où se croise tous les axes de symétrie. La redondance de 60 due à la symétrie icosaédrique fait que n'importe quelle vue est décrite au sein de l'unité asymétrique définit par deux axes de symétrie d'ordre 5 voisins ($\theta = 90.0°$ et $\phi \pm 31.72°$) et un axe d'ordre 3 voisin, situé au centre d'une face ($\theta = 69.09°$ et $\phi = 0.0°$) (figure 4).

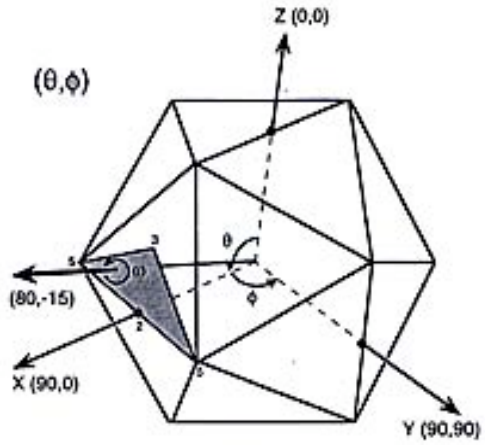


Figure 4 – Schéma du repère standard utilisé pour définir les orientations d'une particule à symétrie icosaédrique. Les 3 axes X, Y et Z coïncident avec 3 axes de symétrie d'ordre 2 perpendiculaires. La direction d'une vue est définie par les angles θ et ϕ (la direction 80°, -15° est illustrée) et la rotation de l'icosaèdre autour de cette vue est définie par l'angle ω (Baker et al., 1999)

a. Méthode des lignes communes (Fuller et al., 1996)

Dans l'espace de Fourier, si on applique à la transformée de Fourier d'une projection 2D une opération de symétrie puis son inverse (autour d'un axe de symétrie), on génère deux nouvelles transformées de Fourier 2D identiques à la première. Les plans symétriques croisent le plan de départ le long de 2 lignes communes. Une paire de ligne commune est ainsi générée et ces lignes possèdent des valeurs identiques en phase et en amplitude (Crowther, 1970).

En considérant tous les éléments de symétrie d'un icosaèdre, toute projection d'un objet icosaédrique (dont l'orientation n'est pas selon un axe de symétrie) possède 37 paires de lignes communes : chacun des 6 axes d'ordre 5 donne 2 paires ($2\pi/5$, $-2\pi/5$ et $4\pi/5$ et $-4\pi/5$), chacun des 10 axes d'ordre 3 donne 1 paire ($2\pi/3$, $-2\pi/3$) et chacun des 15 axes d'ordre 2 donne 1 paire (π, $-\pi$). Si l'objet possède une symétrie icosaédrique parfaite, la recherche de la bonne orientation pour une projection donnée consiste à calculer la somme des résiduels de phase le long des 37 paires de lignes communes pour toutes les orientations (θ et ϕ) possibles de l'unité asymétrique par pas de 1°. L'orientation donnant le plus petit résiduel de phase est prise comme la plus probable.

Une fois les orientations de plusieurs particules différentes déterminées, celles-ci sont comparées pour juger de la consistance de l'ensemble des orientations trouvées par la méthode des lignes communes croisées. Les projections d'un même objet sous des orientations différentes se coupent dans l'espace de Fourier selon une ligne commune passant

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

par l'origine (théorème des sections centrales). 59 autres intersections sont générées par symétrie icosaédrique ce qui donne 60 paires de lignes qui devraient avoir des valeurs similaires dans les deux transformées. Les différences entre les paires de lignes permettent d'apprécier jusqu'à quel degré les 2 transformés représentent le même objet. Lorsque cette comparaison est étendue à d'autres particules, celles présentant le plus de différence sont rejetées de manière à ne conserver que les particules cohérentes entre elles. Ces particules permettent d'obtenir un premier modèle qui sera amélioré ou rejeté en utilisant la méthode basée sur la reprojection d'un modèle.

b. Méthode basée sur la reprojection d'un modèle

Lorsqu'un premier modèle tridimensionnel est disponible, il est utilisé pour aider à l'identification et à l'affinement des orientations de chaque image. La méthode consiste à calculer l'ensemble des projections du modèle au sein de l'unité asymétrique selon un certain pas angulaire (1° par exemple) et de les comparer avec les images dont la CTF a été corrigée en utilisant des transformées de Fourier polaires (Polar Fourier Transform, Baker & Cheng, 1996). Le modèle de départ peut être soit une reconstruction obtenue par la méthode des lignes communes, soit la reconstruction d'un virus similaire ou soit un premier modèle obtenu par coloration négative par exemple.

Une base de données contenant les PFT des projections 2D du modèle est générée et ces PFT sont corrélées avec celles des images du virus étudié. Ainsi, cette méthode facilite la détermination et l'affinement des orientations des particules sélectionnées, du moment que le modèle utilisé n'est pas trop éloigné, au niveau de sa structure, du virus étudié.

Le programme employé s'appelle **EMPFT** (et son successeur **PFT2**), il calcule l'orientation (θ, ϕ, ω : angles d'Euler) sous laquelle chaque particule est vue sur l'image 2D ainsi que son origine (x, y).

La première étape consiste à estimer l'origine de chaque particule d'une image en déterminant la corrélation la plus forte entre l'image et la moyenne circulaire de la somme des projections du modèle en parcourant toutes les orientations possibles à l'intérieur d'une unité asymétrique. Ensuite, θ et $|\phi|$ sont déterminés en comparant les images aux projections du modèle. L'ambiguïté sur le signe de ϕ revient à connaître la main *dextro* ou *laevo* du virus. Le signe de ϕ et l'angle ω sont calculés en utilisant un algorithme qui compare chaque image avec la projection du modèle qui correspond le mieux et son énantiomère ((θ, ϕ et (θ, -ϕ).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Au fil des cycles d'affinement, de nouvelles particules sont incluses et progressivement le modèle reprojeté est amélioré en calculant des reconstructions à partir des particules présentant les meilleurs coefficients de corrélation. Les orientations sont réévaluées à chaque cycle avec une précision de plus en plus fine permettant le calcul d'un nouveau modèle à plus haute résolution.

De plus, cette méthode d'affinement suivant un modèle permet de déterminer le facteur d'échelle relatif de chaque image. En effet, le grandissement varie entre et au sein des images et sa correction est importante pour extraire la plus haute résolution possible des données.

5. Calcul de la reconstruction

Le programme utilisé dans cette partie s'appelle **EM3DR** (et son successeur **EM3DR2**), il permet de passer d'une représentation dans l'espace de Fourier à une représentation tridimensionnelle de l'objet dans l'espace direct.

L'espace de Fourier est représenté en coordonnées polaires cylindriques (figure 5):

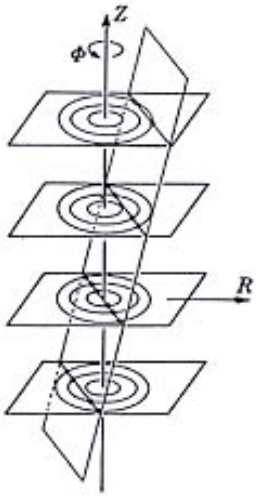


Figure 5 – Système de coordonnées polaires cylindriques décrivant l'espace de Fourier en une succession de plans (Z constant) contenant des anneaux de rayon R. L'axe Z coïncide avec un axe icosaédrique d'ordre 5 (Crowther, 1970).

On voit sur ce schéma comment un plan correspondant à une image 2D correctement orientée coupe l'espace de Fourier en différents points. En ces points, la transformée de Fourier (Fj) est connue.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

$$F_j = \sum_n B_{jn} G_n$$ avec Gn : coefficient de Fourier-Bessel

$$B_{jn} = \exp\left(in(\Phi_j + \tfrac{1}{2}\pi)\right)$$

En combinant toutes les images d'orientation connue et en appliquant les éléments de symétrie, em3dr peut ainsi résoudre les équations normales (sous forme de matrices) pour un Z et un R donné pour extraire tous les G_n (R, Z). La distribution de l'inverse des valeurs propres est un bon indicatif assurant que l'échantillonnage de l'espace de Fourier est suffisant et que le nombre d'interpolation autour d'un point d'échantillonnage est réduit (c'est-à-dire qu'on n'effectue pas une reconstruction à une résolution trop haute par rapport au nombre de particules et à leur qualité). Ainsi, avant de faire une reconstruction, il est important d'uniquement sélectionner les meilleures particules, celles qui présentent les meilleurs coefficients de corrélation (la limite de sélection étant la moyenne ou la moyenne moins une déviation standard)

Ensuite, à partir des G_n (R, Z), les g_n (r, Z) sont calculés par la relation suivante

$$g_n(r, Z) = \int_0^\infty G_n(R, Z) J_n(2\pi Rr) 2\pi R dR$$

Et enfin, par transformation de Fourier – Bessel inverse et par application des symétries icosaédriques la carte de densité 3D est produite :

$$\rho(r, \phi, z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} g_n(r, Z) \exp(in\phi) \exp(2\pi i z Z) dZ$$

6. Détermination de la résolution

La résolution d'une reconstruction est déterminée en calculant 2 reconstructions indépendantes en divisant en 2 groupes et de manière aléatoire les particules sélectionnées. Ces 2 reconstructions sont ensuite comparées dans l'espace de Fourier en calculant les corrélations entre des séries de coquilles concentriques de la transformée 3D de chaque modèle (Fourier Shell Correlation, FSC ; Saxton et Baumeister, 1982).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

$$\mathbf{FSC} = \frac{\sum(\mathbf{F_1}.\mathbf{F_2}^*)}{\sqrt{(|\mathbf{F_1}|)^2.(|\mathbf{F_2}|)^2}}$$

où F_1 et F_2 sont les facteurs de structure des 2 reconstructions

Les FSC sont calculées en fonction de la fréquence spatiale à l'aide du programme **bresolve** (Heymann, 2001). La résolution du modèle est atteinte lorsque la corrélation entre les 2 reconstructions tombe en dessous de 30%.

V. Matériels et méthodes concernant Gifsy-2

A. Souches bactériennes

Deux souches différentes de *Salmonella Typhimurium* ATCC14028 sont utilisées pour produire les bactériophages. Ces deux souches possèdent une mutation sur le gène galE qui code pour une protéine nécessaire à la synthèse des antigènes O des lipopolysaccharides de la membrane externe. Gifsy-2 croit bien mieux sur des mutants $GalE^-$ car Ompc, le récepteur membranaire de Gifsy-2 est partiellement bloqué par les antigènes O chez les souches sauvages (Ho & Slauch, 2001).

La première souche utilisée est la souche donneuse MA7599 (gifsy-1 [-] gifsy-2 [+] gifsy-3 [-]) qui libère par induction des phages Gifsy-2 (10^4 ph/mL). La seconde souche est la souche réceptrice MA6710 (gifsy-1 [-] gifsy-2 [-] gifsy-3 [-]) qui est non immune aux phages Gifsy-2 et qui, de ce fait, produit et amplifie les particules. Les phages Gifsy-1 et Gifsy-3, présents dans la souche sauvage, se multiplient plus facilement et aux dépens de Gifsy-2 (Figueroa-Bossi & Bossi, 1999). Ils ont donc été enlevés afin de pouvoir réaliser plusieurs cultures successives tout en évitant un phénomène de contamination.

Toutes les cultures de bactéries se font dans le milieu LB à 30°C sans agitation. À mois que ce soit précisé, le tampon utilisé pour diluer, solubiliser les culots et pour la centrifugation sur gradient de sucrose est un tampon de type λ (10 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 10 mM $MgSO_4$) (Dockland et al., 1993). Les deux souches ont été obtenues auprès de Nara Figueroa-Bossi et Lionello Bossi du Centre de Génétique Moléculaire à Gif-Sur-Yvette (France) lors d'un séjour dans leur laboratoire.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

B. Production et purification des capsides de bactériophage

Après une culture toute la nuit des deux souches MA7599 et MA6710 (10^9 bactéries/mL), 100 µl du surnageant de MA7599 contenant 10^4 ph/mL (9000 rpm, 5-10 min) est mélangé à 100 µl de la souche MA6710 diluée 10000x (multiplicité d'infection (m.o.i.) égale 1). Après une nuit de culture, les bactéries ont lysé et libéré les phages (10^7 ph/mL). La même opération et répétée à une m.o.i. de 1 dans 30mL puis 1L. Le titre de la solution atteint alors 10^8 ph/mL.

Le lysat est ensuite purifié par une méthode proche de celle décrite par Yamamoto et al (1970) pour le bactériophage λ. Le lysat est tout d'abord traité par l'ajout de DNAase à 1 µl/mL pendant 30 min à température ambiante et en agitant. Ensuite, du NaCl est ajouté jusqu'à une concentration finale de 1M en agitant et le tout est laissé 1h sur glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 8500 rpm pendant 25-30 min (Beckman JA-10) jusqu'à ce que le surnageant soit clarifié. Ensuite, les phages sont récupérés directement par centrifugation à 18000 rpm pendant 2h (Beckman JA-20) ou sujets à une précipitation toute la nuit à 4°C par ajout de PEG 8000 (10% w/v). Le précipité est récupéré le lendemain par centrifugation à 8500 rpm pendant 30-40 min (JA-10). Pour les deux méthodes, les culots obtenus sont délicatement solubilisés à 4°C toute la nuit dans du tampon frais. Si nécessaire, la solution est concentrée par ultra centrifugation à 30000 rpm pendant 2h (rotor TLS-55) afin d'obtenir un volume approprié pour la centrifugation sur gradient de sucrose (15 – 30% en sucrose) pendant 4h à 25000 rpm (rotor SW40) (Thuman-Commike et al., 1999). La (ou les) fraction(s) pure(s) est récupérée(s) et identifiée(s) sur gel SDS et surtout par coloration négative à l'aide d'un microscope électronique en transmission. Les fractions impures sont regroupées et chargées sur un second gradient de sucrose. Les fractions pures contenant essentiellement des procapsides sont regroupées, dialysées contre un nouveau tampon (50mM Tris-HCl (pH = 7.6), 100 mM $MgCl_2$) et concentrées par Centricon (100kDa) pour le stockage. La pureté et la concentration finale sont jugées en coloration négative avant d'être analysées en cryo-microscopie électronique.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

C. Gel acrylamide en condition dénaturante

Les gels utilisés sont des gels pré coulés à 15 % en acrylamide (12 puits, 20 µl/puit) (Bio-Rad). Les gels migrent dans une cellule Mini_PROTEAN (Bio-Rad) suivant les conditions spécifiées par Bio-rad qui correspondent à la méthode standard décrite par Laemmli (1970).

Pour le séquençage N-terminale, les bandes sont transférées sur une membrane en PVDF (Millipore Immobilon PSQ) à température ambiante dans un tampon CAPS (10 mM CAPS (pH = 11), 10% (v/v) méthanol) pendant 2h à 50V. La coloration de la membrane se fait pendant 1 min dans une solution contenant 0.1 % de bleu de Coomassie, 1% d'acide acétique et 40% méthanol, et la dé-coloration dans une solution à 50% méthanol jusqu'à ce que les bandes apparaissent clairement (5-10 min).

La détermination de la séquence des bandes visibles basée sur la dégradation d'Edman a été réalisée par J.P. Andrieu (Institut de Biologie Structurale, laboratoire d'Enzymologie Moléculaire).

D. Ajustement des modèles cristallographiques dans la densité électronique des reconstructions déterminées par microscopie électronique.

Les codes PDB des structures cristallographiques utilisées sont 1OHG pour la capside mature d'HK97, 1IFO pour la procapside d'HK97 et 1C5E pour la protéine GpD du phage Lambda.

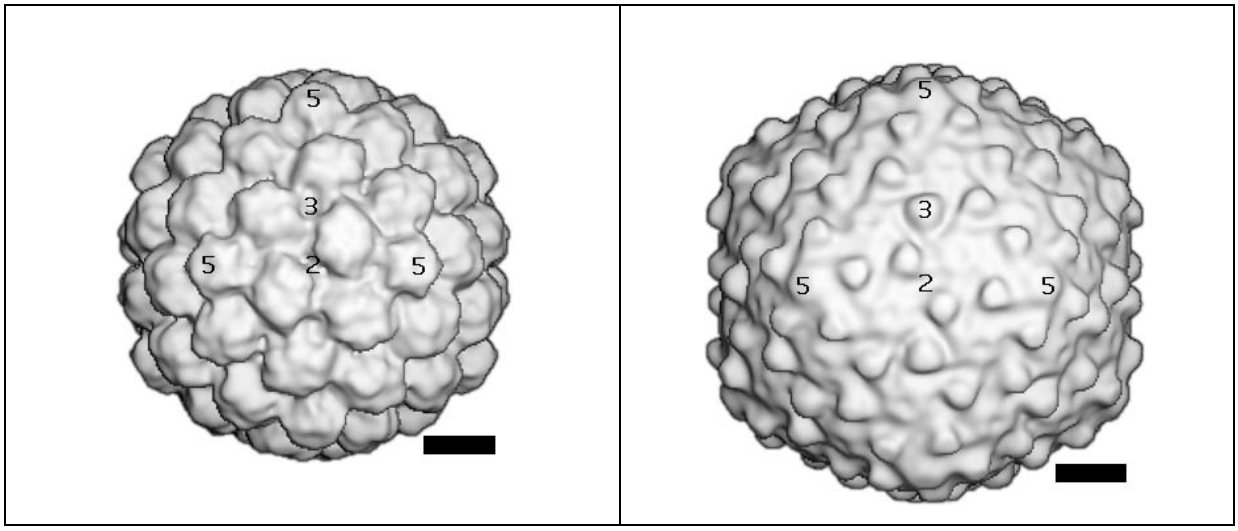
Dans un premier temps, la modélisation et le positionnement des structures à haute résolution dans la densité électronique à basse résolution s'est fait manuellement avec le programme O (Conway et al., 2001). Ensuite, l'affinement s'est fait avec l'ensemble de programme regroupés sous SITUS (Wriggers et al., 1999). La visualisation et les images présentées dans ce mémoire ont été réalisées avec le programme VMD (Humphrey et al., 1996).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

E. Microscopie électronique - Notes spécifiques à Gifsy-2

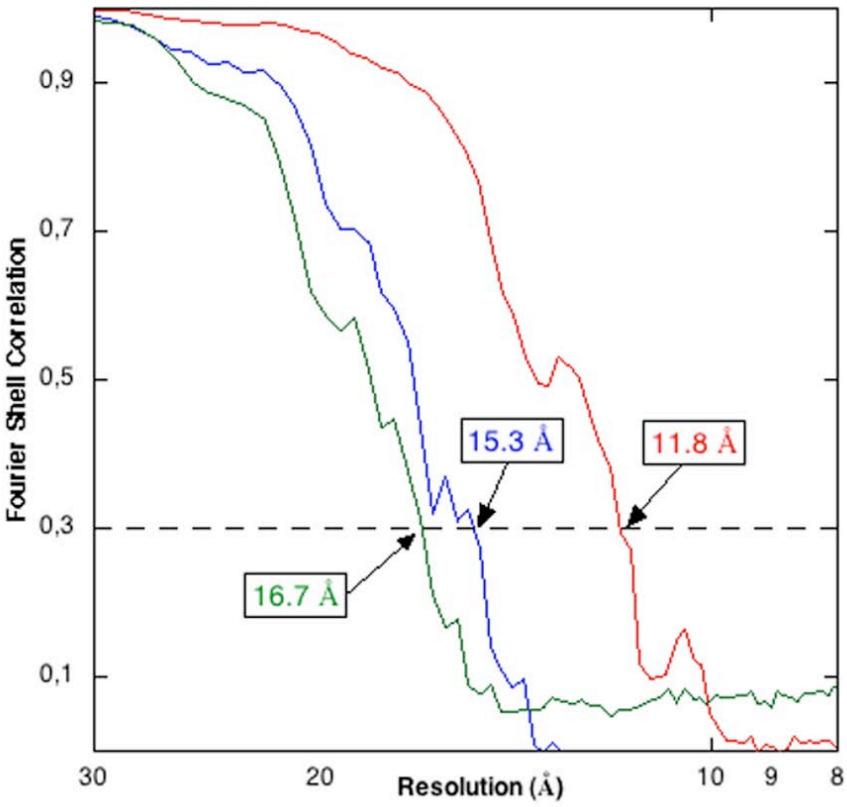
La méthode de reconstruction suit exactement ce qui est décrit dans la paragraphe « matériel et méthode pour la microscopie électronique ». Cependant, dans le cas de Gifsy-2, le modèle de départ utilisé pour obtenir une première estimation des paramètres d'orientation à l'aide du programme PFT était une reconstruction obtenue à partir d'images prises en coloration négative. Cette analyse d'image, faite durant mon stage de DEA, avait été réalisée à la fois sur la procapside et la capside mature de Gifsy-2.

Après mise à l'échelle, ces deux modèles ont été utilisés comme point de départ dans l'affinement des paramètres d'orientation des images prises en cryo-miroscopie électronique.



Carte de densité tridimensionnelle obtenue en coloration négative et utilisée comme modèle de départ en cryo-microscopie électronique– procapside (a) et capside mature (b)
Vue selon un axe icosaédrique d'ordre 2
(bar d'échelle : 100 Å)

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005



	Nombre de paires focales	Nombre de particules extraites	Nombre de particules utilisées dans la reconstruction finale
Procapside	51	12303	6200
Procapside maturée	49	5266	3281
Capside mature native	49	2706	1090

Figure 5 – Graphique représentant la résolution atteinte pour une FSC = 0.3 (ligne pointillée) pour la reconstruction des procapsides vides (rouge), des procapsides maturées (bleu) et les capsides matures vides (vert)

Tableau : informations sur le nombre de particules utilisés pour chaque reconstruction

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Le bactériophage T5 d'*E.Coli*

I. Introduction

Les recherches sur le bactériophage T5 commencent dès les années 1940 au moment où, à l'initiative de Max Delbrück, les travaux sur les phages aux Etats-Unis se concentrent principalement sur un genre de bactérie *E.Coli B* et sur 7 de ces phages lytiques arbitrairement nommés T1 → T7 (T = Type). Les études sur ces phages seront des éléments importants pour démontrer par exemple que l'ADN est le matériel génétique, que des virus peuvent coder pour des enzymes et que les ARN messagers servent d'intermédiaire dans l'expression des gènes.

Il apparaît rapidement que les phages T-paires (T2, T4 et T6) se ressemblent beaucoup d'un point de vue morphologique. Ils sont constitués d'une capside icosaédrique allongée à laquelle est accrochée une queue se contractant lors de l'injection de l'ADN dans la cellule (*Myoviridae*). Les phages T3 et T7 sont aussi apparentés et possèdent une capside à symétrie icosaédrique reliée à une queue courte et trapue (*Podoviridae*). Les phages T1 et T5 appartiennent, quant à eux, à la famille des *Siphoviridae* caractérisée par une capside icosaédrique attachée à une queue longue et non contractile.

Le bactériophage T5 n'a pas été le plus étudié des phages de la série T si on compare aux nombreux résultats obtenus, d'un point de vue génétique et structural, sur les phages T4 et T7. Cependant, trois génomes complets du phage T5 ont récemment été déposés (codes NCBI AY587007, AY692264 et AY543070) offrant un support indispensable à des études plus approfondies. T5 possède aussi quelques caractéristiques inhabituelles tel un génome de grande taille (121,750 bp) comparé à d'autres *Siphoviridae*, contenant des interruptions de linéarité sur l'un de ces deux brins à des positions génétiquement identifiées ainsi qu'un mécanisme d'éjection de l'ADN en 2 étapes (Letellier et al., 2004).

D'un point de vue morphologique, le bactériophage T5 est composé d'une capside à symétrie icosaédrique d'un diamètre d'environ 1000 Å qui est composée en majorité par la seule protéine de capside majeure pb8 et aussi par plusieurs protéines mineures dont la protéine de capside pb10 (Zweig & Cummings, 1973).

À l'un des sommets de la capside est attachée la queue composée d'un long tube à symétrie hélicoïdale d'environ 1700 Å de long (Guénebaut et al., 1997) et d'une partie distale servant à l'accrochage du phage à la bactérie. D'une manière similaire à d'autres bactériophages, T5

s'accroche de manière réversible à la surface de la bactérie par l'intermédiaire des ses 3 longues fibres en forme de L (pb1) (Heller et Braun, 1979) puis vient l'attachement irréversible au niveau du récepteur membranaire FhuA. Ce récepteur est reconnu par la protéine de queue pb5 située à l'extrémité du tube hélicoïdal composé par pb6 (Plancon et al., 2002). Puis la pointe, constituée par pb2, traverse la membrane bactérienne au voisinage de FhuA. Une étude par cryo-tomographie électronique a révélé un changement de forme de la pointe de la queue une fois la paroi bactérienne percée. Celle-ci est raccourcie de 500 à 230 Å alors que son diamètre passe de 20 à 40 Å créant ainsi un passage pour l'ADN viral qui est directement injecté dans le cytoplasme de la bactérie (Böhm et al., 2001).

Le bactériophage T5 a ainsi déjà été observé en cryo-microscopie électronique (Lambert et al., 2000) où les capsides apparaissent régulières et bien conservées. Cependant, d'un point de vue structural, peu de travaux ont été réalisés. La taille supérieure de la capside de T5 (environ 1000 Å), comparée à celles d'autres *Siphoviridae* tels HK97 ou Lambda, suggère une organisation différente des protéines au sein de la capside. De précédents résultats ont identifié pb8 comme la protéine de capside majeure et pb10 comme une protéine de capside mineure (Zweig et Cummings, 1973). Pb10 n'est pas indispensable pour l'obtention du virus infectieux étant donné qu'un mutant pb10(¯) est toujours capable de contenir l'ADN viral et d'infecter de nouvelles bactéries. Ces observations ajoutées à un ratio moléculaire de 1 pour 6 avec pb8 suggèrent que pb10 ait un rôle similaire à la protéine de capside mineure *hoc* du phage T4 (Saigo, 1978).

Par ailleurs, d'un point de vue général, l'organisation de la région du génome de T5 codant pour les protéines structurales est similaire à celle observée pour d'autres bactériophages tels T4 et HK97 (Hendrix et al., 1998) (figure 1). Ainsi, on retrouve successivement les gènes codant pour les petite et grande sous unité des terminases puis celui pour la protéine portail (pb7), la protéine de capside mineure (pb10), la protéase (pb11), la protéine de capside majeure (pb8) et enfin les gènes codant pour les protéines de queue. À première vue, une des particularités de T5 est qu'il ne possède pas de protéine d'échafaudage indépendante contrairement à la majorité des phages connus. Lorsqu'elle est présente, cette protéine guide efficacement la construction de la procapside des phages. Un autre point intéressant concerne la protéine de capside majeure (pb8) qui au cours du cycle d'assemblage de la capside est modifiée par protéolyse. Ainsi, les 159 premiers acides aminés de pb8 situés en N-terminale sont éliminés pour donner la protéine mature de 298 acides aminés au total constituant la capside finale de T5 (d'après Dr. Pascale Boulanger et Dr Lucienne Letellier, communication personnelle). Cette situation est similaire à celle observée pour le phage

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

HK97 où les 102 premiers acides aminés de la protéine de capside majeure gp5 sont éliminés par protéolyse donnant une forme mature de cette protéine contenant 282 résidus (Duda et al., 1995).

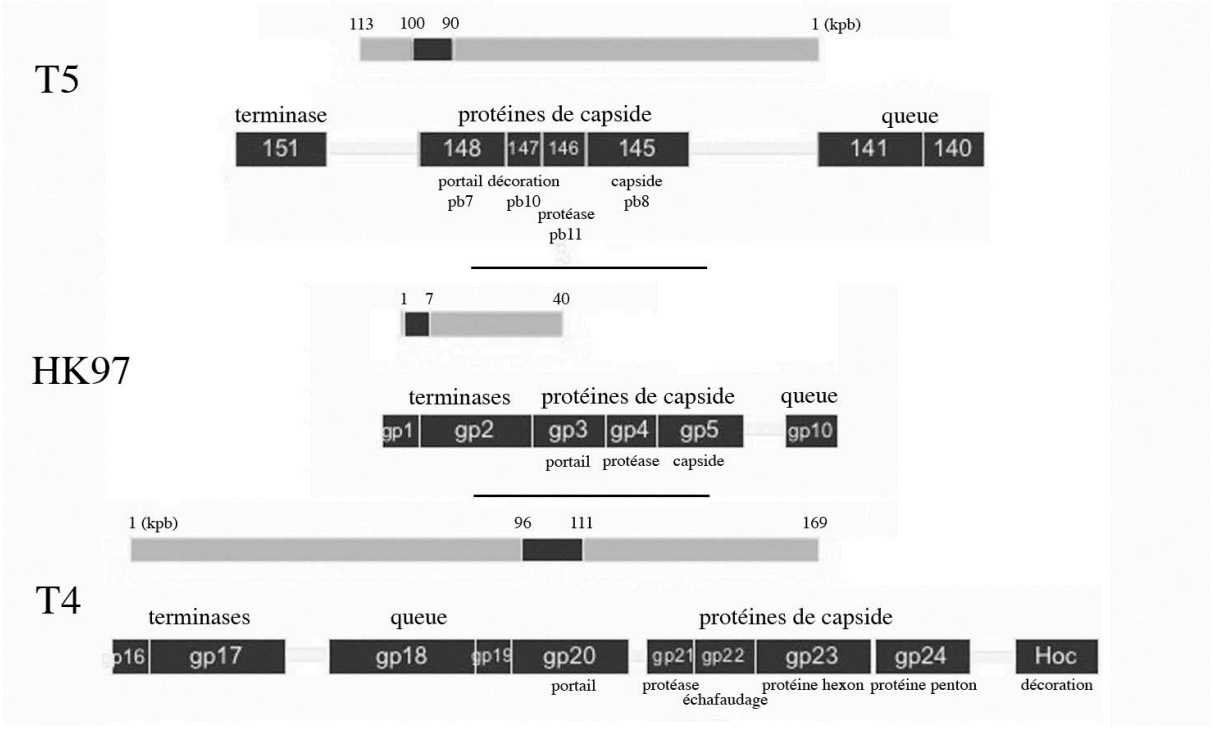


Figure 1 – Schéma général représentant la zone du génome des phages T5, HK97 et T4 codant pour les protéines structurales (région sombre) – Les protéines de ces régions sont détaillées pour chaque phage notamment celles spécifiques à l'assemblage de la capside.

Dans ce mémoire, je présenterai les premiers résultats obtenus en cryo-microscopie électronique sur le phage T5. À long terme, le projet vise à mieux comprendre le mécanisme d'éjection de l'ADN en situant et en caractérisant les changements dans la structure du phage T5 associés au départ de l'ADN de la capside au travers du connecteur et de la queue.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la capside icosaédrique et à la queue hélicoïdale dans l'optique future de pouvoir modéliser le phage entier. Le traitement du phage entier (capside + queue) par analyse d'images prises en microscopie électronique est rendu difficile par la flexibilité intrinsèque de la queue du phage au niveau du long tube à symétrie hélicoïdale et aussi de la partie distale composée des 3 longues fibres et de la pointe. L'approche suivie dans cette étude est donc de traiter séparément dans un premier temps la capside et la queue. Un des avantages de cette approche est que l'on peut « exploiter » au maximum les symétries propres à ces deux sous structures.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Ainsi, nous présenterons les premiers résultats structuraux obtenus sur la capside mature de T5 par cryo-microscopie électronique. Nous avons obtenu, par reconstruction tridimensionnelle, un modèle pour la capside de T5 avant et après l'éjection de l'ADN viral. Ceci nous fournit des premiers résultats qui seront discutés sur la géométrie de la capside de T5, la localisation et le rôle de la protéine mineure pb10 ainsi que sur l'arrangement de l'ADN empaqueté et les différences entre les capsides pleines et vides d'ADN. Aussi, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet seront comparés avec ceux obtenus pour d'autres virus pour lesquels des informations structurales sont disponibles.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la queue du phage T5 ainsi qu'à la visualisation « in situ » du connecteur liant la capside à la queue. Les premiers résultats seront présentés ainsi que les futures expériences envisagées.

II. Structure de la capside de T5 par coloration négative

Étant donné qu'aucun modèle préalable de la capside du phage T5 existe et que par conséquent la géométrie de celle-ci est inconnue, la première étape dans une analyse tridimensionnelle est d'obtenir un premier modèle qui pourra, par la suite, être utilisé comme une référence dans l'affinement des paramètres d'orientation des particules prises en microscopie électronique.

Le phage T5 appartient à la famille des *Siphoviridae* et plusieurs capsides de bactériophages de cette sous-famille ont déjà été caractérisées par cryo-microscopie électronique. Ainsi, les phages HK97, Lambda et Gifsy-2 possèdent tous une capside icosaédrique ayant une géométrie définie par un nombre de triangulation T = 7. Cependant, les 3 capsides matures de ces phages ont un diamètre d'environ 600-650 Å alors que pour T5 le diamètre de la capside est de l'ordre de 1000 Å. Par ailleurs, toutes ces capsides sont composées par la répétition d'une protéine de capside majeure ayant une masse moléculaire comprise entre 30 – 35 kDa tout comme T5 (Mw pb8 = 32 kDa). Ces deux observations suggèrent fortement que T5 possèdent une géométrique icosaédrique différente des phages HK97, Lambda et Gifsy-2 empêchant de ce fait l'utilisation des reconstructions 3D de leur capside comme modèle de référence pour débuter l'analyse d'images de la capside de T5.

Le calcul d'un premier modèle fiable peut parfois être une étape difficile et fastidieuse lorsqu'on utilise des images prises en cryo-microscopie du fait du faible contraste et du bruit élevé des images. La situation est encore compliquée lorsque l'objet étudié est un virus

d'aspect sphérique possédant une surface quasi-plane (peu de relief) (Caston et al., 1999) et ce malgré la redondance apportée par la symétrie icosaédrique.

Dans cette étude, l'analyse 3D initiale a été réalisée à partir d'images prises en coloration négative pour tirer profit du meilleur contraste des images. Le préalable à une telle démarche est que l'objet étudié ne soit pas trop détérioré par l'application du colorant et par la déshydratation survenant lors du séchage de l'échantillon avant l'observation au microscope. Dans le cas du phage T5, plusieurs sels métalliques furent testés (acétate d'uranyle, silicotungstate de sodium) mais les capsides les mieux préservées furent observées avec le molybdate d'ammonium (figure 2a).

Hormis les phénomènes d'agrégats causés par le colorant, les particules apparaissent uniformes avec la queue du phage plus ou moins courbée et toujours fixée le long du film en carbone limitant de ce fait les orientations sous lesquelles la capside est vue. Sur les images, la plupart des capsides possèdent un contour hexagonal caractéristique d'une vue proche d'un axe icosaédrique d'ordre 3. Une de ces particules (indiquée par un astérisque sur la figure 2a) fut analysée par la méthode des lignes communes (voir matériels et méthodes microscopie page 79) et les orientations trouvées pour cette particule étant proche d'un axe d'ordre 3, une reconstruction 3D à 45 Å fut calculée à partir de cette unique particule (figure 2b).

Ce premier modèle, bien que bruité et présentant peu de détails, possède un contour angulaire et des facettes planes consistant avec la particule utilisée. Cette reconstruction fut ensuite testée comme modèle de référence pour la détermination des orientations de 513 nouvelles images sélectionnées. Après convergence de celles-ci au bout de quelques cycles d'affinement, une reconstruction à 25 Å fut calculée (figure 2c).

Cette carte possède des caractéristiques plus marquées que le modèle de départ. Notamment, les aspérités de surface sont organisées clairement suivant une symétrie icosaédrique décrite par un nombre de triangulation T = 13. Le choix de la main laevo ou dextro n'a pas été déterminé pour la capside du phage T5 et de manière arbitraire T = 13l a été choisi pour toutes les reconstructions. La projection de la carte de densité suivant un axe d'ordre 3 (figure 2d) présente des caractéristiques que l'on retrouve dans la reconstruction à partir d'une seule particule (figure 2b) à savoir le contour hexagonal, la position de certains capsomères représentée par des taches foncées. Aussi, on distingue un anneau intérieur prononcé provenant de la superposition des densités projetées sur l'épaisseur de la capside qu'on distingue aussi sur certaines particules brutes de la figure 2a. Étant donné que le colorant ne pénètre pas la capside, l'intérieur de celle-ci n'est pas du tout défini (figure 2e).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

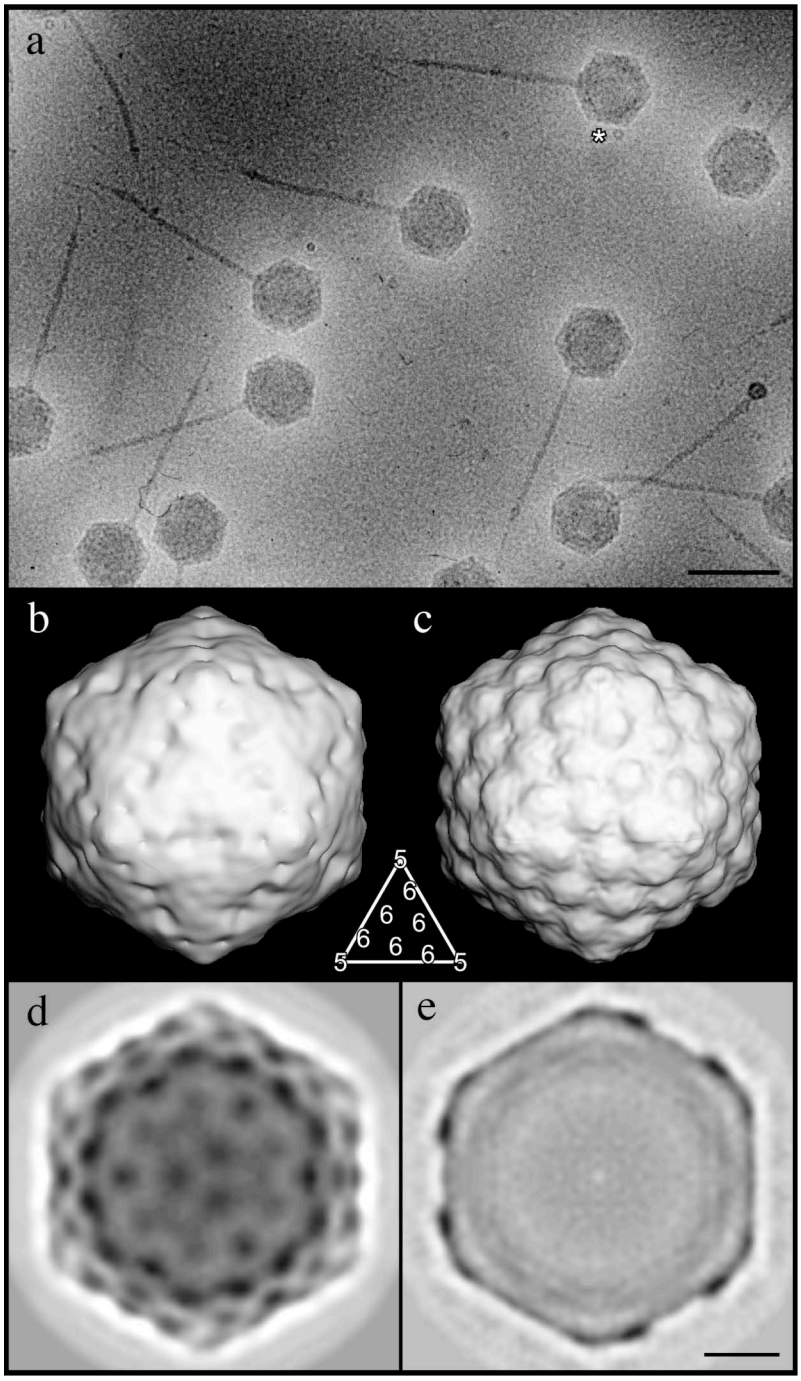


Figure 2 – Le phage T5 vu en coloration négative. (a) – exemple d'image prise en utilisant du molybdate d'ammonium comme colorant (barre = 1000 Å). Le contraste de l'image a été inversé (les protéines apparaissent foncées) pour comparaison avec les images prises en cryo-microscopie électronique. L'astérisque indique la particule utilisée pour générer le premier modèle qui est représenté en (b). (c) – Reconstruction obtenue avec 513 particules, le petit insert représente la position schématique des pentamères (5) et hexamères (6) composant une face d'une capside icosaédrique ayant une géométrie T = 13l. (d) – Projection de la carte en (c) suivant un axe icosaédrique d'ordre 3. (e) – Section centrale perpendiculaire à un axe d'ordre 3 (barre = 200 Å).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

III. Structure de la capside de T5 en cryo-microscopie électronique

A. Capside mature pleine

Les images prises en cryo-microscopie électronique (figure 3) montrent que la grande majorité de l'échantillon est composée de phages avec une capside pleine d'ADN à laquelle est attachée la queue du phage dont les longues fibres et la pointe ne sont généralement pas visibles à moins de prendre des images fortement sous focalisées. Par ailleurs, il y a aussi quelques capsides vides possédant toujours une queue attachée laissant penser que ce sont des capsides ayant perdues leur ADN étant donné que l'attachement de la queue est une étape suivant l'empaquetage de l'ADN lors de l'assemblage du phage dans la bactérie.

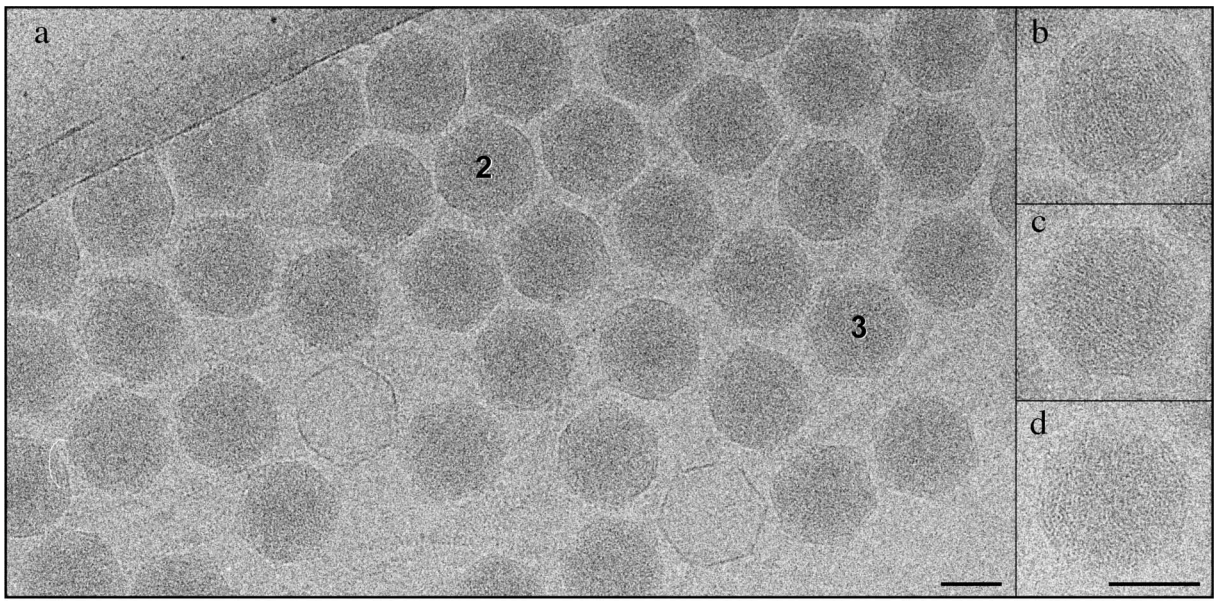


Figure 3 – (a) – Extrait d'image prise en cryo-microscopie électronique (barre = 500 Å) montrant une majorité de capsides pleines et quelques vides. Les capsides vues selon un axe de symétrie icosaédrique ont une forme caractéristique – deux d'entre elles sont indiquées par un « 2» (axe d'ordre 2) et un « 3 » (axe d'ordre 3). Les 3 particules en insert sont extraites d'images prises à une sous focalisation plus faible pour éviter les interférences de la fonction de transfert de contraste avec l'espacement de l'ADN empaqueté. Suivant l'orientation selon laquelle la particule est vue, l'ADN apparaît sous différents aspects donnant un motif tourbillonnant (b), une apparence striée (c) ou un motif ponctuel (d) (barre = 500 Å).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

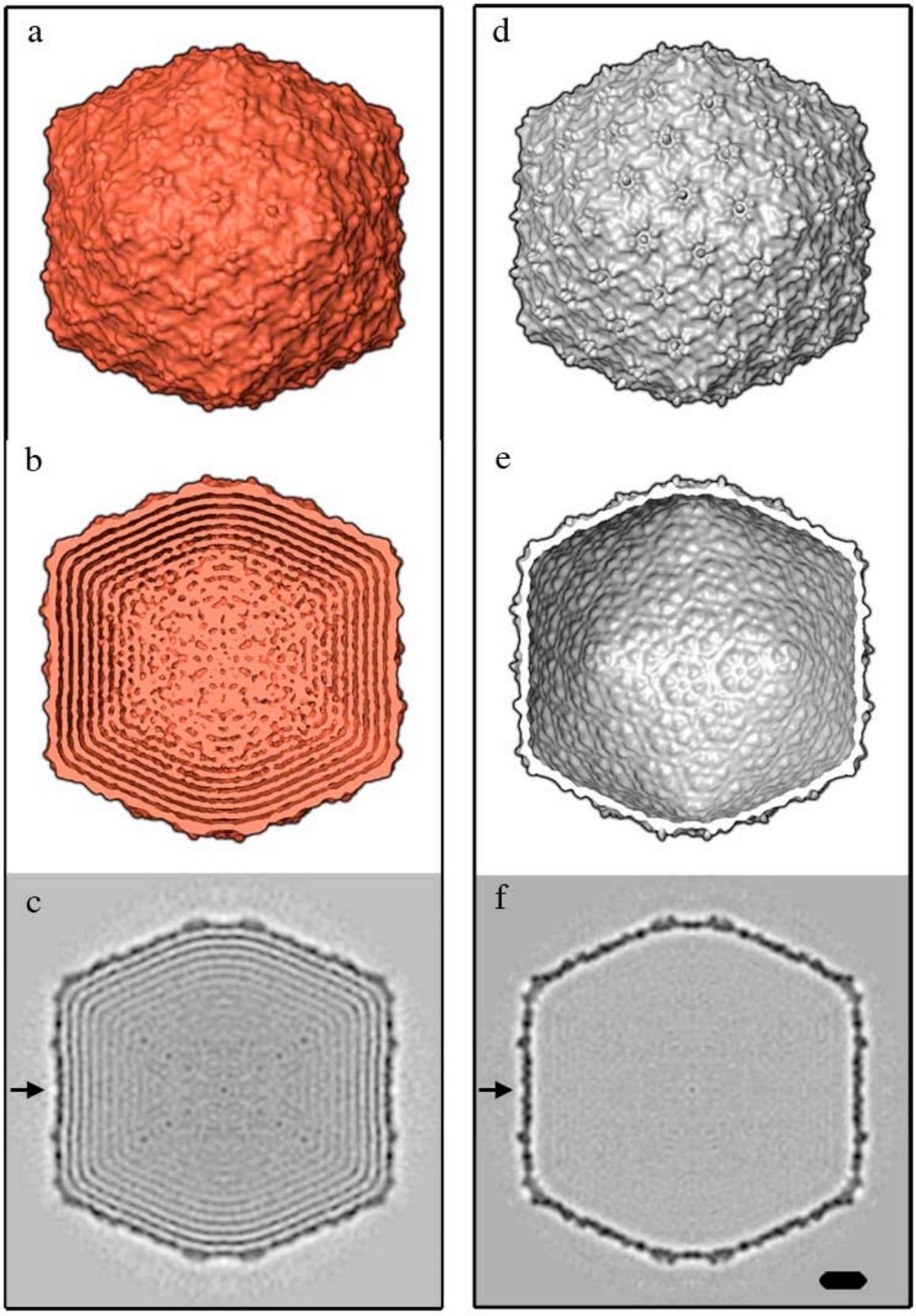


Figure 4 – Reconstructions, vues selon un axe d'ordre 2, obtenues à partir des images prises en cryo-microscopie électronique pour les capsides pleines (colonne de gauche) et vides (colonne de droite). (a – d) vue extérieure (b – e) vue intérieure où la moitié avant a été tronquée (c – f) section centrale (barre = 100 Å)

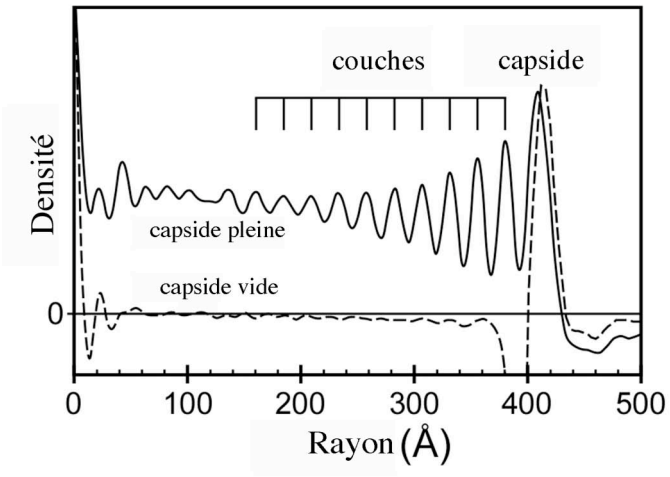


Figure 5 – Graphique représentant la distribution en densité (ADN ou protéine) en fonction du rayon. Pour la capside pleine (ligne pleine), on distingue 10 couches successives d'ADN empaqueté distantes chacune de 24.4 Å. Les dimensions maximales de la capside pleine (ligne pointillée) sont légèrement supérieures à celle de la capside pleine.

Les particules sélectionnées ont conduit à une reconstruction de 20 Å de résolution pour les capsides pleines (figure 4 – colonne de gauche) en utilisant comme modèle de référence la carte de densité déterminée en coloration négative. Sur la vue extérieure (figure 4a), l'organisation des capsomères en pentamères au niveau des axes d'ordre 5 et en hexamères ailleurs, suivant une géométrie décrite par un nombre de triangulation T= 13l, entrevue en coloration négative, est clairement visualisée. La vue intérieure (figure 4b) et la section centrale (figure 4c) montre l'arrangement en couches concentriques de l'ADN viral contenu dans la capside d'une épaisseur protéique de ~ 40 Å. Sur le graphique représentant le profile en densité en fonction du rayon (figure 5), 10 couches espacées en moyenne de 24.4 Å sont visibles. Cette organisation de l'ADN est similaire à celle observée pour le phage T7, *Podoviridae* (Cerritelli et al., 1997) et le phage T4, *Myoviridae* (Olson et al., 2001 ; Fokine et al., 2004) et est consistent avec le modèle d'enroulement en bobine proposé pour l'ADN du phage T7 (Cerritelli et., 1997).

B. Capside vide

Comme mentionné ci-dessus, l'échantillon des phages complets pleins d'ADN contenait aussi des phages vides ayant perdus leur ADN. Mais, afin d'en avoir une plus grande quantité, les phages complets ont été incubés 2h à 37°C dans de l'urée à 2M afin de

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

causer l'expulsion de l'ADN puis dialysés dans le tampon de départ afin d'éliminer l'urée. Le résultat donne en solution une très large majorité de capsides vides (figure 6) à laquelle, dans la plupart des cas, sont toujours attachées les queues plus ou moins intactes ; il subsiste aussi quelques phages pleins en très faible quantité. Cette observation nous permet d'être confiant dans le fait que l'ADN est effectivement sorti de la capside par la queue, reproduisant pour cette partie au moins le chemin suivi par l'ADN lors de l'infection par le phage de la bactérie.

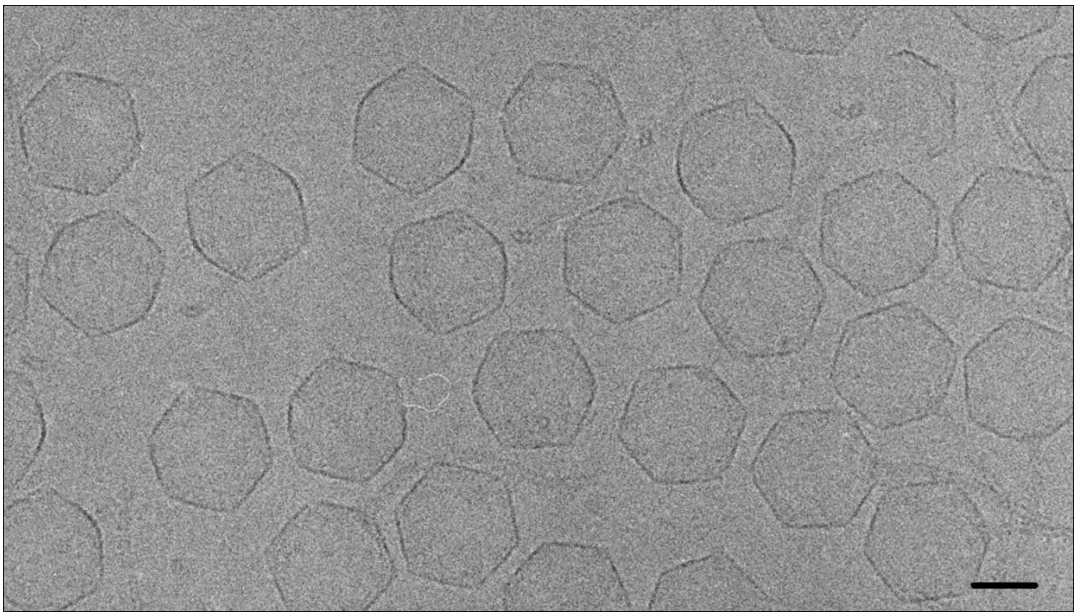


Figure 6 – Extrait d'une image prise en cryo-microscopie électronique de capsides de T5 ayant perdues leur ADN. La plupart des capsides conservent au moins une partie de leur queue attachée à la capside (barre = 500 Å)

La structure par cryo-microscopie électronique de la capside vide est résolue à 19 Å et est très similaire à la structure de la capside pleine au niveau de la surface externe (figure 4d) tout en présentant une amélioration dans la qualité des détails dus à l'absence d'ADN empaqueté et au plus grand nombre de particules analysées.

Sur la vue intérieure (figure 4e), on distingue de petites cavités (centrales et satellites) sous chacun des capsomères qui rappellent fortement la structure interne de la capside mature du phage HK97 (Conway et al., 1995) ainsi que celle de la procapside maturée de Gifsy-2 (figure 9a, page 56). Afin de comparer les dimensions des capsides pleines et vides et de les calibrer entre elles, deux nouvelles reconstructions ont été calculées à partir de particules provenant de la même incubation dans l'urée. La comparaison de la distribution en densité en fonction du rayon entre les capsides pleines et vides (figure 5) montre que ces dernières ont un diamètre moyen légèrement plus grand que les capsides pleines bien que les capsides vides

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

n'aient plus à s'accommoder de la pression interne exercée par l'ADN empaqueté. Cette légère différence de taille se remarque en particulier au niveau des axes d'ordre 2 où la paroi des capsides vides est droite tandis que celle des capsides pleines est légèrement incurvée (figure 4c, f – flèches).

C. Caractéristique et identification de la protéine de capside mineure

Des expériences antérieures ont déterminé que la capside de T5 était composée principalement par une seule protéine de capside majeure (pb8). Ceci est confirmé sur les reconstructions obtenues en microscopie électronique où les hexamères et les pentamères apparaissent similaires. Cependant, les hexamères diffèrent des pentamères par la présence d'une densité supplémentaire en leur centre. Cette densité n'est pas fortement continue avec les protéines sous-jacentes ce qui nous a permis d'estimer son volume consistant avec un peptide de ~160 acides aminés. Le fait que cette densité ne se retrouve pas au niveau des pentamères suggère fortement que cette protubérance soit une seconde protéine de capside plutôt qu'une extension de la protéine de capside majeure.

Cette protéine semble établir des connexions variables avec les hexamères sous jacents indiquant que le ratio avec ceux-ci n'est pas de 1 : 1. Ceci va dans le sens que cette molécule occupe à peu près le même volume au niveau de chaque hexamère mais n'est associée à qu'une ou deux des sous unités de celui-ci, cette interaction se faisant de manière aléatoire au niveau de chacun des 120 hexamères équivalents de la capside.

En incubant pendant différents temps les capsides dans une solution à 4M en GuHCl, la densité présente au centre de chaque hexamère est progressivement éliminée (figure 7 - droite) confirmant que c'est effectivement une protéine de décoration qui n'a pas d'effet marqué sur la stabilité de la capside.

L'identité la plus probable pour cette protéine de décoration est pb10 (164 résidus) qui se situe, dans le génome de T5, entre la protéine portail pb7 et la protéase pb11. Un monomère de pb10 correspondrait au volume que l'on voit sur les reconstructions. Le ratio moléculaire avec pb8 serait alors de 120 : 780 soit 1 : 6,5. Ceci est proche de la valeur de 1 : 6 déterminée biochimiquement (Saigo, 1978).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

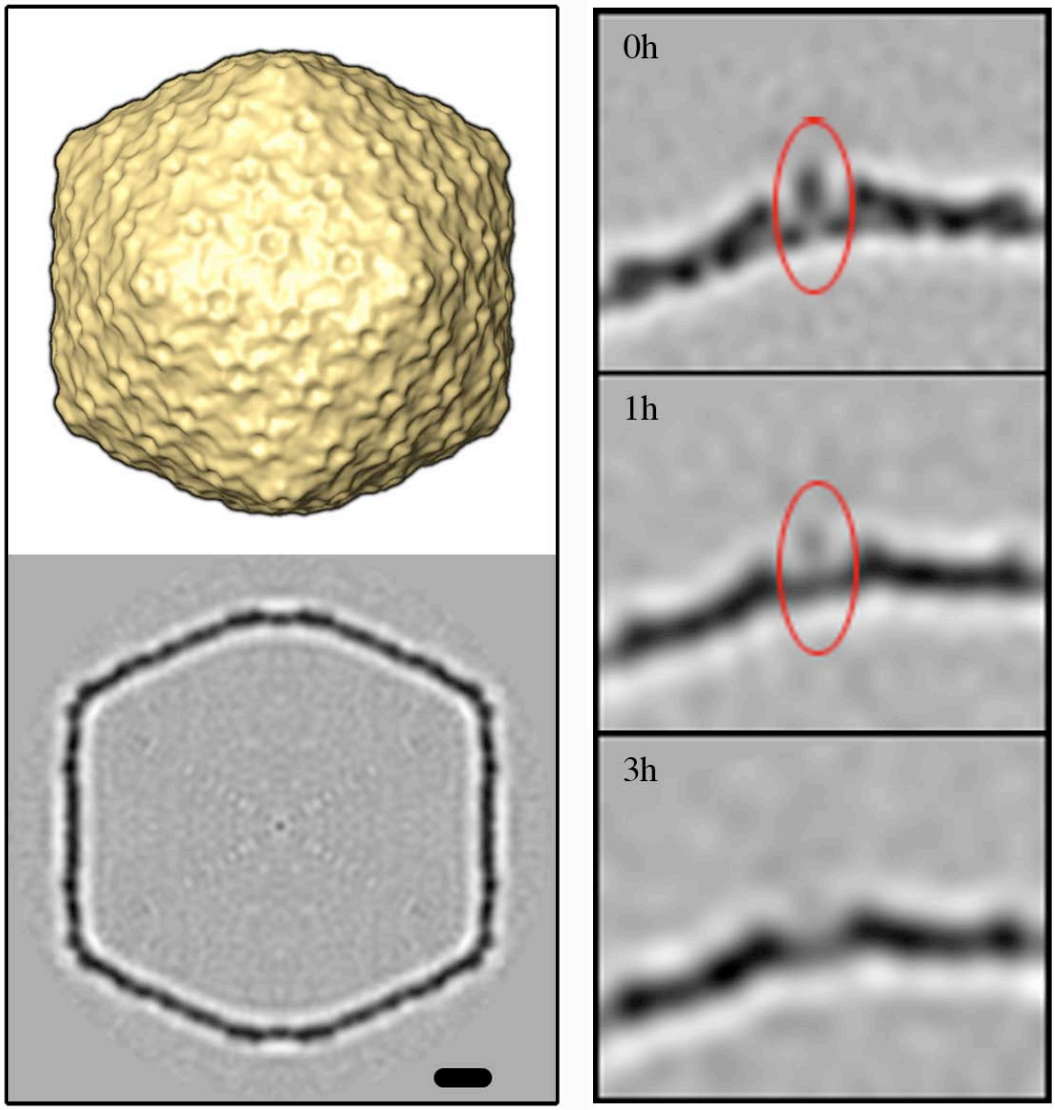


Figure 7 – Colonne de gauche – Reconstruction du mutant dans la protéine de décoration pb10. Les densités correspondant à cette protéine sont absentes à comparer des reconstructions de la figure 4 d – f (barre = 100 Å). Colonne de droite – élimination progressive de la protéine pb10, par incubation dans du GuHCl, illustrée par 3 sections centrées sur le même hexamère qui montrent qu'après 3h, il n'y a plus de traces de pb10.

Afin d'être complètement sûr de l'identité de cette protéine de capside mineure, nous avons déterminé la structure de la capside d'un mutant de T5 pb10(-) (figure 7 - gauche). La principale différence avec les capsides natives est l'absence de densités supplémentaires au niveau de centre des hexamères confirmant ainsi l'identité de ces protubérances comme des monomères de pb10.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

IV. Similarités entre les protéines de capside de T5 et d'HK97

A. Modélisation d'HK97 gp5 dans la carte de densité de T5

Le phage T5 appartient à la même famille qu'HK97 (*Siphoviridae*) et leurs capsides sont constituées par la polymérisation d'une protéine de capside majeure dont les formes matures ont des tailles similaires (298 résidus pour pb8-T5 et 282 pour gp5-HK97). Par ailleurs, d'un point de vue morphologique, les capsomères constituant leur capside sont très proches d'un phage à un autre, surtout au niveau de leurs surfaces internes en contact avec l'ADN viral. Afin de renforcer ces observations, nous avons modélisé les hexamères et pentamères de T5 en ajustant les modèles atomiques disponibles pour HK97 (Wikoff et al., 2000 ; Helgstrand et al., 2003) dans la densité électronique correspondante de T5.

Les résultats obtenus (figure 8) montrent un bon accord entre les hexamères (et pentamères) de T5 et HK97 qui ont des dimensions proches. Cependant, l'espacement pentamère-hexamère et hexamère-hexamère est légèrement plus grand chez T5 que chez HK97 contrairement à leurs orientations relatives qui sont identiques. Ceci suggère des différences au niveau des interactions entre capsomères chez ces 2 phages.

Visuellement, au niveau d'un seul hexamère (ou pentamère), hormis la partie occupée par pb10 qui n'a pas d'équivalent chez HK97 (figure 8 – flèche), une seule zone de la densité de T5 reste inoccupée et celle-ci peut être attribuée à la petite différence de taille entre les 2 protéines (17 résidus en plus chez T5). Au niveau de la surface externe, plusieurs petites boucles de gp5 (figure 8 – cercles) sortent de la densité de T5 au niveau des zones où se trouvent pb10 (cercle bleu et rose) et la boucle E (cercle noire) qui contient un des résidus impliqué dans la formation de liaisons covalentes intra et inter – capsomères chez HK97.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

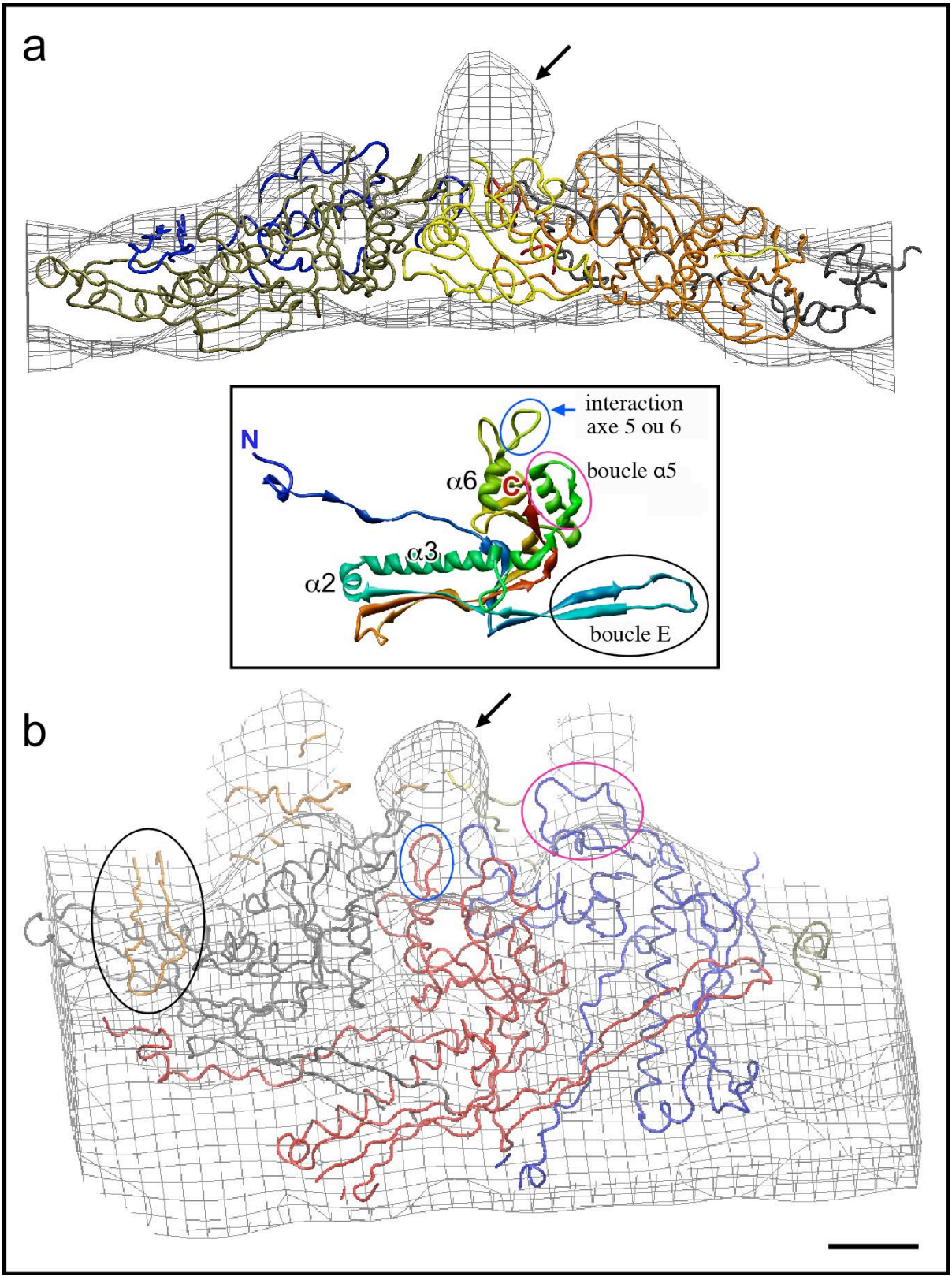


Figure 8 – Modélisation d'un hexamère de la protéine de capside majeure d'HK97 gp5 dans un hexamère de la reconstruction des capsides vides de T5 (a) vue de côté (b) vue oblique. Insert : monomère de gp5 (barre = 20 Å)

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

B. Organisation des gènes structuraux

D'une manière générale, les gènes codant pour des protéines impliquées dans la morphogenèse des capsides sont peu nombreux et leurs fonctions sont fortement conservées d'un phage à un autre même si les similarités, au niveau des séquences primaires, sont faibles voir nulles (Hendrix, 2003). T5, sans surprise, suit ces observations. Il possède une protéine de capside majeure pb8 qui constitue à la fois les pentamères et les hexamères d'une manière similaire aux protéines gp5 d'HK97 et gpE de Lambda. T5 se différencie sur ce point de T4 qui possède des protéines distinctes au niveau de ces pentamères et de ces hexamères (gp 24 et gp 23 respectivement). Par contre, d'une manière identique à la protéine Hoc de T4, T5 possède une protéine de décoration pb10 qui se fixe au centre de ces hexamères mais pas de ces pentamères. Une fois de plus, la relation fonctionnelle entre ces 2 protéines semble très forte, mais elles restent néanmoins très différentes l'une de l'autre au niveau protéique et de plus, Hoc est plus grosse (377 résidus) que pb10 (164 résidus) et est constitué de 2 domaines quasi – globulaires (Olson et al., 2001) contrairement à pb10.

Une autre constante chez les bactériophages est la présence d'une protéine d'échafaudage pour guider l'assemblage correct des procapsides. Chez HK97, ce rôle semble être tenu par le domaine Δ (102 acides aminés) constituant la partie N-terminale de la protéine de capside majeure gp5. Ce domaine est éliminé par protéolyse une fois la première forme de capside construite (appelée procapside I). De plus, il est fortement prédit qu'il adopte une conformation en super hélice (Conway et al., 1995) ; ce qui est aussi une caractéristique montrée avec la structure atomique de la protéine d'échafaudage du phage ϕ29 (Morais et al., 2003).

La protéine de capside majeure pb8 de T5 possède aussi une longue extension N-terminale qui est éliminée pour donner la protéine mature de 298 résidus. Cette extension de 159 acides aminés est 60 % plus longue que celle d'HK97 mais, la probabilité qu'elle forme une super hélice est très forte tout comme le domaine Δ d'HK97 (figure 9a). En tenant compte du fait que dans le génome de T5, il n'existe aucune protéine d'échafaudage évidente, nous proposons que cette fonction soit tenue par le domaine Δ de pb8 d'une manière similaire à HK97.

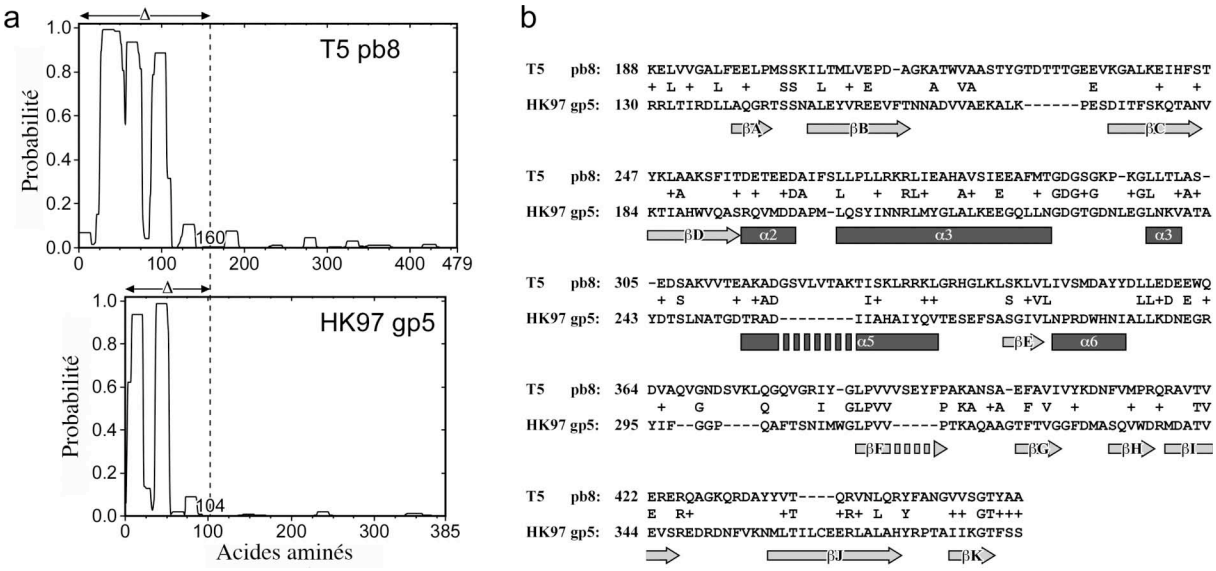


Figure 9 – Comparaison entre les protéines de capside majeure de T5 et d'HK97 – (a) Comparaison de la probabilité d'un arrangement en super hélice (Lupas et al., 1991) pour les domaines Δ des 2 protéines. En partant du point de clivage (ligne pointillée) des 2 protéines, les prédictions sont fortement similaires pour ces deux phages. La plus grande taille du domaine Δ de T5 apparaît comme une extension supplémentaire, n'existant pas chez HK97, et s'arrangeant aussi en super hélice. (b) Alignement de séquence entre les formes matures de pb8 et de gp5 à l'exclusion des 26 premiers acides aminés. Plusieurs petits gaps essentiellement chez HK97 apparaissent pour compenser les 17 résidus de différence entre ces deux protéines. Les structures secondaires d'HK97 (Helgstrand et al., 2003) sont indiquées comme des rectangles noirs pour les hélices α et des flèches grises pour les feuillets β

Concernant la partie C-terminale de la protéine de capside majeure, pb8, l'alignement de séquence avec la partie correspondante chez HK97 donne une identité de séquence de l'ordre de 20% (figure 9b). Plusieurs petites insertions apparaissent dans la séquence plus courte d'HK97 dont une au niveau de l'hélice α5 qui se retrouve en dehors de la densité électronique de T5 sur la figure 8 (cercle rose). Une insertion de 6 résidus est prédite au niveau de la boucle E d'HK97 incluant un des résidus (Lys169) impliqué dans la formation des liaisons covalentes entre les capsomères d'HK97 mais qui na pas d'analogue chez T5. Plusieurs petites insertions sont aussi prédites dans la région autour du brin βF qui correspond chez HK97 à la zone proche du centre des capsomères où, chez T5, il y a encrage de la protéine pb10 qui n'a pas d'équivalent chez HK97. Enfin, les 27 premiers acides aminés ne sont pas alignés par PSI-BLAST. Ces résidus s'arrangent, chez la forme mature d'HK97, selon un long bras (appelé le bras N) et cette extension est prédite pour être une zone de conformation variable chez HK97 (Conway et al., 2001).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Par ailleurs, et sans pour autant tirer de conclusions hâtives sur ces résultats, plusieurs programmes de prédiction de structure tertiaire, utilisant des méthodes de reconnaissance du repliement des protéines à partir, à la fois, des alignements entre les séquences primaires et des structures atomiques connues, donnent gp5 comme le meilleur modèle pour la protéine de capside pb8 (voir tableau ci dessous).

Nom du programme (score minimum de fiabilité)	**Score pour la forme mature de pb8 (Phage T5)**	**Score pour la forme mature de la protéine de capside du phage D3 (homologue d'HK97)**
INBGU (> 48.3)	134,88	529,06
FFAS (< -38,2)	-78,4	-93,7
FUGUE (> 21,03)	24,43	36,49
MGENTHREADER (> 0,65)	0,954	9,964
PCONS2 (> 2,17)	2,629	3,082

Tableau résumant les scores représentatifs des similitudes structurales entre HK97 gp5 et les protéines de capside majeure des phages T5 et D3 obtenus par différents programmes de reconnaissance de repliement similaire. Pour chaque programme mentionné et pour les 2 protéines de T5 et de D3, le score obtenu avec HK97 gp5 était le meilleur parmi tous les scores. Le phage D3 sert en quelque sorte de référence car la protéine de capside de celui-ci est fortement similaire à celle d'HK97 (43 % d'identité entre les 2 séquences sur 395 acides aminés) et de plus, ces 2 phages ont le même mécanisme de stabilisation par formation de liaisons covalentes entre les sous unités (Gilakjan et al., 1999)

Par ailleurs, récemment, la protéine gp24 du phage T4 qui forme les pentamères de la capside a été résolue par cristallographie aux rayons X (Fokine et al., 2005). Le principal résultat se dégageant de cette étude est que cette protéine possède un repliement similaire à celui d'HK97 gp5, tout en gardant à l'esprit que l'identité de séquence entre les régions structurellement équivalentes est de l'ordre de 20 %. Ces deux protéines diffèrent fortement sur certaines zones comme au niveau de la boucle E d'HK97 où gp24 possède un domaine supplémentaire d'environ 60 acides aminés.

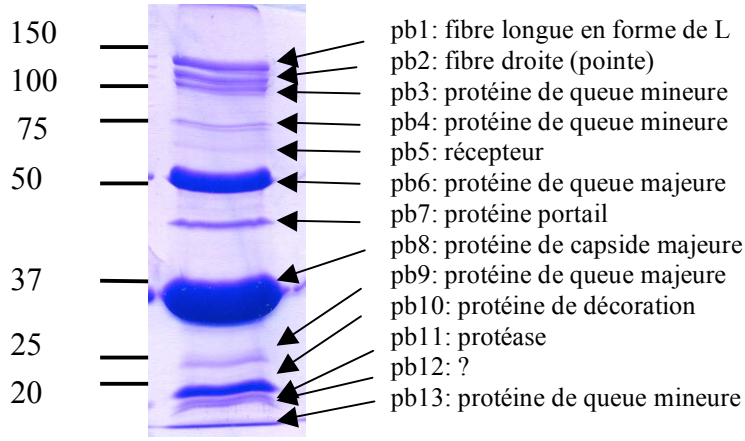
tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

De plus, le repliement tridimensionnel d'HK97 a aussi été proposé pour les protéines de capside des phages ϕ29 (Morais et al., 2005) et P22 (Jiang et al., 2003) couvrant ainsi les 3 sous familles des *Caudovirales* et suggérant de ce fait qu'il pourrait être très répandu au sein des phages à double brin d'ADN.

Pour le phage T5, la résolution actuelle des reconstructions (20 Å) ne permet pas de tirer de conclusions franches sur ce point. Néanmoins, la ressemblance morphologique des reconstructions, le fit des hexamères et pentamères d'HK97 dans la densité électronique correspondante de T5 et les similarités entre les deux protéines gp5 et pb8 mises en évidence par des outils bioinformatiques vont dans le sens d'une structure tridimensionnelle similaire.

V. Analyse de la queue du bactériophage T5



Structural gene		MW(kDa)		Stuctural protein	N-terminal sequence	proteolytic cleavage
		* predicted	# Experimental			
pT5131	*ltf*	147		pb1 ^{T}	-	no
pT5136	*D18-19*	131	124	pb2 ^{T}	TDKLIREL	C-ter
pT5134	*D16*	107		pb3 ^{T}	KKKILDSAKNYL	no
pT5133	*D17*	74		pb4 ^{T}	MISNNAPAKMVLNS	no
pT5153	*oad*	68		pb5 ^{T}	-	no
pT5141	*N4*	50.3		pb6 ^{T}	SLQLLRNTRIFV	no
pT5148		45.0	44	pb7 ^{H}	LNPGQRIIRDMEPVS	N-ter
pT5145	*D20-21*	50.8	37	pb8 ^{H}	AVQNSSSVEVSSESY	N-ter
pT5135		22.7		pb9 ^{T}	ARLPDPYTNPEYP	no
pT5147	*N5*	17.2		pb10 ^{H}	MIDYSGLRTIFGEKL	no
pT5146		23.4	20.8	pb11 ^{H}	SIDSESKEGVV	N-ter
pT5132		15.0		pb13 ^{H}	-	nd

*:calculée à partir de la séquence protéique traduite #: déterminée par séquençage N-terminal et gel SDS-PAGE, et par spectrométrie de masse (pour pb2 seulement)
^{H}: protéine de capside ^{T}: protéine de queue nd: non déterminé

Le bactériophage T5 contient au moins 15 protéines structurales différentes se répartissant entre celles composant la capside et la queue (Zweig et Cummings, 1973 ; gel SDS et tableau obtenus auprès de Dr. Pascale Boulanger).

La queue du phage T5 (figure 10) est constituée par un long tube constitué par la protéine de queue majeure pb6. À son extrémité commence la partie distale de la queue composée par une structure conique (pb5) à laquelle sont fixées les 3 longues fibres en forme de L (pb1) et la pointe centrale (pb2).

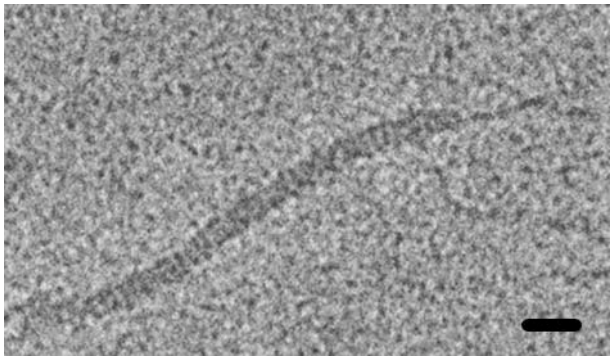


Figure 10 – Image prise en coloration négative (Acétate d'uranyle, le contraste de l'image a été inversé) (barre = 200 Å).

Le tube est constitué par 120 copies de pb6 qui s'arrange sous la forme de 40 plateaux superposés, chacun étant donc formé par des trimères de pb6. L'agencement de ces trimères les uns sur les autres avec un déplacement angulaire de ~40° entre deux plateaux successifs confère une symétrie hélicoïdale à la queue du phage T5 (Guénebaut et al., 1997).

A. Analyse du tube de la queue de T5 en coloration négative

La méthode de reconstruction choisie a été développée par Edward Egelman (Egelman, 2000 ; Iterative Helical Real-Space Reconstruction) et implémentée dans SPIDER. Elle permet de traiter les objets hélicoïdaux comme des molécules isolés qui, une fois sélectionnés, entrent dans des cycles itératifs d'affinement des orientations par comparaison avec les projections du modèle déterminé dans le cycle précédent. Cette méthode ne nécessite pas d'avoir de longs segments hélicoïdaux car l'objet étudié est découpé en petites sélections successives contenant au moins l'unité de répétition. Ce procédé tolère aussi que les segments sélectionnés ne soient pas parfaitement droits et ne passe pas par une étape d'indexation des

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

taches de diffraction contrairement aux méthodes de Fourier-Bessel (Muller et al., 1994 ; Guénebaut et al., 1997).

Dans un premier temps, l'échantillon contenant seulement les queues de T5 pures est observé en coloration négative (Acétate d'uranyle) où celles-ci apparaissent bien conservées mais généralement très courbées. Néanmoins, à partir des plus droites, des transformés de Fourier ont pu être calculées sur des portions de tubes (figure 11) et ainsi, l'espacement Z entre chaque plateau a pu être déterminé. À partir de plusieurs tubes, une valeur constante Z ~ 38 Å a été trouvée.

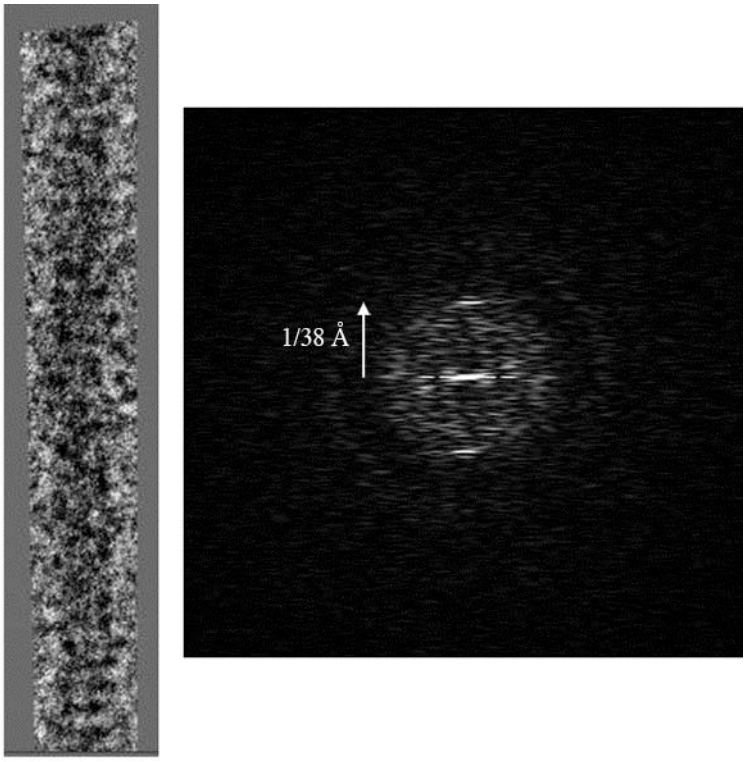


Figure 11 – Tube de la queue de T5 extrait d'une micrographie et sa transformée de Fourier correspondante – La distance entre chaque plateau composant le tube est de 38 Å.

À partir de résultats précédents définissant l'angle entre 2 sous unités de l'hélice α = 40 ° (Guénebaut et al., 1997) et le pas entre 2 sous unités selon l'axe de l'hélice Z = 38 Å déterminé ci –dessus, les paramètres initiaux nécessaires à la méthode IHRSR sont connus. La main de la structure ne pouvant pas être déterminée par cette méthode, elle fut choisie arbitrairement (hélice gauche). Ainsi, après 66 cycles d'affinement, les paramètres décrivant la symétrie hélicoïdale ont convergé vers des valeurs moyennes de 40,3° pour α et 38.01 Å pour Z, proches des valeurs initiales et une première reconstruction du tube hélicoïdal de la queue du phage T5 est obtenue à une résolution de 35 Å (figure 12).

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

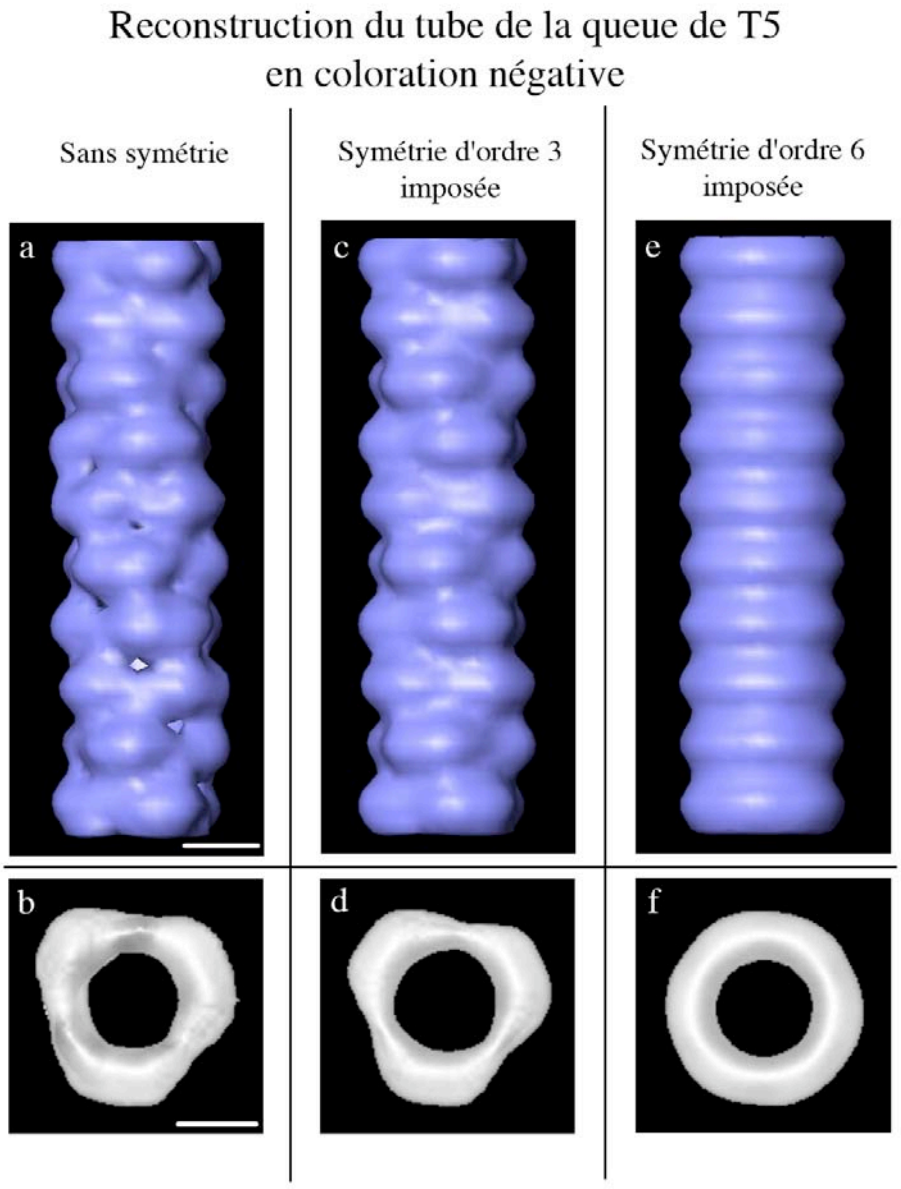


Figure 12 – Contour de surface des reconstructions hélicoïdales obtenues en coloration négative pour le tube de la queue de T5 en fonction de la symétrie supplémentaire imposée (3 ou 6). a – c – e Vue de face représentant dix plateaux. b – d – f Vue de dessus sur un plateau (barre = 50 Å).

Le tube de la queue du phage T5 est entièrement décrit par 3 hélices indépendantes (figure 12a). Chaque plateau distant de 38 Å en moyenne est composé par une sous unité de chacune des 3 hélices. Ces trimères de pb6 semblent s'arranger suivant une symétrie d'ordre 3 au sein de chaque anneau (figure 12b). Cette observation est confirmée lorsque l'on impose différentes symétries sur la reconstruction hélicoïdale. Bien que, dans les deux cas, les caractéristiques de la reconstruction avec symétrie soient plus ou moins atténuées, la symétrie d'ordre 3 (figure 12c – d) semble la plus appropriée par rapport à celle d'ordre 6 où les trimères ne sont plus définis (figure 12e – f).

B. Analyse du tube de la queue de T5 en cryo-microscopie électronique

Afin d'améliorer les résultats obtenus en coloration négative, le même type d'analyse a été faite à partir d'images prises en cryo-microscopie électronique (figure 13a). Les queues y apparaissent généralement moins courbées qu'en coloration négative, et avec les mêmes caractéristiques morphologiques.

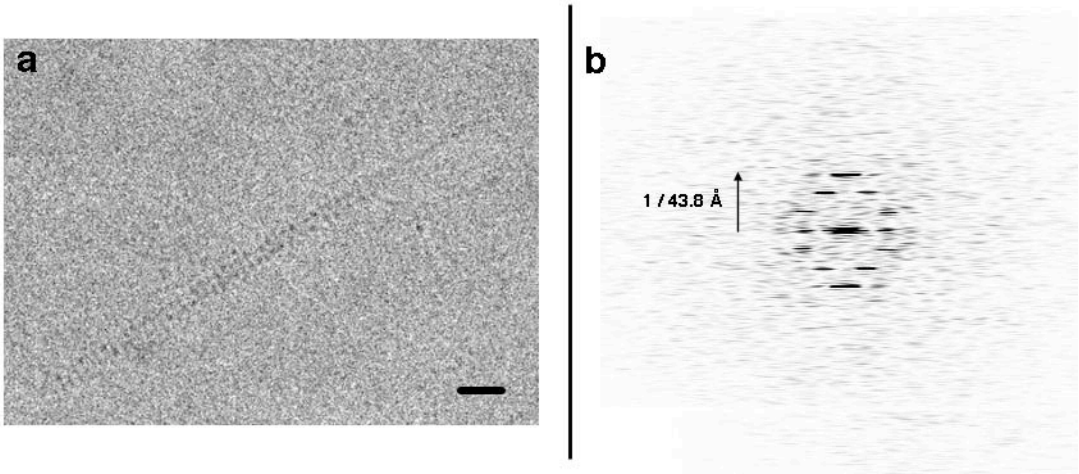


Figure 13 – a – Exemple du queue du phage T5 extraites d'une image prise en cryo-microscopie électronique (barre = 200 Å). b – Transformée de Fourier d'un tube de la queue de T5

La distance entre chaque anneau, mesurée sur les transformées de Fourier des tubes les plus droits, est de Z = 43.8 Å (figure 13b) en accord avec des mesures précédentes (Guénebaut et al., 1997). C'est une mesure supérieure à celle trouvée en coloration négative (Z = 38 Å) qui s'explique à la fois par l'absence de calibration entre les 2 microscopes utilisés et par le léger rétrécissement des molécules biologiques lors du séchage de la grille.

L'analyse des données en cryo-microscopie électronique fut donc réalisée avec comme paramètres de départ Z = 43.8 Å et $\alpha = 40°$ en imposant la symétrie d'ordre 3 autour de l'axe de l'hélice. En effet et contrairement à la coloration négative, si aucune symétrie n'est imposée, le programme de reconstruction ne converge pas vers des paramètres hélicoïdaux stables. Le contraste plus faible des images prises en cryo-microscopie ainsi que la courbure, même faible, des portions de tubes sélectionnées contribuent vraisemblablement à cette différence. Enfin, dans la méthode de reconstruction suivie, les queues et donc les portions de queue sélectionnées sont supposées êtres parallèles au plan de l'image ce qui n'est jamais vraiment le cas en cryo-microscopie étant donné l'épaisseur de la glace. Ce phénomène à d'autant plus d'importance que les queues du phage T5 sont des objets relativement fins

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

(environ 120 Å de diamètre) par rapport à l'épaisseur de glace moyenne (quelques centaines de nanomètres)

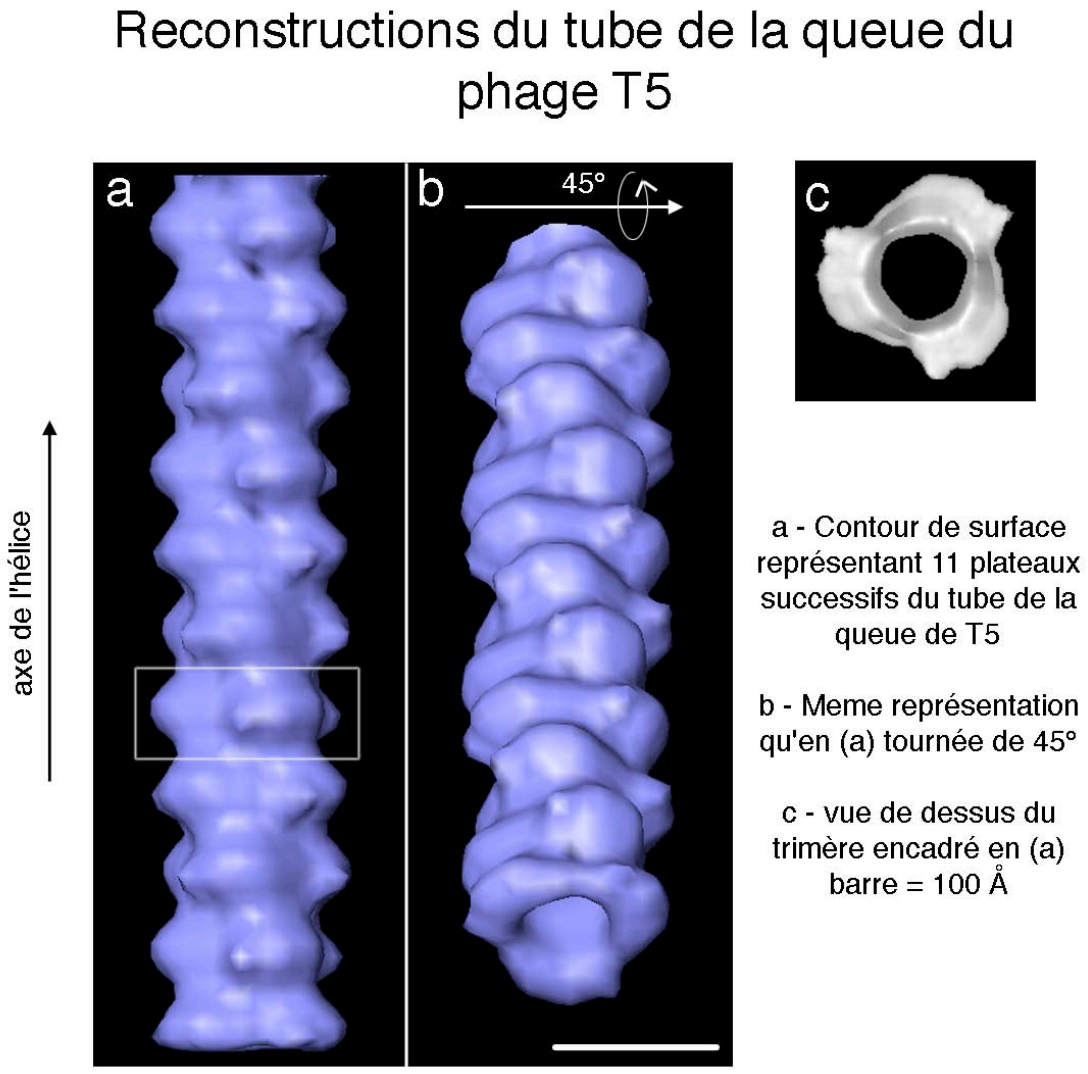


Figure 14

Après convergence des paramètres hélicoïdaux vers des valeurs stables, la reconstruction calculée (figure 14a -b) montre une morphologie globale identique à celle obtenue en coloration négative avec cependant des détails supplémentaires pour une résolution calculée légèrement supérieure à 30 Å.

Le long tube flexible de la queue du phage T5 a un diamètre externe de 95 Å au niveau de la jonction entre 2 plateaux et un de 125 Å maximum au centre de chaque plateau. Un canal central d'un diamètre variant entre 35 et 40 Å est apparent sur toute la longueur du tube. Le tube est constitué par la répétition de la même protéine pb6. Elle forme des trimères s'empilant les uns sur les autres tous les 43.8 Å en moyenne le long de l'axe de la queue. Cette superposition régulière combinée avec un déplacement angulaire moyen de 39.4° entre

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

chaque trimère confère une symétrie hélicoïdale à l'ensemble. Chaque trimère respecte une symétrie d'ordre 3 autour de l'axe vertical du tube (figure 14c).

Cette reconstruction a été utilisée ensuite pour analyser l'arrangement hélicoïdal du tube de queues attachées aux capsides matures de T5 (figure 15a - b). La distance mesurée sur les transformées de Fourier de tubes droits est la même que celle mesurée pour les queues seules (Z = 43.8 Å). La reconstruction obtenue après 80 cycles est identique à celle obtenue pour les queues seules concernant les paramètres hélicoïdaux finaux ainsi que la résolution (environ 30 Å). Notamment, il n'a pas de densités supplémentaires à l'intérieur du tube attestant que l'ADN viral des phages T5 complets et infectieux reste confiné à l'intérieur de la capside par un système de fermeture au niveau du connecteur (Orlova et al., 2003).

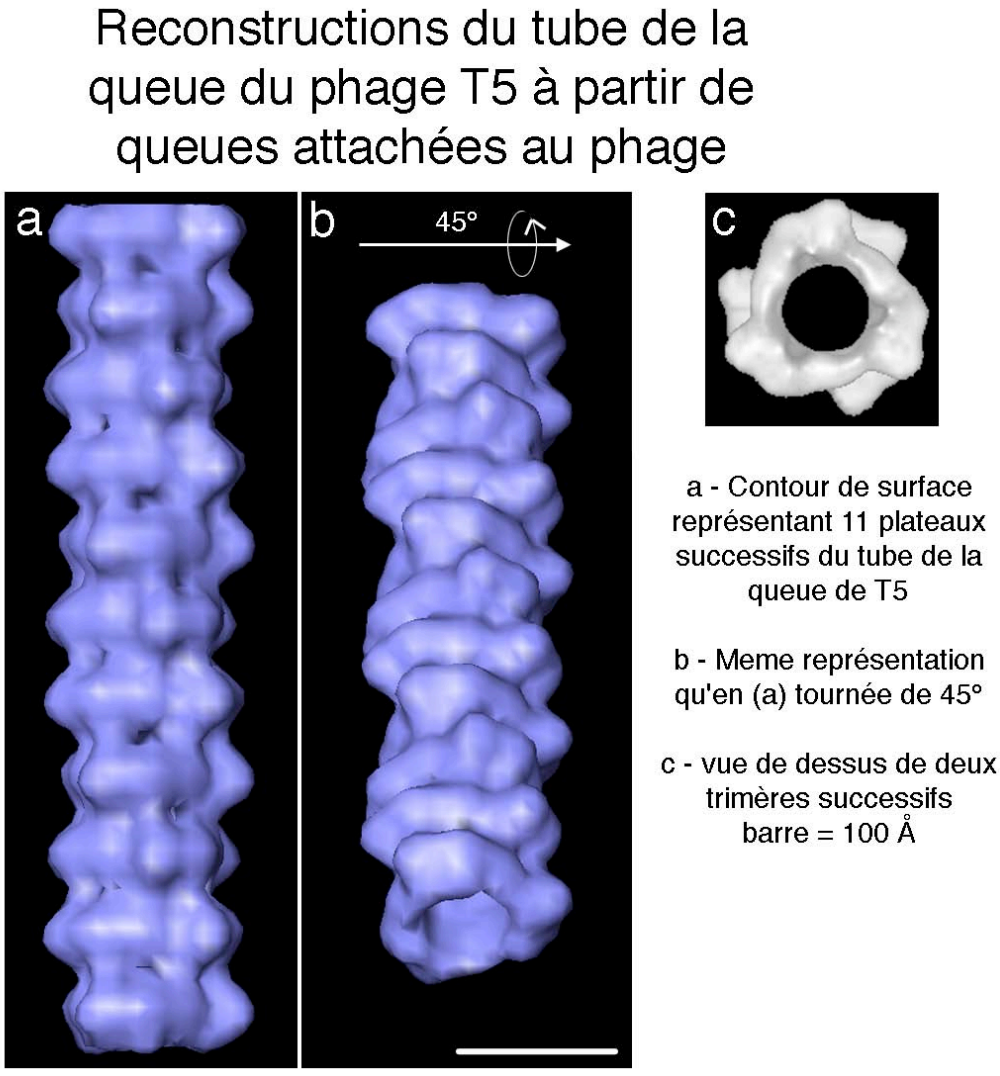


Figure 15

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

C. Analyse de la partie distale de la queue de T5 en coloration négative

La partie distale de la queue de T5 est une structure complexe constituant l'appareil sensoriel et perforateur du phage. Une reconstruction, préliminaire à une analyse plus complète, a été obtenue en coloration négative pour une portion du tube à symétrie hélicoïdale attaché à la partie distale (figure 16). Un petit plateau de base est apparent entre la fin du tube et la pointe d'une forme conique. L'extrémité de la pointe conique constituée par la protéine pb2 et dont le rôle est de transpercer les membranes bactériennes n'apparaît pas totalement sur la reconstruction du fait des fortes courbures de celle-ci sur les micrographies. Il en est de même des 3 longues fibres en forme de L pour lesquelles aucune densité ne peut être attribuée. Cependant, en comparant avec les micrographies (figure 16b), le site d'attachement de ces fibres semblerait se trouver au niveau du plateau de base. Les dimensions de celui-ci sont de ~175 Å de diamètre pour une hauteur de 40 Å, environ la hauteur des disques du long tube.

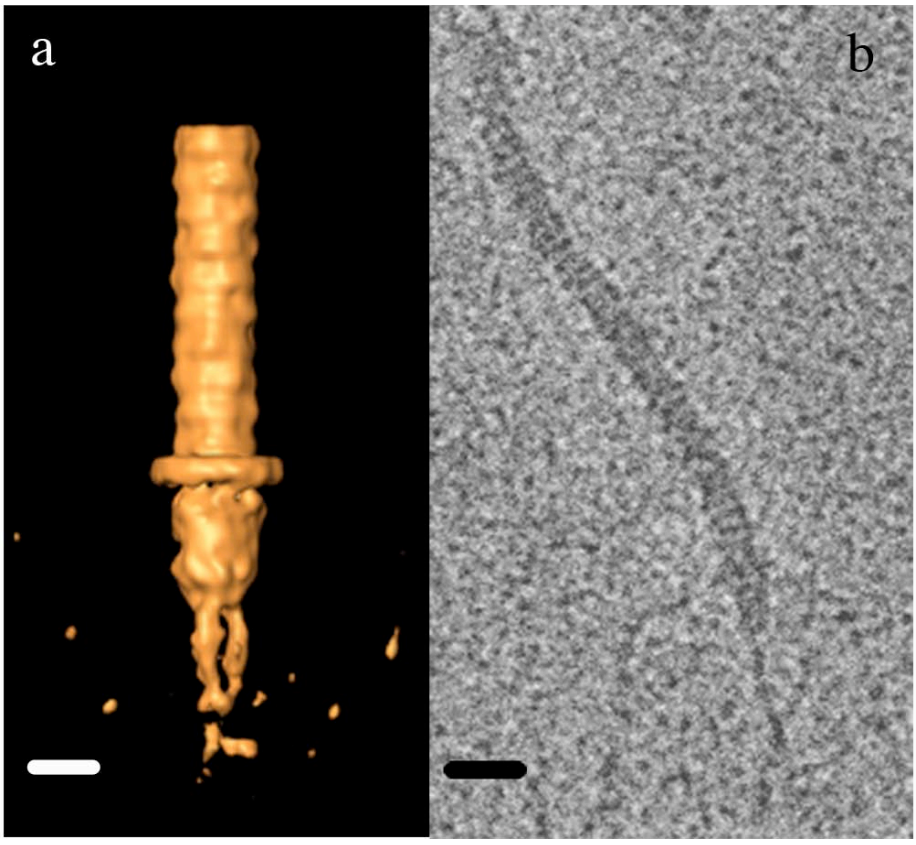


Figure 16 – (a) Reconstruction de la partie distale de la queue de T5 attachée à une portion de tube (barre = 100 Å) – (b) Queue de T5 prise en coloration négative (barre = 200 Å)

VI. Reconstruction du complexe capside/queue - Visualisation du connecteur

Le connecteur est un complexe protéique très important dans le cycle de vie des bactériophages en étant la porte d'entrée et de sortie de l'ADN viral. Chez T5, il semble être composé principalement par la protéine portail pb7. Chez le phage infectieux, cette protéine est clivée en N-terminale après Lys 10 pour donner une protéine mature de 44 kDa. D'une manière identique à de nombreux phages, pb7 forme un dodécamère situé à l'un des sommets de la capside (Zweig et Cummings, 1973).

Nous avons déterminé une structure préliminaire de la capside vide de T5 avec une partie de la queue attachée. En partant des orientations icosaédriques déterminées pour la capside vide, la symétrie fut réduite afin de ne conserver qu'une symétrie d'ordre 5 autour de l'axe du bout de queue. Bien que cette symétrie ne soit pas appropriée pour le connecteur (symétrie d'ordre 12) et la queue (symétrie d'ordre 3), la reconstruction obtenue permet de localiser ces structures (figure 17).

Étant donné la symétrie réduite, la taille proportionnellement grande des capsides comparée au bout de queue et au connecteur, la concentration élevée en phages créant des problèmes de juxtaposition des capsides et la flexibilité des queues, la reconstruction n'est pas de très bonne qualité. Néanmoins, les contours définissant la capside, la queue et le connecteur sont clairement apparents sur la carte de densité. Notamment, des densités internes au niveau du sommet de la capside où s'accroche la queue sont visibles et associées à la présence du connecteur. La densité représentant la queue est continue avec celle du connecteur. Au niveau de la jonction queue/capside, la structure s'élargit légèrement. Les dimensions des structures internes à la capside sont d'environ 100 Å de long suivant l'axe de la queue, pour un diamètre allant d'environ 150 Å proche de la capside à 50 Å pour les structures les plus internes.

Par comparaison avec les sommets de la capside non occupés par le connecteur et en se basant sur les dimensions trouvées, schématiquement, celui-ci semble être composé de 3 domaines s'empilant : le premier étant en contact avec la queue, le second constitue l'anneau le plus large à l'intérieur de la capside et le troisième l'anneau le plus petit. Morphologiquement, cette description correspond bien à celle décrite par la structure du connecteur des phages SPP1 (Orlova et al., 2003) et T7 (Agirrezabala et al., 2005) composé par la tige (proche de la queue), les 12 ailettes constituant le corps central le plus large et la

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

couronne (ou sommet) plus petite, située le plus à l'intérieur de la capside. Aussi, la distribution en densité du connecteur observée pour T5 ressemble à celle obtenue pour le connecteur gp20 (65 kDa) du phage T4 visualisé *in situ* (Fokine et al., 2004) dont les dimensions diminuent en se rapprochant du centre de la capside.

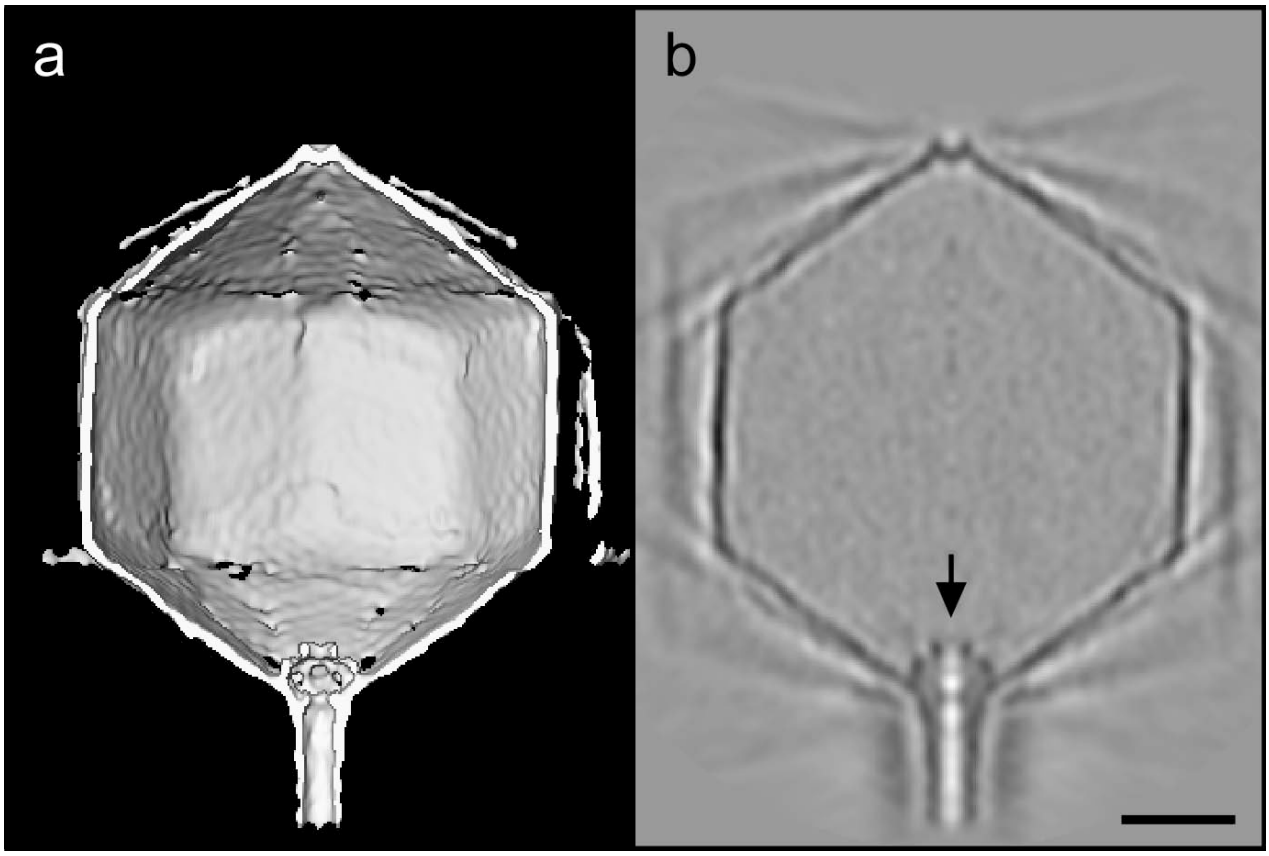


Figure 17 – Reconstruction du complexe capside/queue/connecteur. (a) rendu de surface où la moitié avant a été enlevée (b) section centrale du complexe. Malgré l'imposition de la symétrie d'ordre 5 inappropriée pour à la fois la queue et le connecteur, des densités marquées représentatives de ces 2 structures sont apparentes (barre = 200 Å)

VII. Conclusions et perspectives

A. Détermination d'un modèle initial par coloration négative

Historiquement, les travaux fondateurs de Crowther et al. sur le développement de méthodes d'analyse d'images prises en microscopie furent réalisés à partir d'images prises en coloration négative. Depuis, cette technique a été progressivement mise de côté en faveur de

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

la cryo-microscopie électronique qui permet d'obtenir des images de molécules biologiques dans des conditions proches de leur état natif. La coloration négative continue à être très utile notamment pour une observation rapide de l'échantillon pour juger de sa concentration, de sa pureté et de son état. Elle peut l'être aussi pour déterminer une structure initiale pour laquelle aucun modèle est disponible sous réserve que les particules ne soient pas trop endommagées par l'application du colorant. L'avantage principal est de tirer profit du fort contraste des images prises en coloration négative. La cryo-microscopie reste, bien entendu, la méthode de choix pour atteindre les plus hautes résolutions mais intrinsèquement, les images sont bruitées et possèdent un faible contraste ce qui rend l'analyse d'images difficile lorsqu'il n'y a pas de modèle préalable même dans le cas d'objets hautement symétriques comme les capsides de virus.

Dans le cas du phage T5, après quelques tests pour déterminer quel colorant préservait le mieux la structure de l'échantillon, une analyse rapide de quelques images a été réalisée et une première reconstruction a été obtenue environ 12 heures après l'insertion de la grille dans le microscope. Par la suite, ce modèle a été utilisé avec succès pour débuter l'analyse en cryo-microscopie électronique. Il est fort improbable que le même résultat eût été obtenu aussi rapidement en cryo-microscopie seule et cette approche nous a certainement permis de gagner au minimum quelques jours de travail.

B. Structure de la capside mature de T5

T5 est le premier phage sauvage dont la seule couche protéique composant la capside est organisée suivant un nombre de triangulation T=13. Cependant, cette architecture a déjà été décrite chez l'une des couches protéiques composant la capside des réovirus. Au-delà de cette géométrie de capside semblable, les réovirus sont très différents du phage T5 puisque leur capside est composée de 2 (ou 3) couches protéiques possédant des géométries distinctes : la plus extérieure s'arrangeant suivant une géométrie T = 13 alors que la plus interne possède une géométrie décrite par T = 1 (Hewat et al.. 1994, Lu et al., 1998).

Finalement, la structure à la géométrie la plus proche de la capside de T5 est celle de la capside isométrique du phage T4 dont l'assemblage, suivant une géométrie T = 13, est dû à une mutation dans la protéine de capside majeure gp23 qui, chez le phage T4 sauvage, forme uniquement les hexamères tandis que les pentamères sont formés par gp24 (Iwasaki et al., 2000 ; Olson et al., 2001). Ce mutant possède, comme le virus non modifié, deux protéines de

capside mineure hoc et soc. Soc s'accroche à la périphérie des hexamères mais pas des pentamères et n'a pas d'équivalent chez T5 alors que hoc se fixe aux centres des hexamères mais pas des pentamères comme la protéine pb10 du phage T5. Les similitudes dans la localisation et l'accrochage de ces deux protéines sont très fortes. Nous supposons que l'attachement de pb10 et par analogie celui de hoc, est principalement déterminé par la structure tridimensionnelle locale ce qui explique la présence de pb10 au niveau des hexamères et son absence au niveau des pentamères où les bons acides aminés, responsable de l'attachement au niveau des hexamères, sont dans un environnement spatial différent du fait de la courbure plus importante des sommets. Au niveau des hexamères, nous pensons que six sites d'accrochage sont présents et qu'ils possèdent tous la même affinité pour pb10 étant donné que nous n'observons pas un arrangement préférentiel du lien entre pb10 et la capside. Cependant, l'accrochage au hasard sur l'un (ou plusieurs) des 6 sites bloque de manière stérique la fixation de toute autre molécule de pb10 au niveau de cet hexamère.

C. Similarités structurales avec les protéines de capside majeure de T4 et HK97

Le phage HK97 est le seul bactériophage à doubles brins d'ADN (*Caudovirales*) dont la structure de la capside mature entière a été résolue par cristallographie (Wikoff et al., 2000). Récemment, il a été montré que la protéine gp24, seule, formant les pentamères du phage T4 possède un repliement tridimensionnel similaire à la protéine de capside gp5 d'HK97 et, de cette observation, découle la proposition du même repliement pour gp23 formant les hexamères du phage T4 (Fokine et al., 2005). De plus, à partir de reconstructions obtenues en cryo-microscopie électronique, le repliement d'HK97 – gp5 a aussi été proposé pour les protéines de capside majeure de P22 (Jiang et al., 2003) et ϕ29 (Morais et al., 2005) élargissant ainsi les similitudes entre protéines de capside aux 3 sous-familles (*Siphoviridae*, *Myoviridae* et *Podoviridae*) des bactériophages à doubles brins d'ADN. La modélisation des hexamères et des pentamères de gp5 dans la reconstruction à 19 Å de la capside vide de T5 suggère aussi que pb8 possède le même repliement qu'HK97.

De plus, les similitudes entre ces deux protéines sont étendues aussi aux formes initiales (avant clivage) puisque le domaine Δ des deux protéines est prédit pour former une structure en super hélice. Chez ces deux phages, l'absence de protéine d'échafaudage pose la question de savoir quelle protéine gouverne l'assemblage de ces 2 capsides possédant des géométries

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

différentes (T =7 pour HK97 et T = 13 pour T5). Chez HK97, des résultats ont montré l'importance du domaine Δ dans la formation de la première capside intermédiaire (procapside I). Et nous proposons un rôle similaire pour le domaine Δ de T5 dont la taille plus grande (159 résidus pour T5 contre 102 pour HK97) pourrait bien être en rapport avec une capside finale plus grosse chez T5 que chez HK97 bien que les mécanismes précis, par lesquels cette corrélation soit valable, soient inconnus.

Une manière de clarifier la situation serait d'analyser des mutants au niveau de la protéase du phage T5, afin de bloquer le cycle d'assemblage de la capside au niveau procapside, et de visualiser par reconstruction tridimensionnelle le domaine Δ pour le comparer avec celui d'HK97. Enfin, pour établir si le domaine Δ a un rôle dans la détermination de la géométrie de la capside, il serait particulièrement intéressant de savoir si des chimères des deux protéines de capside, impliquant la fusion du domaine Δ d'un phage avec la forme mature de la protéine de capside de l'autre phage, produisent l'assemblage de particules ressemblant à HK97 mais ayant une géométrie T=13 (et inversement des particules ressemblant à T5 ayant une géométrie T=7).

D. Structure du long tube flexible de la queue du phage T5

Les phages à queue sont généralement classifiés suivant la morphologie de celle-ci. Les *Podoviridae* (phages T7, P22) possèdent une queue se distinguant franchement des autres phages à queue (*Siphoviridae* et *Myoviridae*). Les queues de ces deux dernières sous familles sont constituées entre autres par une structure à symétrie hélicoïdale s'attachant au niveau du connecteur. Chez les *Myoviridae*, cette structure est constituée par l'assemblage de deux tubes, interne et externe, ce dernier se contractant. Les *Siphoviridae* tel T5 sont caractérisés par un tube moins large mais plus long et ne se contractant pas. Les tubes de ces 2 sous familles possèdent aussi une symétrie cyclique d'ordre 3 ou 6 autour de l'axe de la queue. La symétrie d'ordre 6 se retrouve, à notre connaissance, chez toutes les queues de *Myoviridae* (revu par Moody, 1998) alors qu'une symétrie d'ordre 3 a été décrite pour la queue non contractile de phage ϕCbK de *Caulobacter Crescentus* (Leonard et al., 1973). Le tube de la queue de T5 est constitué par la polymérisation de la protéine de queue majeure pb6 qui s'arrange en trimères respectant une symétrie d'ordre 3 suggérant que ce type de symétrie se retrouve uniquement chez les queues non contractiles. Néanmoins, le tube de la queue du

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

phage Lambda (*Siphoviridae*) s'arrange en 32 anneaux successifs constitués par des hexamères de la protéine majeure gpV (Roessner & Ihler, 1984) suggérant fortement une symétrie cyclique d'ordre 6 pour cette queue non contractile.

La symétrie du tube des queues de phages est aussi à mettre en parallèle avec celle des complexes protéines s'attachant au tube à savoir le connecteur d'un côté et la partie distale de la queue (plateau de base et fibres) de l'autre. Or, il apparaît chez tous les phages à queue qu'il y a une correspondance de symétrie (multiple de 3) entre le connecteur, le tube hélicoïdal et la partie distale (Moody, 1998), facilitant dans une certaine mesure leurs interactions. Justement, le transport de l'ADN viral de la capside au travers des membranes bactériennes se fait par un canal continu s'établissant du connecteur jusqu'à l'extrémité de la queue. Lorsque le phage n'est pas en phase d'infection (non accroché à la bactérie), le passage pour l'ADN est bloqué à la fois au niveau du connecteur et probablement de la pointe de la queue étant donné que l'on ne voit pas de structure interne (ADN) sur les reconstructions du tube des queues de T5 attachées à la capside (figure 15).

Par ailleurs, le diamètre du canal central du tube de la queue de T5 est de 40 Å et est donc largement suffisant pour le passage d'une molécule d'ADN ayant un diamètre moyen de 23 Å dans sa forme B. Cette observation va dans le sens d'interaction faible entre l'intérieur du tube et la molécule d'ADN droite en translation, suggérant que le tube serve simplement de guide au génome viral lors de l'éjection. Cependant, à la fois *in vivo* et *in vitro*, l'injection de l'ADN de T5 se fait en plusieurs étapes (De Frutos et al., 2004). *In vitro*, il a été proposé que les pauses dans l'éjection de l'ADN soient corrélées avec des régions de l'ADN n'ayant pas une forme linéaire et agissant comme des bouchons lors de leurs passages au travers du connecteur et de la queue (Mangenot et al., 2005). Si tel est le cas, la reconstruction obtenue pour le complexe capside/connecteur/queue (figure 17) suggère que l'inhibition du transport de l'ADN se ferait plus vraisemblablement au niveau du connecteur où la constriction du canal est la plus forte.

E. Perspectives

Pour les queues contractiles type T4, l'ouverture du connecteur et le début du transfert de l'ADN viral sont causés par plusieurs changements de conformation en cascade commençant à l'extrémité de la queue pour se propager ensuite par la contraction progressive du tube externe de la queue (Leiman et al., 2004). Chez le phage T5, possédant une queue non

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

contractile, la pointe de la queue (pb2) traverse la bicouche lipidique et subit en parallèle un changement de conformation majeur réduisant sa taille de 50 à 23 nm et augmentant son diamètre de 2 à 4 nm (Böhm et al., 2001). Par analogie avec T4, cet événement est sûrement déclencheur de réactions en chaîne se transmettant le long du tube de la queue jusqu'au connecteur entraînant ainsi la sortie de l'ADN de la capside. La queue de T5 joue à l'évidence un rôle primordial dans le processus de déclanchement du transfert de l'ADN de la capside vers l'intérieur de la bactérie.

Cette étude a confirmé que la capside est une structure remarquable pour contenir le génome sous une forme stable tout en s'accommodant de la forte pression interne. La capside de T5 conserve toute son intégrité et reste quasi inchangée après une violente sortie de l'ADN causée par un traitement à l'urée qui entraîne tout de même la disparition de la partie distale de la queue et souvent d'une partie du tube hélicoïdal.

Une approche similaire pourrait consister à analyser les différents complexes (connecteur et queue) avant et après l'éjection de l'ADN. *In vitro*, l'ajout de FhuA, le récepteur de T5, cause l'éjection de l'ADN (Boulanger et al., 1996). Une analyse détaillée similaire à celle qui a été faite ici sur ce complexe phage/récepteur pourrait apporter des résultats intéressants à recouper avec les résultats obtenus dans ce mémoire et à obtenir sur la caractérisation complète du phage sauvage.

À notre sens, la flexibilité du long tube de la queue de T5 (sans parler des longues fibres) empêche toute analyse d'image traitant le phage entier comme une molécule isolée. La méthode utilisée dans cette étude consistant à analyser séparément chaque constituant et leur connexion devrait mener à la caractérisation du phage complet (figure 18).

Le transfert de l'ADN de T5 étant un processus dynamique, une meilleure connaissance des protéines régulant ce phénomène serait obtenue en caractérisant certaines étapes intermédiaires dans le transport de l'ADN de la capside vers l'extérieur. *In vitro*, des études récentes ont montré que l'éjection de l'ADN de T5 se faisait en plusieurs étapes, sur des périodes de temps variables et pouvait même être inhibée (De Frutos et al., 2005 ; Mangenot et al., 2005) ouvrant ainsi la possibilité d'étudier structurellement des états intermédiaires dans le transport de l'ADN de la capside de T5 vers l'extérieur.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

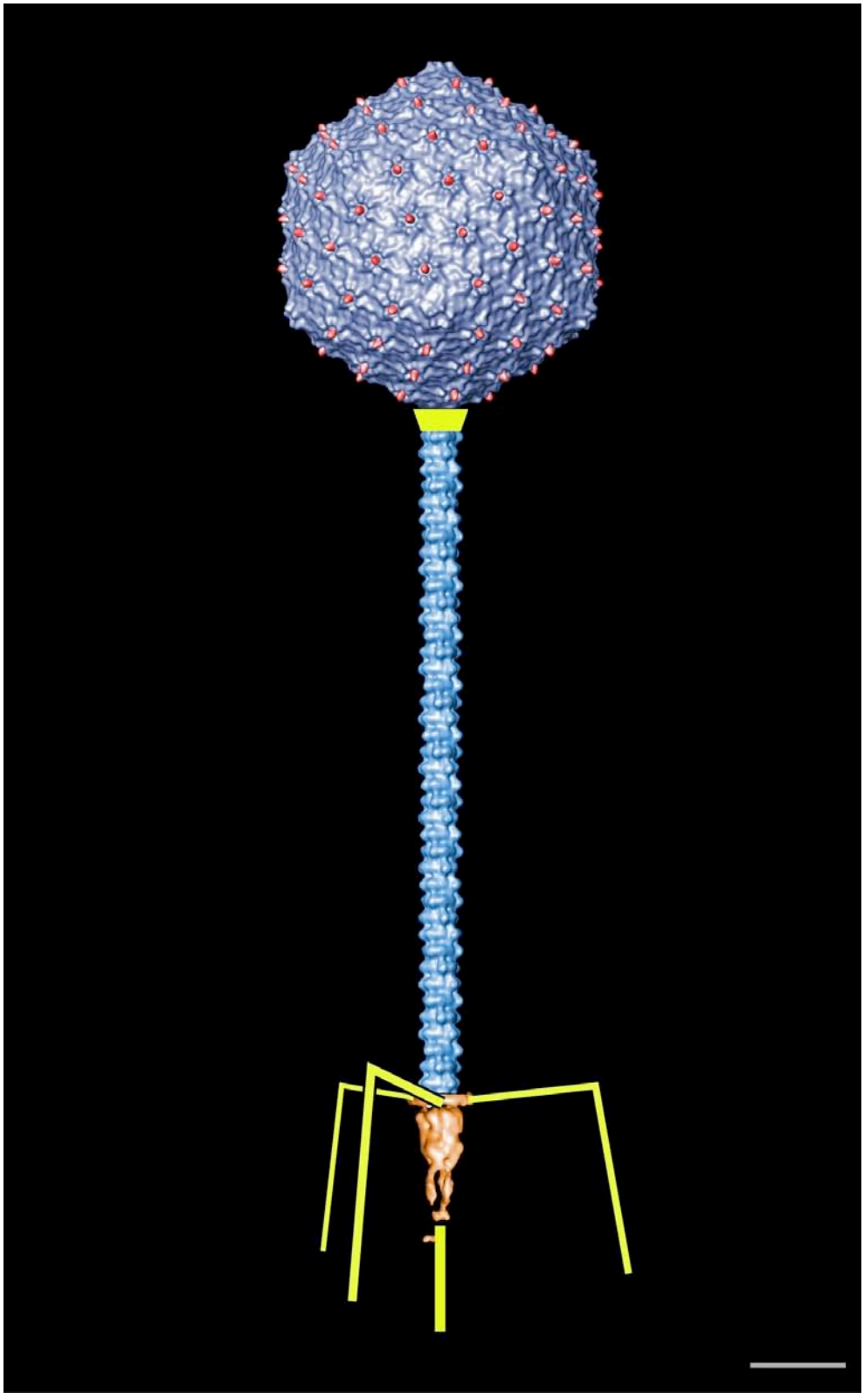


Figure 18 – Représentation quasi complète du phage T5. Cette image a été générée à partir des structures résolues de manière indépendante de la capside (cryo-microscopie), du tube hélicoïdale (cryo-microscopie) et de la pointe (coloration négative). Le connecteur à la jonction capside – queue ainsi que les différentes fibres de queue sont représentées schématiquement (barre = 250 Å)

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

VIII. Matériels et Méthodes

A. Préparation des capsides vides

Une aliquote de l'échantillon contenant les phages T5 complets est incubé 2h à 37°C dans un bain thermostaté dans une solution à 2M en Urée. En observant en coloration négative, ce traitement cause l'éjection de l'ADN empaqueté dans la plupart des capsides. Après l'ajout de DNAaseI (10 μg/mL, 30 min), les capsides vides sont récupérées après une centrifugation sur gradient de chlorure de césium (d = 1.3 - 1.7, 24000 rpm, 3h30, rotor Beckman SW40) et une dialyse dans 10 mM TrisHCl (pH = 7,5), 10 mM $MgCl_2$.

La préparation des capsides vides causant l'élimination de la protéine de décoration pb10 suit le protocole décrit dans le paragraphe précédant sauf que l'incubation dans l'Urée est remplacée par une incubation à température ambiante dans une solution à 4M en chlorure de guanidinium (GuHCl) pendant 1h pour l'élimination partielle de pb10 et pendant 2h supplémentaires pour l'élimination quasi-totale.

B. Microscopie électronique et analyse des données

La méthode de préparation des échantillons (coloration négative et cryo-microscopie électronique) ainsi que la prise d'image et l'analyse des données ont été réalisés suivant les méthodes décrites dans la partie « matériels et méthodes » page 71.

La reconstruction de la capside du phage T5 contenant l'ADN viral a été calculée à partir de 1524 particules sélectionnées sur un total de 2337, collectées à partir de 25 paires focales et la résolution estimée, pour une FSC de 0.3, est de 20 Å.

Concernant la reconstruction de la capside vide, 2651 sur 3177 particules, réparties sur 20 paires focales, ont été utilisées et la résolution estimée est de 19 Å. La reconstruction pour le mutant pb10- a été obtenue à 31 Å à partir de 258 sur 278 particules.

Pour l'analyse d'images visant à étudier le complexe capside / connecteur / queue, un cylindre modélisant la queue du phage a été ajouté à l'un des 12 sommets de la reconstruction icosaédrique de la capside vide de T5. Ce modèle de départ hybride est ensuite correctement orienté suivant l'axe de symétrie d'ordre 5 où le cylindre a été ajouté. À partir de là, les

images, dont les orientations « icosaédriques » sont connues, sont comparées à ce modèle de départ en appliquant seulement la symétrie d'ordre 5 autour de l'axe de la queue. La reconstruction (figure 17) a été obtenue après quelques cycles itératifs d'affinement des orientations et de reconstruction à partir des particules ayant les meilleurs coefficients de corrélation, et elle inclut 1192 images pour une résolution de 35 Å.

C. Analyses de séquence

Les prédictions de super hélices pour les domaines Δ de T5 et HK97 ont été réalisées sur le site du « Pôle Bioinformatique Lyonnais – Network Protein Sequence Analysis » (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_lupas.html) à partir de la méthode décrite par Lupas (Lupas et al., 1991).

L'alignement de séquence entre les formes matures de pb8 – T5 et gp5 – HK97 a été obtenu avec PSI-BLAST après la seconde itération (Altschul et al., 1997).

Les résultats sur les prédictions de repliement similaire ont été obtenus en soumettant la séquence primaire de la forme mature de pb8 sur le serveur de prédiction du « Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering – Fold Prediction Metaserver » (http:// www.genesilico.pl/meta/).

D. Reconstruction hélicoïdale du tube de la queue de T5

Des images de l'échantillon contenant les queues de T5 pures furent prises en coloration négative (Acétate d'uranyle) et en cryo-microscopie électronique à un grossissement de 45000 et 38000 respectivement. Les plans films ont été numérisés à un pas de 7 μm pour ceux issus de la cryo-microscopie et de 14 μm pour les images prises en coloration négative donnant un échantillonnage respectif de 1.84 Å et de 3.11 Å. Les portions de queue ont été sélectionnées avec le programme x3d et les boîtes extraites avaient une taille de 279*279 pixels en cryo-microscopie et 131*131 en coloration négative. Les sélections se sont faites sur les tubes les plus droits et de manière à ce que deux aires de sélection successives d'une même queue se chevauchent sur environ 70 %, étant donné que la redondance au niveau de deux segments hélicoïdaux successifs reliés par un déplacement

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

axial peut fournir des informations importantes sur les symétries hélicoïdales (Egelman, 2000).

3416 et 1866 segments furent ainsi obtenus en cryo-microscopie et en coloration négative à partir de respectivement 10 et 12 micrographies. 2070 segments furent ainsi sélectionnés sur des queues attachées à des phages complets.

La sous focalisation de chaque image fut déterminée en utilisant les programmes SUMPS et CFTZEROS. Tous les segments furent corrigés des effets de la CTF en inversant les phases de celles-ci pour chaque image en utilisant le programme CTFMIX (Conway et al., 1999).

Ensuite, les données furent converties au format SPIDER qui sert de support à la méthode IHRSR développée par Edward Egelman (Egelman, 2000). La distance entre chaque anneau du tube de la queue de T5 (38 Å et 43.8 Å en coloration négative et en cryo-microscopie respectivement) fut déterminée en calculant la transformée de Fourier des tubes les plus droits et les plus longs en utilisant le programme Ximdisp. Le modèle de départ utilisé dans le premier cycle d'itération est un cylindre dont les dimensions correspondent à celles des segments de queue sélectionnés (279 pixels de hauteur, 16 pixels de rayon en cryo-microscopie et 131 pixels de hauteur pour un rayon de 19 pixels en coloration négative). Le modèle de référence est tourné par incréments de 4° autour de l'axe vertical du tube et à chaque incrément, ce modèle est projeté pour obtenir au final 90 projections bidimensionnelles de référence qui sont comparées aux segments sélectionnés à partir des images. Pour chaque segment, l'angle azimutal, la rotation dans le plan, les déplacements axiaux dans le plan et un coefficient de corrélation avec la meilleure projection du modèle sont déterminés. Les meilleures particules sont sélectionnées à partir des plus forts coefficients de corrélation et, la rotation et les déplacements dans le plan sont appliqués aux images sélectionnées. Ces images alignées dont les orientations azimutales sont connues, sont utilisées pour calculer la reconstruction tridimensionnelle par projection inverse. En coloration négative, ce calcul se fait sans imposer de symétrie alors qu'en cryo-microscopie, une symétrie d'ordre 3 autour de l'axe de tube est imposée à ce niveau. Une minimisation par moindre carré est faite sur ce volume pour déterminer les nouveaux paramètres hélicoïdaux Z (distance entre 2 sous unités successives de l'hélice) et α (angle entre 2 sous unités successives de l'hélice) qui sont finalement appliqués à la reconstruction qui rentre à son tour dans un nouveau cycle itératif jusqu'à ce qu'une solution stable soit obtenue.

L'estimation de la résolution a été faite d'une manière identique à celle décrite pour les reconstructions icosaédriques.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Origine du tube	Nombre de segments sélectionnés	Nombre de segments inclus dans la reconstruction	Nombre de cycles d'affinement	Symétrie imposée	Résolution (FSC = 0.5)
Queue isolée Coloration négative	1866	1205	66	aucune	37 Å
Queue isolée Cryo-microscopie	3417	2417	73	trois	33 Å
Queue attachée Cryo-microscopie	2070	1559	80	trois	31,5 Å

E. Reconstruction de la partie distale de la queue de T5

Les images à analyser, sélectionnées avec x3d, ont ensuite été converties au format SPIDER et le taux d'échantillonnage des sélections a été réduit à 6.22 Å/pixel. 458 parties distales sélectionnées furent analysées de la même manière que le tube de la queue de T5 à quelles différences près. Le modèle de départ était une superposition de 3 cylindres représentant les dimensions de la portion de tube, du plateau de base et la structure conique. Dans un premier temps, afin d'obtenir un premier modèle un peu plus représentatif, une symétrie d'ordre 3 axiale fut appliquée lors des reconstructions. Ensuite, seule la symétrie hélicoïdale a été imposée, uniquement sur la portion correspondant au tube. Le modèle final (figure 16) inclut 400 particules.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Conclusions

Les études structurales en biologie sont motivées par l'idée qu'il existe une relation entre la structure et la fonction des protéines. Plusieurs méthodes permettent d'obtenir la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques. Parmi ces méthodes, la cryo-microscopie électronique associée à la reconstruction d'images est un outil essentiel de la biologie structurale. Cette approche permet d'obtenir la structure de complexes fonctionnels à haute résolution, soit directement, soit dans le cadre d'approches hybrides avec la cristallographie aux rayons X. Il est donc possible d'utiliser la cryo-microscopie électronique pour étudier, dans des conditions biochimiques bien définies, des assemblages macromoléculaires et des structures complexes, multiprotéiques et nucléoprotéiques, tels les virus, les ribosomes, les polymères du cytosquelette, jouant des rôles très importants en biologie cellulaire.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé la cryo-microscopie électronique et la coloration négative pour caractériser différents types de sous structures composant les bactériophages matures ou intervenant dans le processus de maturation de ces phages. Les méthodes de reconstruction sont maintenant bien établies pour les objets possédant une certaine symétrie interne comme les capsides à symétrie icosaédrique et les filaments à symétrie hélicoïdale.

À défaut de réaliser une analyse d'images sur le virus entier, rendue difficile par la flexibilité de certaines structures, les différents complexes protéiques composant le phage T5 ont été analysés indépendamment afin de profiter des symétries propres à chacun de ces complexes. Cette méthode s'est montrée efficace dans la caractérisation de la capside, du tube hélicoïdal et de la partie distale de la queue. Ainsi, une modélisation (seulement quasi-complète à l'heure actuelle) du phage T5 a été faîte et ces premiers résultats posent les bases de futurs travaux sur la visualisation des changements structuraux associés à l'éjection de l'ADN viral.

Les virus sont cependant plus complexes qu'une simple juxtaposition de structures ayant des symétries différentes. Les brisures de symétrie sont nombreuses et sont généralement caractéristiques de protéines ou complexes protéiques ayant des fonctions

biologiques d'importance. Ainsi, de nombreuses structures ne sont pas visualisées ou le sont seulement de manière incomplète du fait de l'application de symétries inappropriées. Néanmoins, ce problème peut être surmonté par différents moyens et des méthodes alternatives de reconstruction *in situ* sont mises au point (Briggs et al., 2005).

Chez les bactériophages, le connecteur emboîté à l'un des sommets de la capside icosaédrique et la protéine d'échafaudage formant une structure interne à la capside sont typiquement des exemples de structures ayant des fonctions cruciales et où l'imposition des symétries icosaédriques nuit à la visualisation *in situ* de ces composants. Chez le phage Gifsy-2, la procapside dite « foncée » contient de faibles structures internes sur une épaisseur d'environ 100 Å, mais du fait de la symétrie icosaédrique imposée, seuls les points de contact entre ces structures internes et la capside sont visibles sur les reconstructions.

Le connecteur des phages à queue est une structure unique située à l'un des sommets de la capside et est complètement moyenné lorsque la symétrie icosaédrique de la capside est appliquée. Pour le phage T5, nous avons montré que la réduction de symétrie, même inappropriée, consistant à n'imposer qu'une symétrie d'ordre 5 (au lieu de 532) selon l'axe du complexe connecteur/queue, conduisait à la visualisation *in situ* à basse résolution du connecteur. L'augmentation du nombre de particules analysées ou une reconstruction spécifique de la zone de liaisons queue/capside/connecteur en utilisant le modèle à basse résolution comme référence conduira sûrement à une amélioration de la reconstruction.

Cependant, les reconstructions des capsides à symétrie icosaédrique par cryo-microscopie électronique sont toujours riches en informations. L'amélioration de la résolution de ces structures chez différents phages a mis en évidence les similarités morphologiques existant entre ces virus infectant différentes bactéries (forme des pentamères et des hexamères). Dans le cadre de cette étude, la structure des capsides de Gifsy-2 et T5 ont mis en évidence des similarités structurales avec respectivement le phage Lambda d'un côté et les phages HK97 et T4 de l'autre. En complément des études menées en biochimie et en biologie moléculaire, les structures analysées en cryo-microscopie électronique peuvent répondre à certaines questions restées en suspens. Combinées avec la caractérisation de mutants, les protéines décorant la surface des capsides sont localisables et identifiables comme dans le cas

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

de la protéine pb10 du phage T5, analogue à la protéine Hoc du phage T4.

Aussi, l'étude de différents intermédiaires de réaction a mis en évidence dans le cas du phage Gifsy-2, une protéine de capside mineure, structurellement similaire à la protéine GpD du phage Lambda et qui n'a pas un simple rôle de décoration étant donné qu'elle est requise pour obtenir une capside d'un plus grand diamètre. De plus, l'identification chez les procapsides et les capsides matures de Gifsy-2 de la protéine de capside majeure en partie C-terminale d'un gène regroupant la plupart des fonctions nécessaires à la construction et à la maturation des capsides de phage, met en avant une particularité et une stratégie nouvelle employée par les phages à queue pour modifier leur cycle d'assemblage. Ainsi, la caractérisation structurale peut amener une meilleure compréhension de la fonction et des changements requis pour l'accomplissement de phénomènes plus complexes comme l'expansion et la stabilisation des virus.

Combinée dans une approche hybride avec la cristallographie aux rayons X, le repliement de la protéine de capside majeure d'HK97 a été trouvée chez plusieurs bactériophages à partir de modèles obtenus en cryo-microscopie électronique grâce à l'identification de structures secondaires communes. Les travaux réalisés sur Gifsy-2 et T5 dans cette étude vont aussi dans le même sens bien que les corrélations avec HK97 ne puissent pas aller jusqu'aux structures secondaires étant donné la résolution. Les similitudes entre T5 et HK97, en extrapolant un peu plus, semblent aussi exister au niveau des mécanismes de maturation de leur capside. Tous les deux ne possèdent pas de protéine d'échafaudage indépendante mais un domaine N-terminal qui est clivé durant l'assemblage pour donner des protéines de capside majeure d'une longueur similaire mais formant des capsides de taille bien différentes (T =7 pour HK97 et T= 13 pour T5). La aussi, la caractérisation de procapside de T5 défectueuse au niveau de leur fonction protéase pourrait amener à l'éventuelle localisation et identification d'un domaine Δ chez T5.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Bibliographie

Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol 154, 245-251.

Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., and McDowall, A. W. (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. Nature 308, 32-36.

Agirrezabala, X., Martin-Benito, J., Valle, M., Gonzalez, J. M., Valencia, A., Valpuesta, J. M., and Carrascosa, J. L. (2005). Structure of the connector of bacteriophage T7 at 8A resolution: structural homologies of a basic component of a DNA translocating machinery. J Mol Biol 347, 895-902.

Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. Cell 92, 291-294.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25, 3389-3402.

Athappilly, F. K., Murali, R., Rux, J. J., Cai, Z., and Burnett, R. M. (1994). The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2.9 A resolution. J Mol Biol 242, 430-455.

Baker, T. S., and Cheng, R. H. (1996). A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. J Struct Biol 116, 120-130.

Baker, T. S., Olson, N. H., and Fuller, S. D. (1999). Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. Microbiol Mol Biol Rev 63, 862-922, table of contents.

Becker, B., de la Fuente, N., Gassel, M., Gunther, D., Tavares, P., Lurz, R., Trautner, T. A., and Alonso, J. C. (1997). Head morphogenesis genes of the Bacillus subtilis bacteriophage SPP1. J Mol Biol 268, 822-839.

Benevides, J. M., Bondre, P., Duda, R. L., Hendrix, R. W., and Thomas, G. J., Jr. (2004). Domain structures and roles in bacteriophage HK97 capsid assembly and maturation. Biochemistry 43, 5428-5436.

Benson, S. D., Bamford, J. K., Bamford, D. H., and Burnett, R. M. (1999). Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structures. Cell 98, 825-833.

Bohm, J., Lambert, O., Frangakis, A. S., Letellier, L., Baumeister, W., and Rigaud, J. L. (2001). FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: a cryo-electron tomography study. Curr Biol 11, 1168-1175.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Bottcher, B., Wynne, S. A., and Crowther, R. A. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. Nature 386, 88-91.

Boulanger, P., le Maire, M., Bonhivers, M., Dubois, S., Desmadril, M., and Letellier, L. (1996). Purification and structural and functional characterization of FhuA, a transporter of the Escherichia coli outer membrane. Biochemistry 35, 14216-14224.

Briggs, J. A., Huiskonen, J. T., Fernando, K. V., Gilbert, R. J., Scotti, P., Butcher, S. J., and Fuller, S. D. (2005). Classification and three-dimensional reconstruction of unevenly distributed or symmetry mismatched features of icosahedral particles. J Struct Biol 150, 332-339.

Casjens, S. (2003). Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? Mol Microbiol 49, 277-300.

Caspar, D. L., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 27, 1-24.

Caston, J. R., Belnap, D. M., Steven, A. C., and Trus, B. L. (1999). A strategy for determining the orientations of refractory particles for reconstruction from cryo-electron micrographs with particular reference to round, smooth-surfaced, icosahedral viruses. J Struct Biol 125, 209-215.

Cerritelli, M. E., Cheng, N., Rosenberg, A. H., McPherson, C. E., Booy, F. P., and Steven, A. C. (1997). Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. Cell 91, 271-280.

Cerritelli, M. E., Conway, J. F., Cheng, N., Trus, B. L., and Steven, A. C. (2003). Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment. Adv Protein Chem 64, 301-323.

Chacon, P., and Wriggers, W. (2002). Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. J Mol Biol 317, 375-384.

Chiu, W., Baker, M. L., Jiang, W., and Zhou, Z. H. (2002). Deriving folds of macromolecular complexes through electron cryomicroscopy and bioinformatics approaches. Curr Opin Struct Biol 12, 263-269.

Conway, J. F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., and Steven, A. C. (1997). Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. Nature 386, 91-94.

Conway, J. F., Duda, R. L., Cheng, N., Hendrix, R. W., and Steven, A. C. (1995). Proteolytic and conformational control of virus capsid maturation: the bacteriophage HK97 system. J Mol Biol 253, 86-99.

Conway, J. F., and Steven, A. C. (1999). Methods for reconstructing density maps of "single" particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. J Struct Biol 128, 106-118.

Conway, J. F., Wikoff, W. R., Cheng, N., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Johnson, J. E., and

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Steven, A. C. (2001). Virus maturation involving large subunit rotations and local refolding. Science 292, 744-748.

Crowther, R. A. (1971). Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 261, 221-230.

Crowther, R. A., Amos, L. A., Finch, J. T., De Rosier, D. J., and Klug, A. (1970). Three dimensional reconstructions of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs. Nature 226, 421-425.

Davis, B. M., and Waldor, M. K. (2003). Filamentous phages linked to virulence of Vibrio cholerae. Curr Opin Microbiol 6, 35-42.

de Frutos, M., Letellier, L., and Raspaud, E. (2005). DNA ejection from bacteriophage T5: analysis of the kinetics and energetics. Biophys J 88, 1364-1370.

Dokland, T., and Murialdo, H. (1993). Structural transitions during maturation of bacteriophage lambda capsids. J Mol Biol 233, 682-694.

Droge, A., Santos, M. A., Stiege, A. C., Alonso, J. C., Lurz, R., Trautner, T. A., and Tavares, P. (2000). Shape and DNA packaging activity of bacteriophage SPP1 procapsid: protein components and interactions during assembly. J Mol Biol 296, 117-132.

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowall, A. W., and Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. Q Rev Biophys 21, 129-228.

Duda, R. L. (1998). Protein chainmail: catenated protein in viral capsids. Cell 94, 55-60.

Duda, R. L., Hempel, J., Michel, H., Shabanowitz, J., Hunt, D., and Hendrix, R. W. (1995). Structural transitions during bacteriophage HK97 head assembly. J Mol Biol 247, 618-635.

Duda, R. L., Martincic, K., and Hendrix, R. W. (1995). Genetic basis of bacteriophage HK97 prohead assembly. J Mol Biol 247, 636-647.

Egelman, E. H. (2000). A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. Ultramicroscopy 85, 225-234.

Fane, B. A., and Prevelige, P. E., Jr. (2003). Mechanism of scaffolding-assisted viral assembly. Adv Protein Chem 64, 259-299.

Figueroa-Bossi, N., and Bossi, L. (1999). Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. Mol Microbiol 33, 167-176.

Figueroa-Bossi, N., Coissac, E., Netter, P., and Bossi, L. (1997). Unsuspected prophage-like elements in Salmonella typhimurium. Mol Microbiol 25, 161-173.

Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D., and Bossi, L. (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in Salmonella. Mol

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Microbiol 39, 260-271.

Fokine, A., Chipman, P. R., Leiman, P. G., Mesyanzhinov, V. V., Rao, V. B., and Rossmann, M. G. (2004). Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 6003-6008.

Fokine, A., Leiman, P. G., Shneider, M. M., Ahvazi, B., Boeshans, K. M., Steven, A. C., Black, L. W., Mesyanzhinov, V. V., and Rossmann, M. G. (2005). Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 7163-7168.

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

Gilakjan, Z. A., and Kropinski, A. M. (1999). Cloning and analysis of the capsid morphogenesis genes of Pseudomonas aeruginosa bacteriophage D3: another example of protein chain mail? J Bacteriol 181, 7221-7227.

Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Ruth, F. X., Valpuesta, J. M., Sousa, N., Carrascosa, J. L., and Coll, M. (2002). Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle. J Mol Biol 315, 663-676.

Guenebaut, V., Maaloum, M., Bonhivers, M., Wepf, R., Leonard, K., and Horber, J. K. (1997). TEM moire patterns explain STM images of bacteriophage T5 tails. Ultramicroscopy 69, 129-137.

Helgstrand, C., Wikoff, W. R., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Johnson, J. E., and Liljas, L. (2003). The refined structure of a protein catenane: the HK97 bacteriophage capsid at 3.44 A resolution. J Mol Biol 334, 885-899.

Heller, K., and Braun, V. (1979). Accelerated adsorption of bacteriophage T5 to Escherichia coli F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. J Bacteriol 139, 32-38.

Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophages: evolution of the majority. Theor Popul Biol 61, 471-480.

Hendrix, R. W. (2004). Hot new virus, deep connections. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 7495-7496.

Hendrix, R. W., and Casjens, S. R. (1975). Assembly of bacteriophage lambda heads: protein processing and its genetic control in petit lambda assembly. J Mol Biol 91, 187-199.

Hendrix, R. W., and Duda, R. L. (1998). Bacteriophage HK97 head assembly: a protein ballet. Adv Virus Res 50, 235-288.

Hendrix, R. W., Smith, M. C., Burns, R. N., Ford, M. E., and Hatfull, G. F. (1999). Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 2192-2197.

Hewat, E. A., Booth, T. F., and Roy, P. (1994). Structure of correctly self-assembled

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

bluetongue virus-like particles. J Struct Biol 112, 183-191.

Heymann, J. B. (2001). Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy. J Struct Biol 133, 156-169.

Heymann, J. B., Cheng, N., Newcomb, W. W., Trus, B. L., Brown, J. C., and Steven, A. C. (2003). Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. Nat Struct Biol 10, 334-341.

Heymann, J. B., Conway, J. F., and Steven, A. C. (2004). Molecular dynamics of protein complexes from four-dimensional cryo-electron microscopy. J Struct Biol 147, 291-301.

Ho, T. D., Figueroa-Bossi, N., Wang, M., Uzzau, S., Bossi, L., and Slauch, J. M. (2002). Identification of GtgE, a novel virulence factor encoded on the Gifsy-2 bacteriophage of Salmonella enterica serovar Typhimurium. J Bacteriol 184, 5234-5239.

Ho, T. D., and Slauch, J. M. (2001). OmpC is the receptor for Gifsy-1 and Gifsy-2 bacteriophages of Salmonella. J Bacteriol 183, 1495-1498.

Hohn, T., Flick, H., and Hohn, B. (1975). Petit lambda, a family of particles from coliphage lambda infected cells. J Mol Biol 98, 107-120.

Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. J Mol Graph 14, 33-38, 27-38.

Iwasaki, K., Trus, B. L., Wingfield, P. T., Cheng, N., Campusano, G., Rao, V. B., and Steven, A. C. (2000). Molecular architecture of bacteriophage T4 capsid: vertex structure and bimodal binding of the stabilizing accessory protein, Soc. Virology 271, 321-333.

Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M. L., Prevelige, P. E., Jr., and Chiu, W. (2003). Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. Nat Struct Biol 10, 131-135.

Johnson, J. E. (1996). Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 27-33.

Johnson, J. E., and Speir, J. A. (1997). Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies. J Mol Biol 269, 665-675.

Kanamaru, S., Leiman, P. G., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., and Rossmann, M. G. (2002). Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. Nature 415, 553-557.

Katsura, I. (1989). Structure and inherent properties of the bacteriophage lambda head shell. VI. DNA-packaging-defective mutants in the major capsid protein. J Mol Biol 205, 397-405.

Kostyuchenko, V. A., Leiman, P. G., Chipman, P. R., Kanamaru, S., van Raaij, M. J., Arisaka, F., Mesyanzhinov, V. V., and Rossmann, M. G. (2003). Three-dimensional structure of bacteriophage T4 baseplate. Nat Struct Biol 10, 688-693.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lambert, O., Letellier, L., Gelbart, W. M., and Rigaud, J. L. (2000). DNA delivery by phage as a strategy for encapsulating toroidal condensates of arbitrary size into liposomes. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 7248-7253.

Lata, R., Conway, J. F., Cheng, N., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Wikoff, W. R., Johnson, J. E., Tsuruta, H., and Steven, A. C. (2000). Maturation dynamics of a viral capsid: visualization of transitional intermediate states. Cell 100, 253-263.

Leiman, P. G., Chipman, P. R., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V., and Rossmann, M. G. (2004). Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. Cell 118, 419-429.

Leonard, K. R., Kleinschmidt, A. K., and Lake, J. A. (1973). Caulobacter crescentus bacteriophage phiCbK: structure and in vitro self-assembly of the tail. J Mol Biol 81, 349-365.

Lepault, J., Booy, F. P., and Dubochet, J. (1983). Electron microscopy of frozen biological suspensions. J Microsc 129 Pt 1, 89-102.

Letellier, L., Boulanger, P., Plancon, L., Jacquot, P., and Santamaria, M. (2004). Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. Front Biosci 9, 1228-1339.

Lu, G., Zhou, Z. H., Baker, M. L., Jakana, J., Cai, D., Wei, X., Chen, S., Gu, X., and Chiu, W. (1998). Structure of double-shelled rice dwarf virus. J Virol 72, 8541-8549.

Ludtke, S. J., Chen, D. H., Song, J. L., Chuang, D. T., and Chiu, W. (2004). Seeing GroEL at 6 A resolution by single particle electron cryomicroscopy. Structure (Camb) 12, 1129-1136.

Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. Science 252, 1162-1164.

Lurz, R., Orlova, E. V., Gunther, D., Dube, P., Droge, A., Weise, F., van Heel, M., and Tavares, P. (2001). Structural organisation of the head-to-tail interface of a bacterial virus. J Mol Biol 310, 1027-1037.

Mangenot, S., Hochrein, M., Radler, J., and Letellier, L. (2005). Real-time imaging of DNA ejection from single phage particles. Curr Biol 15, 430-435.

McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., et al. (2001). Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. Nature 413, 852-856.

Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., and Ruger, W. (2003). Bacteriophage T4 genome. Microbiol Mol Biol Rev 67, 86-156, table of contents.

Molineux, I. J. (2001). No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. Mol Microbiol 40, 1-8.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Moody, M. F. (1999). Geometry of phage head construction. J Mol Biol 293, 401-433.

Moore, S. D., and Prevelige, P. E., Jr. (2001). Structural transformations accompanying the assembly of bacteriophage P22 portal protein rings in vitro. J Biol Chem 276, 6779-6788.

Morais, M. C., Choi, K. H., Koti, J. S., Chipman, P. R., Anderson, D. L., and Rossmann, M. G. (2005). Conservation of the capsid structure in tailed dsDNA bacteriophages: the pseudoatomic structure of phi29. Mol Cell 18, 149-159.

Morais, M. C., Kanamaru, S., Badasso, M. O., Koti, J. S., Owen, B. A., McMurray, C. T., Anderson, D. L., and Rossmann, M. G. (2003). Bacteriophage phi29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly. Nat Struct Biol 10, 572-576.

Morais, M. C., Tao, Y., Olson, N. H., Grimes, S., Jardine, P. J., Anderson, D. L., Baker, T. S., and Rossmann, M. G. (2001). Cryoelectron-microscopy image reconstruction of symmetry mismatches in bacteriophage phi29. J Struct Biol 135, 38-46.

Muller, M., Engel, A., and Aebi, U. (1994). Structural and physicochemical analysis of the contractile MM phage tail and comparison with the bacteriophage T4 tail. J Struct Biol 112, 11-31.

Murialdo, H., and Ray, P. N. (1975). Model for arrangement of minor structural proteins in head of bacteriophage lambda. Nature 257, 815-817.

Nandhagopal, N., Simpson, A. A., Gurnon, J. R., Yan, X., Baker, T. S., Graves, M. V., Van Etten, J. L., and Rossmann, M. G. (2002). The structure and evolution of the major capsid protein of a large, lipid-containing DNA virus. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 14758-14763.

Newcomb, W. W., Juhas, R. M., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Burch, A. D., Weller, S. K., and Brown, J. C. (2001). The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. J Virol 75, 10923-10932.

Olson, N. H., Gingery, M., Eiserling, F. A., and Baker, T. S. (2001). The structure of isometric capsids of bacteriophage T4. Virology 279, 385-391.

Orlova, E. V., Gowen, B., Droge, A., Stiege, A., Weise, F., Lurz, R., van Heel, M., and Tavares, P. (2003). Structure of a viral DNA gatekeeper at 10 A resolution by cryo-electron microscopy. Embo J 22, 1255-1262.

Plancon, L., Janmot, C., le Maire, M., Desmadril, M., Bonhivers, M., Letellier, L., and Boulanger, P. (2002). Characterization of a high-affinity complex between the bacterial outer membrane protein FhuA and the phage T5 protein pb5. J Mol Biol 318, 557-569.

Ponchon, L., Mangenot, S., Boulanger, P., and Letellier, L. (2005). Encapsidation and transfer of phage DNA into host cells: From in vivo to single particles studies. Biochim Biophys Acta 1724, 255-261.

Rice, G., Tang, L., Stedman, K., Roberto, F., Spuhler, J., Gillitzer, E., Johnson, J. E., Douglas, T., and Young, M. (2004). The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 7716-7720.

Roessner, C. A., and Ihler, G. M. (1984). Proteinase sensitivity of bacteriophage lambda tail proteins gpJ and pH in complexes with the lambda receptor. J Bacteriol 157, 165-170.

Saigo, K. (1978). Isolation of high-density mutants and identification of nonessential structural proteins in bacteriophage T5; dispensability of L-shaped tail fibers and a secondary major head protein. Virology 85, 422-433.

Simpson, A. A., Tao, Y., Leiman, P. G., Badasso, M. O., He, Y., Jardine, P. J., Olson, N. H., Morais, M. C., Grimes, S., Anderson, D. L., et al. (2000). Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. Nature 408, 745-750.

Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., Anderson, D. L., and Bustamante, C. (2001). The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. Nature 413, 748-752.

Smith, G. P., and Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. Chem Rev 97, 391-410.

Sternberg, N., and Weisberg, R. (1977). Packaging of coliphage lambda DNA. II. The role of the gene D protein. J Mol Biol 117, 733-759.

Steven, A. C., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L., and Conway, J. F. (2005). Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. Curr Opin Struct Biol 15, 227-236.

Tang, L., Marion, W. R., Cingolani, G., Prevelige, P. E., and Johnson, J. E. (2005). Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine. Embo J 24, 2087-2095.

Tao, Y., Olson, N. H., Xu, W., Anderson, D. L., Rossmann, M. G., and Baker, T. S. (1998). Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions. Cell 95, 431-437.

The Bacteriophages, Oxford University Press, 2nd edition

Thuman-Commike, P. A., Greene, B., Jakana, J., McGough, A., Prevelige, P. E., and Chiu, W. (2000). Identification of additional coat-scaffolding interactions in a bacteriophage P22 mutant defective in maturation. J Virol 74, 3871-3873.

Thuman-Commike, P. A., Greene, B., Malinski, J. A., Burbea, M., McGough, A., Chiu, W., and Prevelige, P. E., Jr. (1999). Mechanism of scaffolding-directed virus assembly suggested by comparison of scaffolding-containing and scaffolding-lacking P22 procapsids. Biophys J 76, 3267-3277.

Thuman-Commike, P. A., Tsuruta, H., Greene, B., Prevelige, P. E., Jr., King, J., and Chiu, W. (1999). Solution x-ray scattering-based estimation of electron cryomicroscopy imaging parameters for reconstruction of virus particles. Biophys J 76, 2249-2261.

Trus, B. L., Booy, F. P., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Homa, F. L., Thomsen, D. R., and

Steven, A. C. (1996). The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly. J Mol Biol 263, 447-462.

Tuma, R., Tsuruta, H., Benevides, J. M., Prevelige, P. E., Jr., and Thomas, G. J., Jr. (2001). Characterization of subunit structural changes accompanying assembly of the bacteriophage P22 procapsid. Biochemistry 40, 665-674.

Unger, V. M. (2001). Electron cryomicroscopy methods. Curr Opin Struct Biol 11, 548-554.

Valpuesta, J. M., Sousa, N., Barthelemy, I., Fernandez, J. J., Fujisawa, H., Ibarra, B., and Carrascosa, J. L. (2000). Structural analysis of the bacteriophage T3 head-to-tail connector. J Struct Biol 131, 146-155.

Wagner, P. L., and Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. Infect Immun 70, 3985-3993.

Wang, J., Hartling, J. A., and Flanagan, J. M. (1997). The structure of ClpP at 2.3 A resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. Cell 91, 447-456.

Whaley, S. R., English, D. S., Hu, E. L., Barbara, P. F., and Belcher, A. M. (2000). Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. Nature 405, 665-668.

Wikoff, W. R., Liljas, L., Duda, R. L., Tsuruta, H., Hendrix, R. W., and Johnson, J. E. (2000). Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid. Science 289, 2129-2133.

Wriggers, W., Milligan, R. A., and McCammon, J. A. (1999). Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. J Struct Biol 125, 185-195.

Yamamoto, K. R., Alberts, B. M., Benzinger, R., Lawhorne, L., and Treiber, G. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. Virology 40, 734-744.

Yang, F., Forrer, P., Dauter, Z., Conway, J. F., Cheng, N., Cerritelli, M. E., Steven, A. C., Pluckthun, A., and Wlodawer, A. (2000). Novel fold and capsid-binding properties of the lambda-phage display platform protein gpD. Nat Struct Biol 7, 230-237.

Zhang, Z., Greene, B., Thuman-Commike, P. A., Jakana, J., Prevelige, P. E., Jr., King, J., and Chiu, W. (2000). Visualization of the maturation transition in bacteriophage P22 by electron cryomicroscopy. J Mol Biol 297, 615-626.

Zhou, Z. H., and Chiu, W. (2003). Determination of icosahedral virus structures by electron cryomicroscopy at subnanometer resolution. Adv Protein Chem 64, 93-124.

Ziegelhoffer, T., Yau, P., Chandrasekhar, G. N., Kochan, J., Georgopoulos, C., and Murialdo, H. (1992). The purification and properties of the scaffolding protein of bacteriophage lambda. J Biol Chem 267, 455-461.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Zweig, M., and Cummings, D. J. (1973). Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein. J Mol Biol 80, 505-518.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

ANNEXE

Articles en instance de soumission

1. Bacteriophage T5 structure reveals similarities with HK97 & T4 suggesting evolutionary relationships

2. Maturation pathway of gifsy-2, an HK97-like phage of Salmonella

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Bacteriophage T5 structure reveals similarities with HK97 & T4 suggesting evolutionary relationships

Gregory Effantin,[1] Pascale Boulanger,[2] Emmanuelle Neumann,[1]
Lucienne Letellier[2] and James F. Conway[1]*

[1] Laboratoire de Microscopie Electronique, Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, 38027 Grenoble, France.
[2] Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR CNRS 8619, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay, France.

*Corresponding & Present address:
Department of Structural Biology,
University of Pittsburgh,
E1340 Biomedical Science Tower,
200 Lothrop Street,
Pittsburgh, PA 15261,
U.S.A.
email: jxc100@pitt.edu
Phone: +1-412-383-7051
Fax: +1-412-648-2229

Character count: 53,341 (including spaces)
Running title: Phage T5 has structure similarities with HK97 & T4
Keywords: bacteriophage / T5 / capsid / tail / cryo-electron microscopy
Subject Category: Structural Biology
Abbreviations: cryoEM – cryo-electron microscopy; Å – Ångstrom; bp – base pairs; SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Abstract

Bacteriophage T5 is a large relative of phages λ and HK97. From cryo-electron micrographs, we have determined structures of the icosahedral capsid to 19 Ångstroms resolution and the helical tail to ~30Å. We confirm the unusual trimeric symmetry of the tail tube and observe a larger ring at the junction of the tube and tail-tip that is the likely attachment point for tail fibers. The capsid is composed of pentamers and hexamers of pb8 arranged with triangulation number t=13 and we localize the pb10 decoration protein to the exterior surface of the hexamers, similar to the "hoc" protein of phage T4. Sequence comparison between pb8 and the HK97 capsid protein, together with modeling of the T5 capsid with the HK97 pentamer and hexamer, suggests that the T5 capsid likely adopts the same capsid protein fold as its smaller sibling, differing in size by the inclusion of additional hexamers. We propose that the precursor N-terminal domain of pb8 is involved in initial capsid assembly, as for HK97, specifically directing construction of the appropriately sized capsid.

Introduction

T5 is one of seven tailed bacteriophages that target *E. coli* and that were named "T" or "Type" phages by Delbrück in ~1944. It belongs to the Siphoviridae family, which includes phages λ and HK97, characterized by an isometric icosahedral capsid containing a dsDNA genome and by a long flexible non-contractile tail. Bacteriophage T5 is the type-member a genus that includes around 20 other poorly characterized members (Ackermann, 2004). Several features make T5 an unusual and remarkable phage (reviewed in (McCorquodale and Warner, 1988)). Its 121,750 bp genome is the largest of the T-odd viruses and carries single-stranded interruptions at genetically defined positions on one of the DNA strands as well as large terminal redundancies in the form of 10,160 direct repeats. Transport of the genome into the host occurs by a unique two step process: 8% of the genome is first transferred, allowing production of pre-early phage-encoded proteins that are necessary for the transport of the 92% remaining DNA (reviewed in (Letellier et al., 2004)). T5 also contains some of the strongest known prokaryotic promoters (McCorquodale and Warner, 1988). Remarkably, most of these features have been known since the 1960's and 1970's, but in comparison to phages λ, T4 or T7 we have only a poor understanding of the molecular events occurring during the infection process. However, the recent sequencing of its genome (NCBI Entrez ID's AY587007 (Wang et al., 2005), AY692264 and AY543070) offers considerable support for present and future work.

Most morphological data concerning T5 come from negative stain electron microscopy (Saigo, 1978; Zweig et al., 1972). The T5 capsid has an average diameter of ~900 Å, a planar icosahedral outline, and a flexible tail of 120 Å diameter with a total length of 2500 Å. The tails ends in a conical structure to whose tip is attached a 500 Å long straight fiber that crosses the host envelope upon infection (Letellier et al., 2004). Three L-shaped fibers are attached to the distal end of the tubular part of the tail that permit attachment to the host, and the tail-tube itself appears to be assembled from trimeric rings (Guenebaut et al., 1997) rather than hexameric rings as observed in most other phage tails. Cryo-electron microscopy of phage particles interacting with their purified host receptor, the outer membrane protein FhuA, shows similar general features (Bohm et al., 2001; Lambert et al., 1998). While the cryoEM images of the phage particles demonstrate a well preserved and regular capsid whose shape is consistent with icosahedral symmetry, no structural work was carried out on the capsid in these studies. The larger diameter of the T5 capsid compared to that of other Siphoviridae

such as λ and HK97 suggests that the subunit organization is likely to be different, in particular with a triangulation number *t*>7 seen for these other capsids. Biochemical studies previously identified pb8 as the major capsid protein (730 copies/phage particle) and pb10 as the secondary major head protein (114 copies/particle) (Zweig and Cummings, 1973a; Zweig and Cummings, 1973b) although dispensable for infectivity (Saigo, 1978). Saigo further proposed that the pb10 "decoration protein" would be analogous to the T4 *hoc* protein since both are found in 1:6 molar ratio to their respective major head proteins. However, examination of the T5 genome (NCBI Entrez ID AY692264) reveals a pattern of genes encoding capsid proteins more similar to phages λ and HK97 than to T4. Upstream of the major head protein are found the terminases, the pb7 portal protein, pb10 and a head maturation protease, pb11. Notable are two features shared by T5 and HK97 phages: one is the absence of a gene encoding a scaffolding protein, common for capsids of ~500Å diameter or larger and used in assembly but expelled from the capsid before DNA packaging, and the second is proteolytic removal of a substantial domain of the major head protein. For HK97, the 102-residue N-terminal domain of the gp5 capsid protein is proposed to aid in assembly of the capsid and is subsequently cleaved leaving 282 residues in the mature protein (Duda et al., 1995) whereas the T5 pb8 protein is trimmed from a 50kDa precursor to the 32kDa mature form (Zweig and Cummings, 1973a). Together, these features suggest that T5 and HK97 share a similar assembly strategy.

We have embarked on a program of structural analysis using cryo-electron microscopy and three dimensional image reconstruction, beginning with the more straightforward targets such as the icosahedral capsid and the helical tail, but aiming ultimately for as complete a rendering as possible of the entire T5 phage. Unusual and therefore interesting aspects of T5 morphology are in our immediate sights, such as the structure of the relatively large capsid compared to λ and HK97, the location and role of the pb10 decoration protein, the organization of the encapsidated DNA and its effect on capsid structure, as well as the structure of the connector-tail-tip complex and in particular the organization of the helical tail-tube. By comparing this new knowledge with structural data available for other viruses, we gain understanding about what makes T5 unique, and what is common among such complex multi-component molecular machines.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Results

- Capsid structure by cryoEM

Cryo-electron micrographs reveal phage particles with regular, angular capsids and long tails that are generally straight, although neither tip nor fibers are readily visible (Fig. 1a). Dark capsids are filled with viral genome and light capsids appear completely empty of DNA. We assume that these are mature capsids that have been subsequently emptied of their DNA since they have tails attached – an assembly step that follows DNA packaging.

Particles were selected and subjected to analysis using a negative-stain reconstruction as a starting point (see Supplementary Information), yielding a structure of 20Å resolution (Fig. 1b). The organization of pentameric capsomers at the vertices and hexameric capsomers elsewhere, arranged on a *t*=13 lattice, is clearly visualized. Two alternative hands are possible – one is the mirror image of the other – but the correct one cannot be determined in such an analysis and *t*=13*l* (laevo) has been chosen arbitrarily, although with some evidence in its favor from the *t*=13*l* end-caps of phage T2 (Bayer and Remsen, 1970) and the giant head of phage T4 (Aebi et al., 1976). The sectioned views (Fig. 1c,d) show planar walls of ~40Å thickness and apparent layering of dsDNA, similar to the DNA patterns observed in reconstructions of the T7 head (Cerritelli et al., 1997; Cerritelli et al., 2003), the mutant

isometric particle of T4 that shares the same *t*=13 geometry (Olson et al., 2001), and the prolate T4 head (Fokine et al., 2004). This layering is consistent with the spool model established for T7 and the imposition of icosahedral symmetry (Cerritelli et al., 1997). On the radial density profile (Fig. 1g), 10 layers are indicated ranging over radii from 160-380Å and yielding an average spacing of 24.4Å.

The structure of the empty capsid obtained by urea treatment is resolved at 19Å resolution, similar to that of the full head particle but with generally improved features due to the absence of packaged DNA. The exterior surface (Fig. 1e) resembles the DNA-filled head, while the interior view (Fig. 1f) shows cavities under each capsomer, similar to the HK97 head (Conway et al., 1995) with a central dimple and 6 satellite dimples. Radial profiles of the density distributions were calculated from the empty and full capsid structures (Fig. 1g), and mutually calibrated with reconstructions that were derived from the same micrographs although to lower resolution than here (data not shown). Unexpectedly, the radial profile of the empty capsid has a higher average radius than the full capsid, despite the lack of internal pressure from packaged DNA. In particular, the capsid walls near the 2-fold axes (Fig. 1f) appear straighter than for the full capsid (Fig. 1c) where they are slightly bowed in by about 10Å reducing the diameter to 820Å. In comparison we detect no change in the 940Å diameter across the 5-fold axes. It is likely that the accompanying conformational changes are the consequence of DNA release rather than to the urea treatment since they were also observed on T5 particles that had released their DNA *in vitro* upon binding to their host receptor FhuA (data not shown).

The subunits of the hexameric and pentameric capsomers appear similar – on the exterior, a ridge extends along the surface radially away from the central axis of each capsomer. Biochemical characterization of the capsid has indicated only a single major capsid protein, pb8, which we propose to be the subunit for both the pentamers and hexamers, as is the case for other Siphoviridae such as λ (gpE) and HK97 (gp5). Apart from the numbers of subunits, the hexamers differ from pentamers by the presence of a lump of density extending outwardly along the local symmetry axis from the center of each capsomer. This density is not strongly continuous with the underlying capsid, allowing us to estimate its volume as being consistent with a polypeptide, or polypeptides, totaling ~160 amino acids. The lack of a strong connection suggests that this density is not an extension of the capsid protein, and indeed it may be removed progressively by digestion with 4M guanidine-HCl (Fig. 2a). Absence of similar density on pentamers further supports assignment of the lump as a decoration protein while the weak connection to the hexamer indicates that it is not present in a 1:1 ratio with the underlying hexamer subunits. This is consistent with the molecule being located on the local quasi-sixfold axis, occupying roughly the same volume but in different orientations at equivalent sites, and associating with one or two capsid proteins in a pattern that is random over equivalent positions within and between capsids.

A candidate protein for this decoration density is pb10. A monomer of pb10 – 164 amino acids – would account for the volume of the lump. The molar ratio with pb8 would be 120:780 or 1:6.5, close to the biochemical assessment of 1:6 (Zweig and Cummings, 1973b) and is consistent with there being a symmetry mismatch between the lump and the underlying hexamer. This apparently unlikely arrangement is not without precedent, having been established for the *hoc* protein of phage T4 (Ishii and Yanagida, 1975). To test our hypothesis, we determined the capsid structure of a T5mutant (T5st amN5) that produces empty heads lacking pb10 as shown by SDS-PAGE analysis (Zweig and Cummings, 1973b) (Fig. 2b). The main difference between this structure and the mature head capsid is the absence of the lumps, confirming our assignment of the hexamer-associated lump as a monomer of pb10.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

- Modeling the T5 capsid with the HK97 capsid protein

Phage T5 is in the same family as HK97 and the mature capsid proteins of these two viruses have similar lengths: 299 and 282 amino acids, respectively. The morphology of the capsomers is also similar. We modeled a part of the T5 capsid by fitting a pentamer and a hexamer of the mature HK97 capsid (Helgstrand et al., 2003) as a solid body into the T5 cryoEM density map (Fig. 3). The angle between the two capsomers needed no adjustment, but a small displacement of the hexamer by 5Å away from the pentamer was necessary to properly center it on the local symmetry axis. Visually, the resulting fit is surprisingly good, with only a small region at the outer surface unoccupied that may be attributed to the smaller size of the HK97 protein used for fitting. Several small loops of the HK97 gp5 extend beyond the T5 capsid envelope, and these are near the *hoc*-like density for which there is no analog in HK97. The E-loop of HK97 gp5 is involved in the unusual covalent crosslink that generates interlinked rings in the mature head (Duda, 1998; Wikoff et al., 2000), a stabilizing mechanism that T5 does not employ according to an absence of capsid protein oligomers in SDS-PAGE ((Zweig and Cummings, 1973b) and our data, not shown) as well as sequence comparison (see below).

- Protein sequence comparisons: T5 and HK97 likely share common capsid maturation mechanisms

The above results highlight the similarities between the T5 and HK97 mature capsid structures. We extended this analysis by comparing the sequences of their major capsid proteins. HK97 dispenses with a separate scaffolding gene for guiding capsid assembly, unlike the related phages λ and P22. Instead, the capsid protein has an extensive amino-terminal Δ-domain of 102 amino acids, 25% of the full-length protein, that is proteolysed after assembly of the first complete capsid form, Prohead 1, and that has been proposed to aid assembly. This domain has been visualized in cryoEM reconstructions of Prohead 1 as a basket hanging beneath the capsomers on the interior of the capsid (Conway et al., 1995; Li et al., 2005). Two regions of the Δ-domain are strongly predicted to adopt a coiled-coil conformation (Conway et al., 1995).

Search for a putative T5 gene encoding a scaffolding protein is hampered by the lack of sequence homology in these genes. Nonetheless, no obvious candidate is apparent in the region of structural genes where this is usually found. On the other hand, several arguments suggest that the T5 capsid might mature by a mechanism similar to that of HK97. The mature protein has a molecular weight of 32kDa (Zweig and Cummings, 1973b) derived from a larger 50 kDa protein (Zweig and Cummings, 1973a) encoded by the pb8 gene (NCBI Entrez ID AY692264). N-terminal sequencing of the mature pb8 (Boulanger et al, in preparation) indicates that the amino-terminal 159 residues have been removed, presumably by a putative prohead protease identified on the genome**.** This excised T5 Δ-domain is 60% longer than that of HK97 but also has a high prediction for coiled-coil and in particular the 102 residues that overlap with that of HK97 have a remarkably similar prediction pattern (Fig 4a). Taken with the apparent lack of a scaffold gene in the T5 genome, we propose that the pb8 Δ-domain serves an assembly role as for HK97.

Alignment of the mature T5 and HK97 capsid proteins by PSI-BLAST (Fig. 4b) yields a sequence identity of 20%, similar to that found for structurally equivalent regions of HK97 and T4's gp24 (Fokine et al., 2005). Several small gaps were introduced into the HK97 sequence, corresponding to insertions in T5 pb8. The largest – 8 residues – is at the position of helix α5 and this region of the HK97 subunit does not fit well into the T5 capsid density (Fig. 3). Gaps also occur at the positions of the 'chainmail' cross-linking residues, Lys169, Asn356 and the putative catalytic Glu363 (Duda, 1998; Wikoff et al., 2000). However, no

crosslink triad is evident in T5 pb8 by alignment, supporting biochemical evidence that the T5 capsid protein does not crosslink, and so differences in the folds may well be expected in these regions. Several small insertions in and around the HK97 βF strand map to an area adjacent to the capsomer axis, where the T5 pb10 protein appears to bind and for which HK97 has no analogue.

- Capsid-connector-tail structure

We have determined a preliminary structure of the capsid, connector and of the proximal piece of the tail by re-aligning images of empty capsids, oriented initially assuming icosahedral symmetry, so that the tails lie on a common vertex, and then reduced the imposed symmetry to only 5-fold symmetry along the tail axis. Although this remaining symmetry is not appropriate for the connector (assumed 12-fold symmetric) or tail (3-fold symmetry), nonetheless we can localize averaged density associated with these structures. Due to the size of the capsid, the close packing between phage particles, as well as low imposed symmetry, the quality of the capsid density is poor, but strong density is evident that corresponds to the capsid and tail as well as some moderately strong internal density that we associate with the connector occupying this vertex (Fig. 5). The tail density appears continuous with this connector density, widening slightly as it merges with the connector/capsid. The internal density is about 100Å in length, from the constriction at the vertex to the innermost tip, and about 150Å in diameter near the capsid but stepping down to ~50Å in diameter towards the capsid interior. Despite the preliminary nature of this structure, the dimensions suggest a larger and possibly differently organized connector than for phage phi29, for which an *in situ* model has been developed (Simpson et al., 2000) where the wider end of the connector is interior but distal to the vertex. The density distribution we observe resembles more closely that attributed to the gp20 connector in the reconstruction of the prolate T4 head (Fokine et al., 2004), which tapers along the packaging axis towards the center of the capsid. In our experiment, the capsids have been emptied of DNA, and comparison of the connector before DNA release will be a subject of future study.

- Tail tube and tip

Negative-stain electron microscopy images of T5 phage particles show the tail as a long, often curved, banded tube ending in a cone from which a long tip extends longitudinally as well as 3 fibers attached proximally to the tail. The banding pattern has an axial repeat of 38Å, similar to that seen in other phage tails such as T2 (Moody and Makowski, 1981), SPO1 (Parker and Eiserling, 1983), and λ (Katsura, 1981). However, in cryoEM tails from the same sample appear generally straight, and the repeat is longer at 42Å (Guenebaut et al., 1997) and 43.8Å (our data not shown) suggesting that the tails bend and shrink during dehydration for negative-strain microscopy. Previous biochemical and electron microscopy data indicate that the main component of the tail is the 58kDa pb6 protein (Zweig and Cummings, 1973a; Zweig and Cummings, 1973b) arranged as a stack of 40 trimeric disks and a relative rotation of 40° between each disk (Guenebaut et al., 1997). Using the new axial repeat of 43.8Å and the rotation angle of 40°, we applied helical reconstruction methods (Trachtenberg et al., 2005) to the cryoEM images of phage particles selected for straight tails. Views of the reconstruction are shown in Fig. 6a-e. Despite the modest resolution of ~30Å, the strong trimeric nature of the disks is readily apparent, although the pb6 subunit appears to have a bi-lobed outline. Imposition of 6-fold symmetry is clearly inappropriate, however, and results in smooth rings (data not shown). The rotation between successive disks is 39.4°, and the axial repeat between disks remains 43.8Å. The internal channel is ~50Å in diameter and is apparently not filled with DNA, nor is the putative tape-measure domain of the pb2 molecule

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

evident although we must caution that our data are insufficient to be certain on the contents of the tail tube.

The tail tip, compared to the tail tube, is considerably less massive and lacks the high symmetry. Consequently our collection of cryoEM images was too meager for structural determination. The higher-contrast negative-stain images (Fig. 6g) of the T5st amN5 tails, however, were suitable for calculating a preliminary density map shown in Fig. 6h as a surface view. A small 'baseplate' or crown is apparent (arrowhead) at the junction of the tail tube and the conical tip. This baseplate has previously been observed (Heller and Schwarz, 1985; Saigo, 1978), but its composition remains unknown. Given the MM of pb3 and pb4 (125 and 82 kDa respectively) and their copy number of 5 each (Zweig and Cummings, 1973b) we speculate that the baseplate might be formed at least by these two proteins. Other proteins involved in this region include pb5, whose role and precise location are unknown, and the pb1 L-fibers and pb2 tip-fiber. Unfortunately, the negative stain reconstruction is insufficiently resolved to attempt assigning positions by volume and protein size. Although no density could be attributed to fibers, the baseplate is at the position they appear to bind the tail, and may be the fiber binding site. The baseplate diameter is ~175Å, almost twice that of the tail tube, and slightly less than the ~44Å height of the tail disks. The tail tube portion above the baseplate is less detailed than the cryoEM density map (c.f. Fig 6a) but shares recognizable features such as the axial repeat and a knobby appearance, although restrained. Beneath the baseplate, the tip is shaped as a cone, but is otherwise poorly resolved and the tip-fiber is not visible, possibly due to flexibility.

Discussion

A summary of our structural results is presented in Fig. 7. The capsid structure of T5 is the first reported with triangulation number t=13 for a wild-type single-layered virus, but several other protein shells with this architecture are well known. The structure most closely related is from phage T4, where a point mutant in the major capsid protein, gp23, results in the assembly of isometric capsids with a t=13 lattice (Iwasaki et al., 2000; Olson et al., 2001). These mutant capsids include the *hoc* and *soc* decoration proteins – *soc* binds as trimers at the periphery of the gp23 hexamers while *hoc* is a monomer located at the center of each hexamer, in the same location as the T5 pb10 molecule observed here. The similarity is emphasized when *soc* is absent from the T4 isometric capsid (see Fig. 3 of (Iwasaki et al., 2000)). The *hoc* molecule has a length of 377 amino acids, roughly twice that of T5 pb10 at 165 residues, and with quite different appearances in the two available T4 structures. In a personal communication, the authors of one study (Iwasaki et al., 2000) suggested that the *hoc* protein may have been proteolysed and so only the capsid-binding domain is retained. In the other, the *hoc* density is considerably more extensive with a bi-lobed appearance. In both cases, the similarity in arrangement of the T4 *hoc* and T5 pb10 molecules on their respective capsid surfaces is quite remarkable. We suppose that the binding site for pb10, and by analogy for *hoc*, is quite sensitive to structure in the sense of conformational epitopes for antibodies – particular amino acids must be presented in a precise spatial arrangement, as demonstrated with the hepatitis B virus capsid (Conway et al., 2003). Six sites are presented by the hexameric capsomer and we infer they bind the accessory protein with equal affinity since we observe no preferential arrangement of the weak linker density from the pb10 lump to the capsid. However, the binding of one molecule to a randomly selected site would sterically block access to other available sites in the same hexamer. Pentamer sites are presumably distorted by the greater local curvature of the capsid and looser packing of

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

subunits, losing their conformational accuracy so that they are no longer recognizable for the accessory molecule to bind.

The fold of the HK97 mature capsid protein (Helgstrand et al., 2003; Wikoff et al., 2000) has recently been observed in the capsid vertex protein, gp24, of phage T4 and is likely to be shared by the major capsid protein, gp23 (Fokine et al., 2005). In addition it has been reported in phages P22 (Jiang et al., 2003) and phi29 (Morais et al., 2005), extending the range of the HK97 capsid protein fold to all families of the Caudovirales, as well as suggested as a likely model for the lower domain "core" of herpeseviruses (Steven et al., 2005). Although T5 does not have the same capsid lattice geometry as HK97, the differences amount to the inclusion of three additional hexamers on each icosahedral facet that, conceptually at least, would not require much adjustment to the quasi-equivalent bonding environments. The successful fitting of HK97 gp5 hexamers and pentamers into the T5 capsid reconstruction, albeit at the modest resolution of 20Å, suggests that T5 pb8 may also have this HK97 fold. Indeed, the T5 pb8 capsid protein appears likely to be more similar to HK97 gp5 that the capsid proteins of T4, phi29 and P22. These later proteins include domain-sized insertions, such as the 60-residue "insertion" domain in the T4 gp24 protein that replaces the E-loop of HK97 gp5 including one of the partners in the chainmail crosslinking. In comparison, the T5 density map accommodates much of the HK97 gp5 E-loop and only a 6-residue insertion is necessary in T5 pb8 to maintain sequence alignment.

What governs assembly of the HK97 and T5 capsid proteins into capsids of a particular geometry? In the absence of a scaffold protein in each case, the Δ-domain appears a likely candidate and is already implicated in assembly for HK97. The extra length of the T5pb8 Δ-domain correlates with the larger capsid, although the mechanism for effecting this correlation is not obvious. One assembly model proposed for HK97 is hierarchical – a pentamer in solution binds five hexamers to make a 'super-penton', and 12 of these will form a t=7 capsid (Conway et al., 1995) – although no evidence bears on this either way. Such a model could be extended for t=13 capsids by invoking a second ring of five hexamers around the 'super-penton'. The role of the connector has not been considered in this argument since HK97 capsomers assemble in its absence in expression systems, although it is likely to be important in the lower concentration of capsid protein found *in vivo*. To test the function of the Δ-domains in these systems, we envisage the following experiments, which we expect to report on in future. In one, expression of protease-defective T5 phage should allow isolation of T5 prohead particles that may be analyzed by cryoEM and image reconstruction to visualize the Δ-domain for comparison with HK97 prohead I capsid. In another, construction of chimers of the two capsid proteins of T5 and HK97, involving a Δ-domain from one phage with the mature capsid protein from the other, may lead to assembly of t=13 HK97-gp5 particles, or t=7 T5-pb8 particles, which would establish the role of the Δ-domains in assembling capsids of particular geometry.

The three-fold symmetric nature of the tail tube is another unusual feature of T5 – most known phage tails are 6-fold symmetric – and we are aware of only one other well-documented example with this symmetry, phage phi-CbK (Leonard et al., 1973; Papadopoulos and Smith, 1982). The tail tubes of both T5 and phi-CbK are long and non-contractile, but the significance of trimeric over hexameric rings is unknown. We suppose that DNA release from the capsid is effected by some signal that traverses the long tail tube. A candidate for signal triggering is pb2, the 1219-residue oligomeric protein forming the straight tip-fiber (Letellier et al., 2004). Indeed, pb2 shares common characteristics with gpH, the tape measure protein that determines the length of phage λ tail (Hendrix, 1988; Katsura, 1990). Accordingly five or six copies of pb2 would form a partially coiled coil structure spanning the T5 tail. Upon interaction with the host pb2 would undergo large conformational changes, transmitting its signal to the connector which responds by opening and allowing

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

passage of the DNA through the tail. We hope to explore any structural consequences of such a signal in future experiments, as we improve resolution of our helical analyses. A second functional aspect of the tail tube is any role it may have in facilitating DNA passage, and in particular, if any such role is particular to the unique two-stage genome transport in which 8% is expelled into the host, from which pre-early phage proteins are expressed that are required for transport of the rest of the DNA (Letellier et al., 2004). We propose to address these questions by building on the structural work presented here for comparison with partially empty particles that have DNA within the tail, and completely empty particles whose tails are once again devoid of DNA.

The new data on T5 reveal variations on the assembly and maturation strategies employed by viruses that augment general patterns observed in capsid design (Steven et al., 2005). Different pathways appear as if selected from a common menu of choices, yielding unique processes and structures that obscure an underlying web of evolutionary connections. We foresee continued elaboration of the structural components of the T5 phage leading to a detailed view of the action of assembly and infection including the conformational changes that are functionally significant. Structural comparisons between phages T5 and HK97 look to be particularly appealing for understanding the mechanisms that direct similar subunits towards structurally different products.

Materials and Methods

- Phage T5 characteristics and purification

Two mutant strains of T5 were used for this study: T5st(0) (114 kbp), a heat-stable mutant deleted of 7.2% of its genome (Scheible et al., 1977) (NCBI Entrez ID AY692264), and phage T5st amN5 – an amber mutant derived from T5st(0) that produces empty capsids devoid of pb10 and unattached active tails (Zweig and Cummings, 1973b). Phages T5st(0) and T5st amN5 were propagated on *E. coli* F and on the permissive host *E. coli* Fsuβ$^+$ respectively. *E. coli* F was used as a non-permissive host for T5st amN5 for the production of pb10$^-$ empty capsids and active tails. Phage particles were purified by centrifugation on glycerol and/or CsCl gradients (Boulanger et al., 1996; Zweig and Cummings, 1973b) and were stored in 100mM NaCl, 1mM $MgSO_4$, 1mM $CaCl_2$, 10mM Tris-HCl at pH 7.6. The final titer was 10^{13} phage particles/ml.

Empty capsids were obtained by treating the phage with 2M urea for 2 hours at 37°C. Observation of the treated phages by negative staining and cryo-EM indicated that almost all capsids were intact and free of DNA while the tails had lost their distal part, suggesting that such treatment triggered the release of DNA through the tail. Urea was removed by dialysis prior to imaging by cryo-EM.

- Microscopy and 3D analysis

For cryo-electron microscopy, purified samples were prepared on Quantifoil grids, blotted and rapidly frozen to liquid nitrogen temperature according to standard methods. Grids were transferred to a Gatan 626 cryoholder and imaged using low-dose techniques in an FEI CM200 microscope with LaB6 electron source and operated at 200kV, maintaining the low temperature throughout. Fields were viewed at a nominal magnification of 38,000x and exposed twice at different defocus settings: in the first the phase contrast transfer function's first zero was at a spacing of 18-23 Å, and at 23-28Å for the second exposure. Films were developed for 12 minutes in full strength Kodak D19.

Negatives were screened by optical diffraction to reject drifted or astigmatic images, and scanned on a Z/I Photoscan at 7µm scan rate, corresponding to 5.6Å/pixel at the sample for

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

negative-stain images and 1.8Å/pixel for cryoEM images. Capsid images were selected with the XWindows program "x3dpreprocess" and the contrast transfer functions assessed and corrected according to an established method (Conway and Steven, 1999). The initial negative stain data were analyzed by self-common lines (Fuller et al., 1996) to generate a starting model from a single particle, and this was used in a modified model-based procedure (Baker and Cheng, 1996) to determine orientations for other images, resulting in a 3D density map calculated using Fourier-Bessel methods (Crowther, 1971) to a resolution of about 35Å. This model was used to start the solution of orientations for the cryoEM data after scaling by eye to match. Full icosahedral symmetry was imposed on the density maps, and resolution was assessed by Fourier Shell Correlation (Saxton and Baumeister, 1982) at the 0.3 limit.

For studying the capsid-connector-tail complex, images of particles treated with 2M urea were analyzed initially as above. Symmetry was then reduced 12-fold by imposing a cylindrical tube of density at one vertex of the reconstruction to simulate the tail, and rotating each particle so that the tails were aligned along this common vertex, leaving only 5-fold symmetry along this capsid-tail axis. Continued refinement and reconstructions were done in this reduced-symmetry frame.

The DNA-filled head reconstruction was calculated from images of 1524 particles selected from a total of 2337 collected from 25 focal pair micrographs, and the resolution estimated to be 20.3Å. The empty heads, produced after treatment with 2M urea, yielded a density map to 19.2Å resolution that included 2651 images drawn from the total of 3177 images extracted from 20 focal pair micrographs. Micrographs of the T5st amN5 mutant mutant particles devoid of pb10 were sparsely populated, and a greater percentage of particles – 258 of 278 – were included in calculation of the density map to reduce noise, yielding a resolution of 30.8Å. All analyses were run on PowerMac G5 computers (Apple Computer, Cupertino CA, USA). Fitting of the HK97 gp5 hexamer and pentamer into a truncated density map focusing on the region of interest was performed on Linux workstations (Dell, Austin TX, USA) using CoLoRes of the SITUS package (Chacon and Wriggers, 2002).

Helical methods (Trachtenberg et al., 2005) were used to reconstruct the *in situ* T5 tail, starting with parameters available from a previous study (Guenebaut et al., 1997) as well as our own estimate of the axial repeat (43.8Å), and refining until the values settled. 2070 segments of length ~510Å were selected from straight regions on tails, corrected for CTF effects as above, and 1559 of these were used in the final reconstruction with resolution. Three-fold symmetry about the tail tube axis was enforced for cryoEM images. Scripts were run in the Spider environment on Linux workstations. The tail-tip reconstruction used negative-stain images of purified tails from the T5st amN5 mutant. The initial model was a superposition of 3 cylinders whose diameters correspond approximately to the tail tube, the baseplate and the cone. From a total of 458 tail images, 400 were included in the final reconstruction. Three-fold symmetry was enforced in the first cycles and then helical symmetry was imposed to the tail tube portion only, without 3-fold symmetry.

Surface views of reconstructions were generated with Amira (Mercury Computer Systems/3D Viz group, San Diego CA, USA and Merignac, France). The molecular graphics images of Figure 3 were made with VMD (Humphrey et al., 1996):

http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/

and the inset model of the HK97 gp5 protein was produced using the UCSF Chimera package from the Computer Graphics Laboratory, University of California, San Francisco:

http://www.cgl.ucsf.edu/chimera

- Sequence comparison

Sequence comparison was made with PSI-BLAST (Altschul et al., 1997) and prediction of coiled-coil was performed according to the method of (Lupas et al., 1991) on the web site of the "Pôle Bioinformatique Lyonnais – Network Protein Sequence Analysis" at:

http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_lupas.html

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs R.W. Hendrix, R.L Duda and Dr A.C. Steven for helpful discussions, and together with Dr. R.H. Wade for support. Drs D.M. Belnap, B. Heymann, T.S. Baker and E. Egelman kindly aided with 3D analysis software. Expert technical assistance in microscopy by Drs. E.A. Hewat and G. Schoehn, and in computational support by Dr. F. Metoz is gratefully recognized and we also thank C. Janmot for purification of phage particles. Support is acknowledged by JFC from the CNRS in the form of an ATIP grant, and by JFC and LL from the French Ministère de la Recherche for an ACI "Dynamique et Réactivité des Assemblages Biologiques" grant.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

References

Ackermann, H.-W. (2004) Bacteriophage Classification. In Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (eds.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

Aebi, U., Bijlenga, R.K., ten Heggeler, B., Kistler, J., Steven, A.C. and Smith, P.R. (1976) Comparison of the structural and chemical composition of giant T-even phage heads. *J Supramol Struct*, **5**, 475-495.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.

Baker, T.S. and Cheng, R.H. (1996) A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J Struct Biol*, **116**, 120-130.

Bayer, M.E. and Remsen, C.C. (1970) Bacteriophage T2 as seen with the freeze-etching technique. *Virology*, **40**, 703-718.

Bohm, J., Lambert, O., Frangakis, A.S., Letellier, L., Baumeister, W. and Rigaud, J.L. (2001) FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: a cryo-electron tomography study. *Curr Biol*, **11**, 1168-1175.

Boulanger, P., le Maire, M., Bonhivers, M., Dubois, S., Desmadril, M. and Letellier, L. (1996) Purification and structural and functional characterization of FhuA, a transporter of the Escherichia coli outer membrane. *Biochemistry*, **35**, 14216-14224.

Cerritelli, M.E., Cheng, N., Rosenberg, A.H., McPherson, C.E., Booy, F.P. and Steven, A.C. (1997) Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. *Cell*, **91**, 271-280.

Cerritelli, M.E., Conway, J.F., Cheng, N., Trus, B.L. and Steven, A.C. (2003) Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment. *Adv Protein Chem*, **64**, 301-323.

Chacon, P. and Wriggers, W. (2002) Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *J Mol Biol*, **317**, 375-384.

Conway, J.F., Duda, R.L., Cheng, N., Hendrix, R.W. and Steven, A.C. (1995) Proteolytic and conformational control of virus capsid maturation: the bacteriophage HK97 system. *J Mol Biol*, **253**, 86-99.

Conway, J.F. and Steven, A.C. (1999) Methods for reconstructing density maps of "single" particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. *J Struct Biol*, **128**, 106-118.

Conway, J.F., Watts, N.R., Belnap, D.M., Cheng, N., Stahl, S.J., Wingfield, P.T. and Steven, A.C. (2003) Characterization of a conformational epitope on hepatitis B virus core antigen and quasiequivalent variations in antibody binding. *J Virol*, **77**, 6466-6473.

Crowther, R.A. (1971) Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **261**, 221-230.

Doan, D.N., Lee, K.C., Laurinmaki, P., Butcher, S., Wong, S.M. and Dokland, T. (2003) Three-dimensional reconstruction of hibiscus chlorotic ringspot virus. *J Struct Biol*, **144**, 253-261.

Duda, R.L. (1998) Protein chainmail: catenated protein in viral capsids. *Cell*, **94**, 55-60.

Duda, R.L., Martincic, K., Xie, Z. and Hendrix, R.W. (1995) Bacteriophage HK97 head assembly. *FEMS Microbiol Rev*, **17**, 41-46.

Fokine, A., Chipman, P.R., Leiman, P.G., Mesyanzhinov, V.V., Rao, V.B. and Rossmann, M.G. (2004) Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6003-6008.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Fokine, A., Leiman, P.G., Shneider, M.M., Ahvazi, B., Boeshans, K.M., Steven, A.C., Black, L.W., Mesyanzhinov, V.V. and Rossmann, M.G. (2005) Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7163-7168.

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

Guenebaut, V., Maaloum, M., Bonhivers, M., Wepf, R., Leonard, K. and Horber, J.K. (1997) TEM moire patterns explain STM images of bacteriophage T5 tails. *Ultramicroscopy*, **69**, 129-137.

Helgstrand, C., Wikoff, W.R., Duda, R.L., Hendrix, R.W., Johnson, J.E. and Liljas, L. (2003) The refined structure of a protein catenane: the HK97 bacteriophage capsid at 3.44 A resolution. *J Mol Biol*, **334**, 885-899.

Heller, K.J. and Schwarz, H. (1985) Irreversible binding to the receptor of bacteriophages T5 and BF23 does not occur with the tip of the tail. *J Bacteriol*, **162**, 621-625.

Hendrix, R.W. (1988) Tail length determination in double-stranded DNA bacteriophages. *Curr Top Microbiol Immunol*, **136**, 21-29.

Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, **14**, 33-38, 27-38.

Ishii, T. and Yanagida, M. (1975) Molecular organization of the shell of the Teven bacteriophage head. *J Mol Biol*, **97**, 655-660.

Iwasaki, K., Trus, B.L., Wingfield, P.T., Cheng, N., Campusano, G., Rao, V.B. and Steven, A.C. (2000) Molecular architecture of bacteriophage T4 capsid: vertex structure and bimodal binding of the stabilizing accessory protein, Soc. *Virology*, **271**, 321-333.

Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M.L., Prevelige, P.E., Jr. and Chiu, W. (2003) Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat Struct Biol*, **10**, 131-135.

Katsura, I. (1981) Structure and function of the major tail protein of bacteriophage lambda. Mutants having small major tail protein molecules in their virion. *J Mol Biol*, **146**, 493-512.

Katsura, I. (1990) Mechanism of length determination in bacteriophage lambda tails. *Adv Biophys*, **26**, 1-18.

Lambert, O., Plancon, L., Rigaud, J.L. and Letellier, L. (1998) Protein-mediated DNA transfer into liposomes. *Mol Microbiol*, **30**, 761-765.

Leonard, K.R., Kleinschmidt, A.K. and Lake, J.A. (1973) Caulobacter crescentus bacteriophage phiCbK: structure and in vitro self-assembly of the tail. *J Mol Biol*, **81**, 349-365.

Letellier, L., Boulanger, P., Plancon, L., Jacquot, P. and Santamaria, M. (2004) Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Front Biosci*, **9**, 1228-1339.

Li, Y., Conway, J.F., Cheng, N., Steven, A.C., Hendrix, R.W. and Duda, R.L. (2005) Control of Virus Assembly: HK97 "Whiffleball" Mutant Capsids Without Pentons. *J Mol Biol*, **348**, 167-182.

Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162-1164.

McCorquodale, D.J. and Warner, H.R. (1988) The Bacteriophages. In Calender, R. (ed.), *Bacteriophage T5 and related phages*. Plenum Press, New York.

Moody, M.F. and Makowski, L. (1981) X-ray diffraction study of tail-tubes from bacteriophage T2L. *J Mol Biol*, **150**, 217-244.

Morais, M.C., Choi, K.H., Koti, J.S., Chipman, P.R., Anderson, D.L. and Rossmann, M.G. (2005) Conservation of the capsid structure in tailed dsDNA bacteriophages: the pseudoatomic structure of phi29. *Mol Cell*, **18**, 149-159.

Olson, N.H., Gingery, M., Eiserling, F.A. and Baker, T.S. (2001) The structure of isometric capsids of bacteriophage T4. *Virology*, **279**, 385-391.
Papadopoulos, S. and Smith, P.R. (1982) The structure of the tail of the bacteriophage phi CbK. *J Ultrastruct Res*, **80**, 62-70.
Parker, M.L. and Eiserling, F.A. (1983) Bacteriophage SPO1 structure and morphogenesis. I. Tail structure and length regulation. *J Virol*, **46**, 239-249.
Saigo, K. (1978) Isolation of high-density mutants and identification of nonessential structural proteins in bacteriophage T5; dispensability of L-shaped tail fibers and a secondary major head protein. *Virology*, **85**, 422-433.
Saxton, W.O. and Baumeister, W. (1982) The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *J.Microsc.*, **127**, 127-138.
Scheible, P.P., Rhoades, E.A. and Rhoades, M. (1977) Localization of single-chain interruptions in bacteriophage T5 DNA I. Electron microscopic studies. *J Virol*, **23**, 725-736.
Simpson, A.A., Tao, Y., Leiman, P.G., Badasso, M.O., He, Y., Jardine, P.J., Olson, N.H., Morais, M.C., Grimes, S., Anderson, D.L., Baker, T.S. and Rossmann, M.G. (2000) Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Nature*, **408**, 745-750.
Steven, A.C., Heymann, J.B., Cheng, N., Trus, B.L. and Conway, J.F. (2005) Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 227-236.
Trachtenberg, S., Galkin, V.E. and Egelman, E.H. (2005) Refining the structure of the Halobacterium salinarum flagellar filament using the iterative helical real space reconstruction method: insights into polymorphism. *J Mol Biol*, **346**, 665-676.
Wang, J., Jiang, Y., Vincent, M., Sun, Y., Yu, H., Wang, J., Bao, Q., Kong, H. and Hu, S. (2005) Complete genome sequence of bacteriophage T5. *Virology*, **332**, 45-65.
Wikoff, W.R., Liljas, L., Duda, R.L., Tsuruta, H., Hendrix, R.W. and Johnson, J.E. (2000) Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid. *Science*, **289**, 2129-2133.
Zweig, M. and Cummings, D.J. (1973a) Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein. *J Mol Biol*, **80**, 505-518.
Zweig, M. and Cummings, D.J. (1973b) Structural proteins of bacteriophage T5. *Virology*, **51**, 443-453.
Zweig, M., Rosenkranz, H.S. and Morgan, C. (1972) Development of coliphage T5: ultrastructural and biochemical studies. *J Virol*, **9**, 526-543.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Figure Captions

Figure 1. CryoEM visualization. (a) Area from a cryo-electron micrograph of phage T5 particles, including DNA-filled heads and empty particles. Capsids viewed along symmetry axes have distinctive appearances, such as the hexagonal views that indicate 3-fold axis (an example is marked with "3"), and the chevrons of the 2-fold axis (marked with "2"). The ice layer traps the tails, limiting the orientations of the capsids to freedom about the tail axis. Tails show a banded pattern with repeat of 43.8Å. Inset are images of particles taken closer-to-focus where the microscope contrast-transfer-function does not interfere with the DNA duplex spacing. Various patterns of DNA are visible, including a swirling pattern (top), striations (middle), and punctate appearance (bottom). Bars = 500Å. Views of the DNA-filled head particle along an icosahedral 2-fold axis include (b) exterior surface, (c) sectioned surface view with the front half of the capsid density removed, and (d) the central section corresponding to this sectioning plane. The reconstruction of empty maturated capsids obtained by urea-treatment, represented as exterior (e) and interior (f) surfaces, allows comparison of the capsid structure and visualization of the interior capsid surface. Bar = 200Å. (g) A radial density profile reveals the averaged layer spacing of the packaged DNA to be 24.4Å, and that the empty capsid has a slightly larger average radius than the DNA-filled head.

Figure 2. Localization of the gp10 decoration protein. (a) Removal of the external decoration molecule by treatment of wild type phage T5 with guanidine-HCl is revealed in a time course of capsid reconstructions, shown sectioned through a hexameric capsomer, at time points of 0 (top), 1 hour (center) and 3 hours (bottom). The decoration density (arrow) is greatly diminished after 1 hour and has disappeared after 3 hours. Bar = 100Å. (b) Reconstruction of mutant T5 particles lacking the pb10 gene shows hexamers absent of the central decoration density (c.f. Fig. 1b,e). Bar = 200Å.

Figure 3. Modeling the T5 capsid density with capsomers of HK97. (a) A side view and (b) an oblique view of the HK97 gp5 hexamer of fit into the empty T5 head reconstruction. The pb10 lump central to the T5 hexamer (arrow) has no analog in the HK97 capsid and is unoccupied, but much of the remaining density is well fit by the HK97 subunits. Differences occur at the gp5 E-loops and at the central domains (blue circles) adjacent to the pb10 binding sites, as well as the α3-α5 region that protrudes from the T5 capsid surface. Bar = 15Å. Inset is the atomic model of HK97 gp5 corresponding to the capsid subunit A position (PDB entry 1OHG (Helgstrand et al., 2003)).

Figure 4. Comparison of the major capsid precursor protein sequences: pb8 from phage T5, and gp5 from phage HK97. (a) Similar patterns of probability for coiled-coil domains are predicted in the precursor propeptides called the Δ-domains. The sequences are aligned by the mature N-termini resulting from proteolytic removal of these Δ-domains and much of the extra length of the T5 capsid protein is evident in an N-terminal extension of this domain into which the prediction for coiled-coil also extends. (b) Sequence alignment by PSI-BLAST detected structural homology in the mature capsid protein domains, excluding the N-terminal 26 residues, with several brief gaps mostly in the HK97 sequence that account for the 17-residue deficit in length. Secondary structure for the HK97 protein (Helgstrand et al., 2003) is indicated as light-shaded arrows (β-strand) and darker boxes (α-helix). The HK97

crosslinking residues, K168 and N356, are marked by an "X" beneath them, as is a third residue, E363, that may catalyze the reaction.

Figure 5. Visualization of the connector and tail by reconstruction of empty capsids with 5-fold symmetry imposed along the capsid-tail axis. (a) Surface rendition, showing a cutaway of the complex, and (b) central section through the density map corresponding to the section plane in (a). Density at the connector and in the tail is at the level of the capsid. Some internal density associated with the connector may have been diluted by the inappropriate imposition of 5-fold symmetry to this (presumably) 12-fold structure, but is nonetheless well above background. Bar = 200Å.

Figure 6. Preliminary analyses of the tail tube and tip. Cryo-EM images of tail tubes from phage particles were analyzed with helical methods and include 3-fold symmetry – an 11-disk segment of the 40-disk tube is shown as surface views in (a) and (b) and in longitudinal section in (c). The disks are trimers of pb6 with an axial repeat of 43.8Å and disk-to-disk rotation of 39.4°. A pair of disks are viewed end-on in (d) showing the relative rotation between disks, the bi-lobed nature of the pb6 subunits, as well as the smooth-walled ~50Å axial channel. (e) Sections through the density map corresponding to the center and edge of a disk, as marked in (a). The banded appearance of the tail tube is strongly evident in electron micrographs from (f) cryoEM and (g) negative stain EM, where the tip, tip-fiber and three tail-fibers are also readily visualized, as indicated by the inset cartoon. Negative stain images of the base of the tail were subject to helical reconstruction procedures, yielding the density map represented as a surface view in (h). Notable is a small 'baseplate' (arrowhead) almost twice the diameter of the tube and the same height as one of the tail tube disks. The conical tip is poorly visualized beneath it, and none of the fibers are seen, presumably due to misalignment and flexibility. Bars = 50Å for the reconstruction views, and 250Å for the micrographs (f&g).

Figure 7. Summary of the T5 structural information, including the capsid (blue) comprised of hexamers and pentamers arranged with t=13 geometry, localization of the pb10 decoration molecules (red) at the centers of the hexamers, the 1750Å-long tail tube comprising 40 trimeric disks, and the baseplate-tip complex (orange). The head-tail connector and tail fibers are represented schematically (yellow) as they are either only poorly resolved or not visualized at all. Bar = 250Å.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

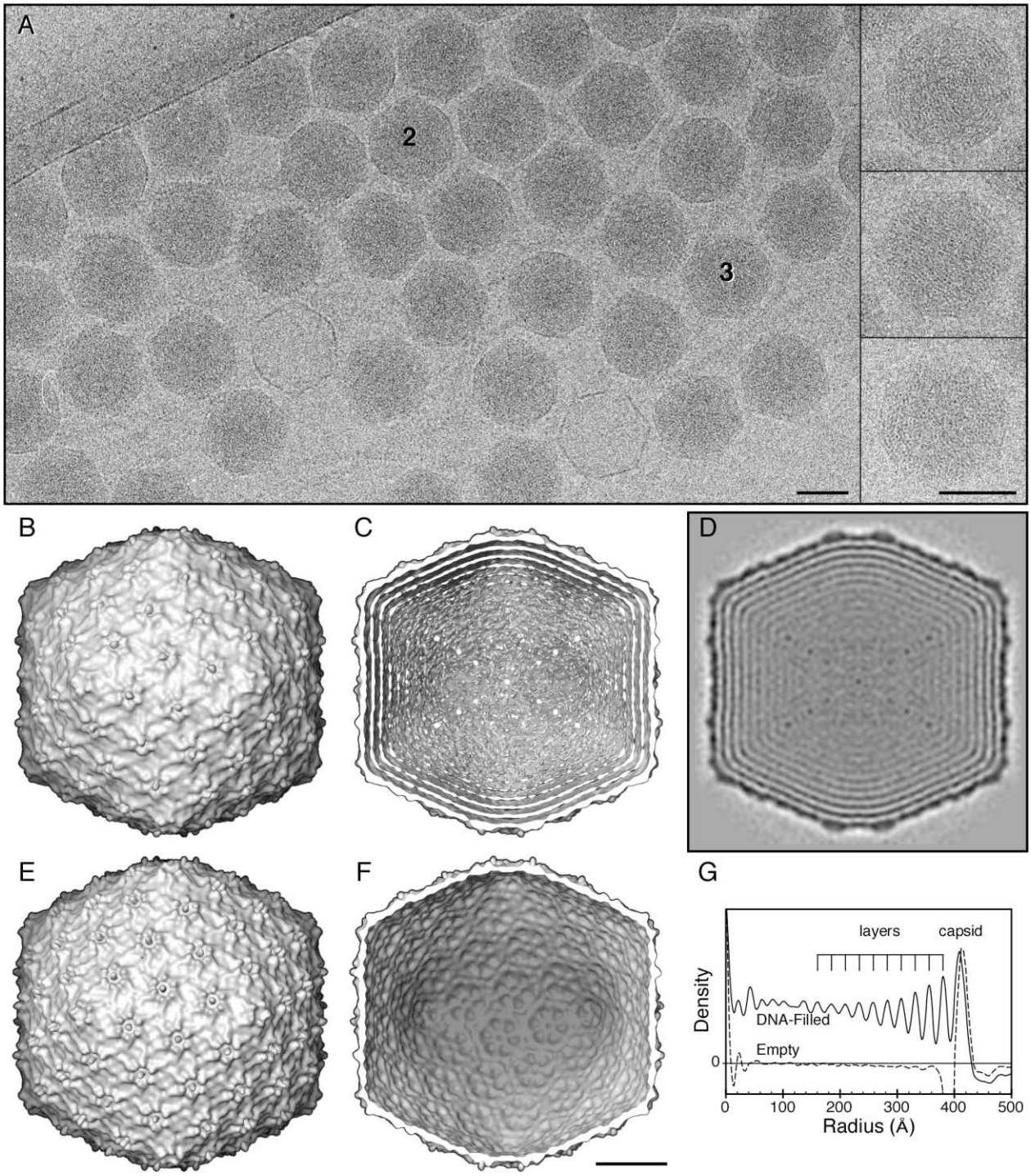


Figure 1. Effantin *et al*, Structure of phage T5.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

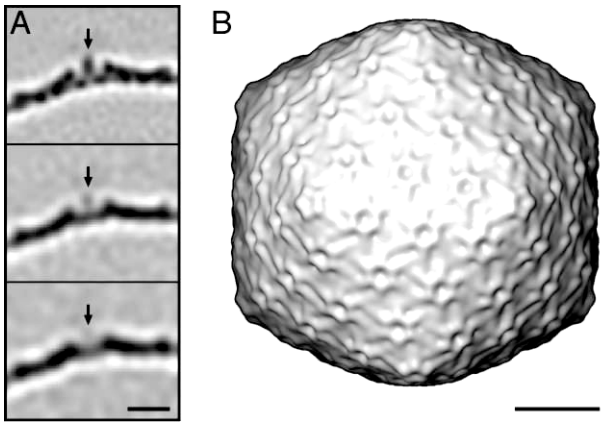


Figure 2. Effantin *et al*, Structure of phage T5.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

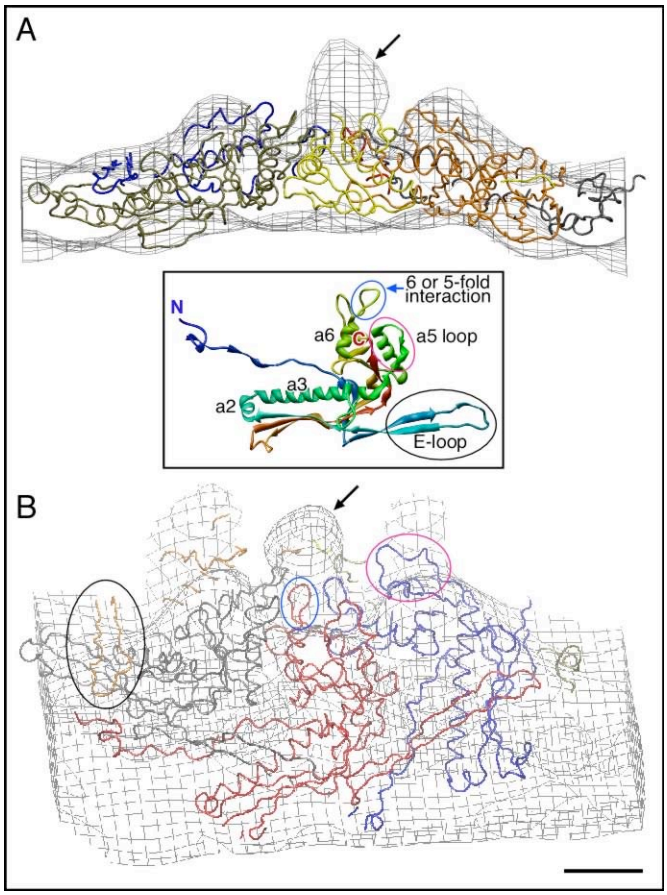


Figure 3. Effantin *et al*, Structure of phage T5.

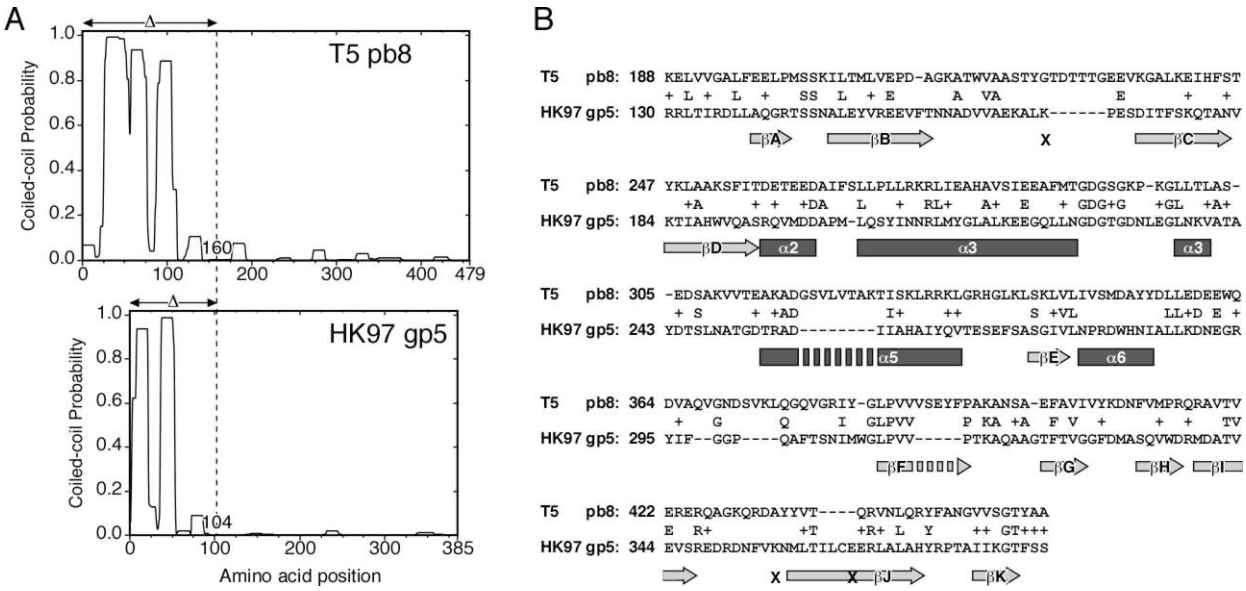


Figure 4. Effantin *et al*, Structure of phage T5.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

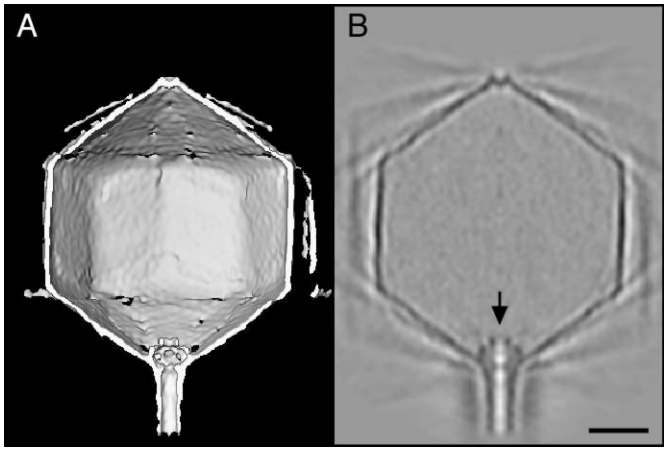


Figure 5. Effantin *et al*, Structure of phage T5.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

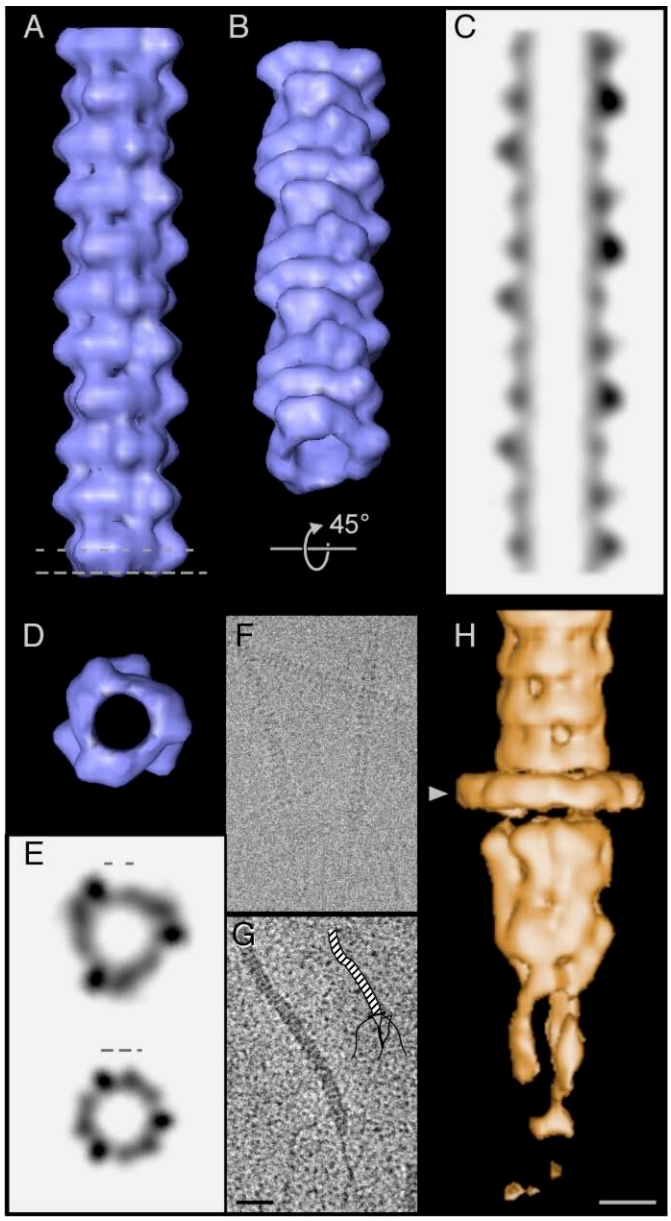


Figure 6. Effantin *et al*, Structure of phage T5.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

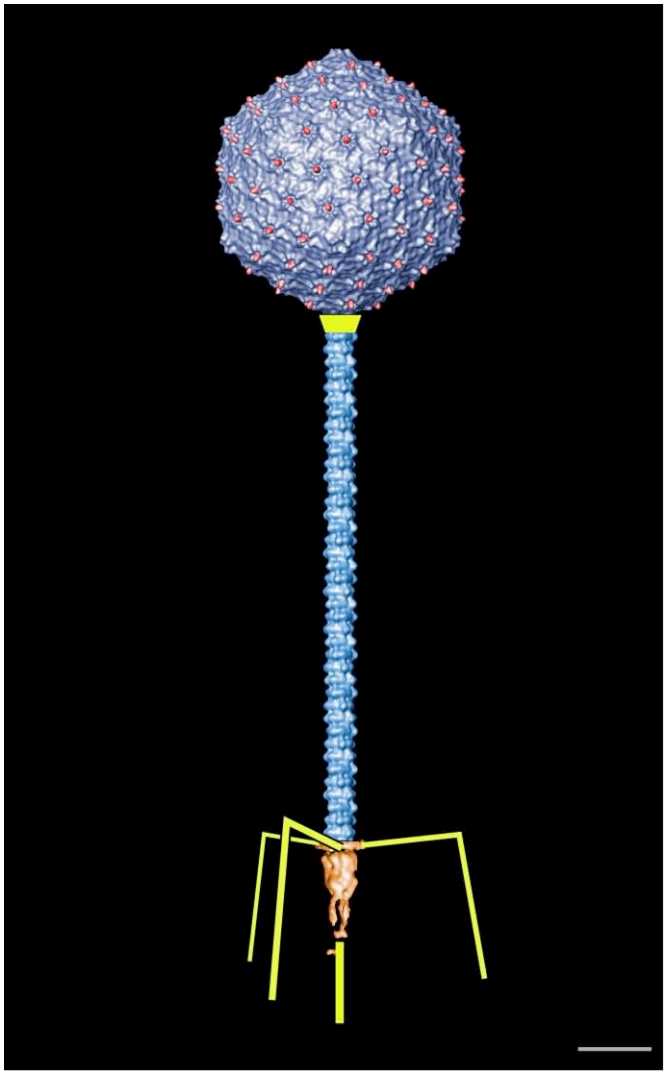


Figure 7. Effantin *et al*, Structure of phage T5.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Supplementary Information

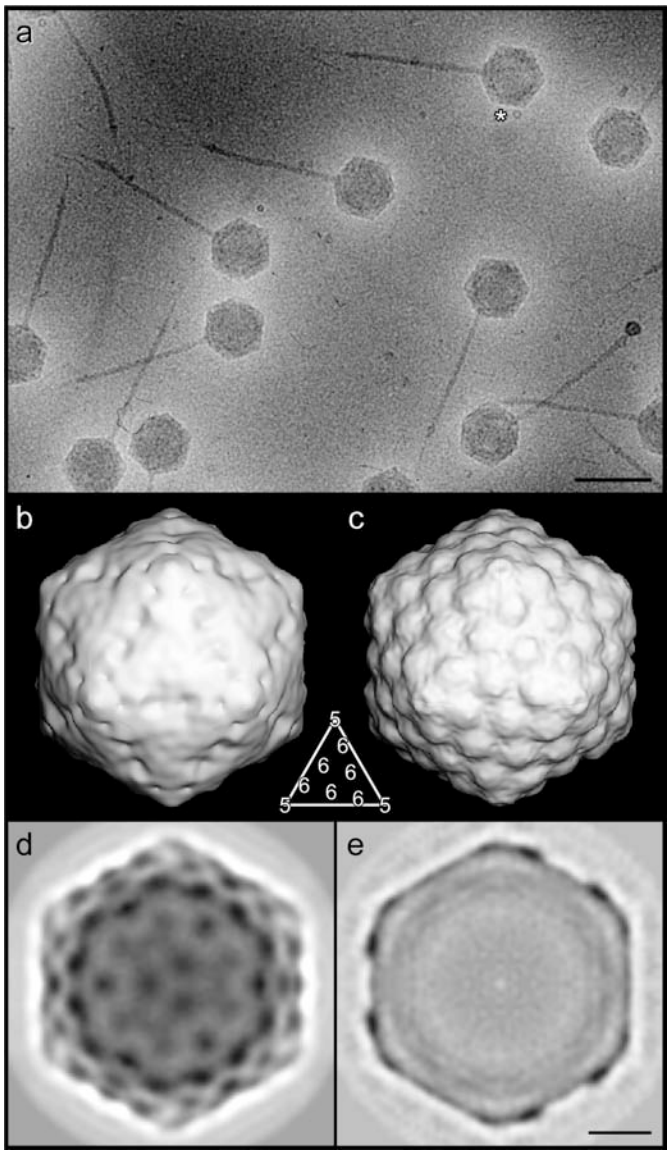
Capsid structure in negative stain EM

Since the icosahedral geometry of the T5 capsid was not known at the start of this study, the initial 3D analysis was performed on negative stain images where the high contrast was expected to lead more readily to a reliable structure solution, albeit at limited resolution, and providing that the capsids survived the relatively harsh preparation methods and dehydration. Several negative stains were tested, including uranyl acetate and sodium silicotungstate, but the best-preserved capsids were observed in 1% ammonium molybdate (Suppl. Fig. 1). Purified samples were examined by negative-stain electron microscopy on a JEOL 1200 EXII operating at 100 kV and magnification of 25,000x and an FEI CM12 operating at 120 kV and magnification of 35,000x. Capsid reconstructions were made from 1% ammonium molybdate stain images and following the procedure outlined for the cryoEM data (see Materials and Methods).

Adsorption of the long tails to the carbon support film tends to constrain the capsid orientations to views perpendicular to the capsid-tail axis. Several particles gave the appearance of being viewed along an icosahedral symmetry axis, such as one (indicated in Suppl. Fig. 1a) with a hexagonal outline that is consistent with a view along the icosahedral 3-fold axis. Estimation of this particle's orientation by self-common-lines yielded a high-scoring view near this axis, and a single-particle reconstruction was calculated including data to 45Å spacing. Although noisy and poor in detail, the planar facets and angular outline (Suppl. Fig. 1b) lends confidence that the orientation applied was accurate. Use of this density map as a starting model for a projection-matching algorithm led to rapid convergence of orientations for 513 negative-stain images and to a satisfactory structure which shows clear evidence of the skew triangulation number t=13 in the arrangement of surface knobs (Suppl. Fig. 1c). Reprojection of the density map along a three-fold axis (Suppl. Fig. 1d) yields an image that reproduces features of the raw particles, including the hexagonal outline, knobby appearance corresponding to the capsomer humps, and a striking inner ring of density brought about by superposition of capsomers on the top and bottom surfaces of the capsid. Previously we may have suspected that the appearance of such an inner ring was the result of the capsid collapsing due to the EM preparation, but that is clearly not the case here. Since the negative stain did not penetrate the capsid, the interior is largely unresolved (Suppl. Fig. 1e).

The method of solving virus structures with negative stain data, although used in the original work of Crowther and colleagues for developing the 3d analysis methods, has largely fallen out of favor since the advent of cryo-electron microscopy where protein is preserved in its native or near-native state. Nonetheless, cryoEM images present problems with high noise and low contrast that interfere with analysis methods such as self-common lines for determining particle orientations without use of a model. We are not aware of similar use of negative-stain electron micrograph data for starting a structure solution of cryoEM data for which no model is available, save at our suggestion (Doan et al., 2003). Not all viruses in our hands can be handled successfully in this way because of structural damage during preparation for microscopy. However, with some experimentation of different negative stains, a rapid analysis is possible and worth the small effort involved to try. In the case described here, with no prior knowledge of the structure, our negative stain solution at 35Å resolution was achieved in just 12 hours after insertion of the grid into the electron microscope. It is unlikely that the same could have been achieved so quickly by cryoEM. Further, the negative-stain structure proved suitable for starting the cryoEM analysis and undoubtedly saved days or weeks of time at this crucial step of the structural work.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005



Caption to Supplementary Figure 1. Bacteriophage T5 visualized by negative stain electron microscopy. (a) A field of particles contrasted with 1% ammonium molybdate and displayed with contrast revered (stain-excluding protein is dark) to match the cryoEM data of Fig. 1. Capsids appear regular and well preserved in this stain, and tails are mostly straight. In some cases, fibers and the tip are evident at the end of the distal end of the tail. One of the particles (asterisk) was chosen for the initial analysis – it has a hexagonal outline that is consistent with it being viewed along an icosahedral three-fold axis of symmetry. Bar = 1000Å. (b) A reconstruction of the selected particle, including data to a spatial frequency of $(45Å)^{-1}$, is represented as a surface shaded image (b). This structure was used as a model to solve orientations for other particles and led to the refined density map, calculated to $(25Å)^{-1}$, represented with surface shading (c). Inset is a guide to the capsomer geometry corresponding to triangulation number t=13*l*. (d) Reprojection of the density map along the icosahedral 3-fold axis, and (e) a central section through the density map perpendicular to the 3-fold axis (e). Bar = 200Å.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Maturation pathway of gifsy-2, an HK97-like phage of Salmonella

Gregory Effantin,[1] Nara Figueroa Bossi,[2] Guy Schoehn,[3]
Lionello Bossi[2] and James F. Conway[1]*

[1] Laboratoire de Microscopie Electronique, Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, 38027 Grenoble, France.
[2] Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France.
[3] Institut de Virologie Moléculaire et Structurale, FRE 2854 CNRS-UJF, BP181, 38042 Grenoble cedex 9, France.

*Corresponding & Present address:
Department of Structural Biology,
University of Pittsburgh,
E1340 Biomedical Science Tower,
200 Lothrop Street,
Pittsburgh, PA 15261,
U.S.A.
email: jxc100@pitt.edu
Phone: +1-412-383-7051
Fax: +1-412-648-2229

Running title: Phage Gifsy-2 capsid has similarities with HK97 & λ
Keywords: bacteriophage / Gifsy-2 / capsid / cryo-electron microscopy
Abbreviations: cryoEM – cryo-electron microscopy; Å – Ångstrom; bp – base pairs.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Abstract

Bacteriophage genomes are distinctly mosaic, and as more structures are solved, the phage morphologies also demonstrate a mosaic pattern. We have solved capsid structures for several maturation intermediates of Gifsy-2, a lambdoid phage infecting salmonella, by cryo-electron microscopy and three-dimensional image reconstruction to resolutions up to 12 Ångstroms. The capsids have the lambdoid T=7 geometry and are well modeled with the atomic structure of the HK97 major capsid protein, gp5. Additional decoration density is also fit with the phage λ gpD trimer. On the genetic level we observe a long gene encoding the mature gifsy-2 capsid protein at the C-terminal end, and find striking homology with the Clp-P protease at the N-terminus including alignment of the catalytic triad. The central domain encoding ~200 amino acids is presently of unknown function, but by analogy with related phage genomes it is expected to have scaffolding and/or decoration functions. This unique gene structure is a variation on the known phage structural gene layout, and gives rise to a capsid maturation pathway that engages features from phages λ and HK97.

Introduction

Bacteriophages are estimated to outnumber their hosts ten-fold, and unsurprisingly to be intimately involved in bacterial evolution through gene transfer. While many of the transferred genes might be simply tolerated by the host, some may be sufficiently beneficial to represent a sort of rent-paying arrangement between the bacteria and parasitic phages. A few of these phage-delivered genes encode toxins of direct medical importance, such as the cholera toxin of the filamentous phage, CTXΦ, that infects *Vibrio cholerae* (Davis et al., 2000; Davis and Waldor, 2003). The vast majority of viruses in the biosphere are tailed icosahedral phages (Hendrix, 2002) but with many morphological and structural variations. But despite large-scale differences in architecture, several common themes connecting diverse members of this Order have emerged. At the level of molecular morphology, a number of the phages observed to date follow assembly pathways with common general principles (Fig. 1). The capsid assembly pathways of several lambdoid phages have been studied extensively, including the E. coli bacteriophages (or coliphages) λ (Hendrix and Casjens, 1975; Hohn, 1975; Murialdo and Ray, 1975), HK97 (Conway et al., 1995; Duda et al., 1995a; Duda et al., 1995b; Duda et al., 1995c), T7 (Cerritelli et al., 2003), and the Salmonella phages P22 (Thuman-Commike et al., 1996; Zhang et al., 2000). In each case, a precursor capsid (procapsid or prohead) assembles with the aid of a scaffold protein or domain into a round particle obeying icosahedral symmetry save for one vertex that is occupied by a dodecameric portal or connector. For many phages, the major capsid protein(s) are N-terminally truncated by a phage-encoded protease, yielding a metastable particle primed for DNA packaging and capsid expansion. The dsDNA genome is packaged through the connector, triggering expansion of the capsid into the larger and polyhedral mature form, and subsequently the tail, assembled by an independent pathway, will bind to the connector. Another common but not universal step is the binding of one or more accessory proteins to the exterior surface of the expanded capsid for enhancing stability.

At the level of the capsid geometry as well as capsid protein fold, a second and emerging theme connecting phages and other viruses is the recognition of several distinct lineages (Bamford et al., 2002). One of these is exemplified by the adenovirus and phage PRD1 capsids and respective "hexon" proteins and this has recently been extended to the archaeal virus STIV (Khayat et al., 2005; Rice et al., 2004); another, the reovirus and phage phi6 cores; and a third, the phage HK97 gp5 fold that may be representative of capsid proteins for all tailed phages as well as animal viruses such as herpesvirus (Duda et al., 2005; Steven et al., 2005). This essentially common building block of the capsid may be considered as a

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

minimum structural unit that is elaborated according to each virus by appending specific features. For example, HK97 gp5 has the ability to form crosslinks that stabilize the mature capsid, whereas assembled and expanded λ gpE and T4 gp23 present binding sites for trimeric accessory molecules of gpD and soc, respectively, that appear to fill a similar role. A third unifying theme apparent at the genomic level, albeit with much diversity, is the placement of structural genes. The head genes of tailed phages are often observed in the order: connector, protease, scaffold, major capsid protein (Hendrix and Duda, 1998). Minor capsid proteins, such as the lambda gpD, may appear before the major capsid protein, and some of these functions may be combined into one gene, such as the protease-gpC/scaffold-gpNu3 of λ and the scaffold/major capsid protein gp5 of HK97. Nonetheless, the three general patterns hint that diverse phages and viruses share a common heritage.

Here we present our first structural analysis of the lambdoid phage, Gifsy-2, that exhibits new variations on the characteristics embodied by known lambdoid phages. Gifsy-2, first identified as a prophage in the Salmonella LT2 genome (Figueroa-Bossi et al., 1997), is an active bacteriophage that can be released from strain ATCC14028 (Figueroa-Bossi and Bossi, 1999). It carries genes that contribute to salmonella virulence, such as the SodC gene (Figueroa-Bossi et al., 2001), and as it is found in different Salmonella typhimurium strains, it is suspected to have a role in horizontal gene transfer in bacteria. Gifsy-2 is also capable of infection and lysogenization of Salmonella serovars other than typhimurium (Figueroa-Bossi et al., 2001). The gifsy-2 dsDNA genome is 45.5kb in length and shares significant similarities with other known phages (Thomson et al., 2004). In the present study, we focus on the structural genes that code for proteins involved in capsid assembly.

Using cryo-electron microscopy data, we have determined structures for several forms of the gifsy2 capsid allowing comparison with related phage capsids, in particular those of coliphages λ and HK97. This is extended by use of bioinformatics to compare protein and gene structures, allowing an assessment of a new layout for the structural genes. Our results add to the diversity of phage assembly strategies and offer directions for future experiments that will confirm and extend the degree of connectedness between viruses of different host types and with different morphologies.

Results

Identification of the major capsid protein gifsy-2 and its gene

Induction and purification of gifsy-2 yielded primarily procapsids as assessed by electron microscopy. N-terminal sequencing of denatured particles allowed us to identify the constituent proteins of the capsid. The strongest band had Mr ~32 kDa, a common size for the proteolysed form of major capsid proteins of lambdoid phages, and the N-terminal was coincident with a peptide from a large gene encoding 693 amino acids (Mw ~ 75 kDa; Genbank NP_460008). Both the starting point for this putative capsid protein and its size are consistent with it coming from the carboxy-terminal 292-295 amino acids of the larger protein. This region shows weak local homologies with the major head subunits of the enterobacteria phage Mu (gpT: NP_050638) – 28% identity over 70 residues by BLASTP – and of phage Pnm1 (NP_284557) with 36% identity over 75 residues (Morgan et al., 2002). We conclude that this protein is the mature form of the major capsid protein of Gifsy-2 and is a proteolysed product of a precursor in the Gifsy-2 assembly pathway.

Although proteolysis of the major capsid protein is common in lambdoid and other phage assembly pathways, the full-length precursor form of the protein is not typically so large as 75 kDa, and clearly the gifsy-2 gene bears closer inspection. Intriguingly, the N-terminal part of

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

the transcript of this large gene shares significant sequence homologies with the Clp protease family (23% identity over 193 residues with the ClpP sequence solved crystallographically: PDB 1TYF) including alignment of gifsy-2 residues Ser96, His119 and Asp180 with the catalytic triad of ClpP (Fig. 2). The central domain of ~200 residues has no obvious homology with other phage proteins and appears to constitute a distinct domain. Keeping in mind that the genes of proteins involved in assembly of phage capsids are often adjacent and in the order portal, protease, scaffold and capsid, the long 75 kDa sequence appears to fulfill at least two of the functions – protease and capsid – and a reasonable hypothesis is that the central domain may include a scaffolding role. In keeping with the general pattern, we observe that the translated adjacent upstream gene scores most highly in BLASTP searches with phage portal proteins, including 48% identity with the λ gpB portal protein. While dual-function protease/scaffold and scaffold/capsid protein genes have already been observed (e.g., in λ and HK97 respectively), this proposed tri-function protease/scaffold/capsid gene layout is a novel departure.

Cryo-electron microscopy reconstructions of gifsy-2 capsids

Following induction and lysis, some "unfinished" particles (procapids, empty mature capsids, aberrant particles) are released from the bacteria in addition to functional phage. After four subcultures, these unfinished particles accumulate in solution. In sucrose gradient purified samples we observe by electron microscopy a majority of procapsids and a few expanded capsids (Fig. 3a). During storage at 4°C, the proportion of expanded capsids to procapsids increases, from ~1:10 to ~1:4 after 4 weeks (Fig. 3c). Close inspection of the exterior edges of the expanded particles (Fig. 3c) reveals two kinds of particle: one with additional density on the outside (arrow right insert) and one without (middle insert). We assume that the decorated particles are fully mature capsids that have bound an accessory protein but lost their cargo of DNA, possibly as a result of our handling that has dislodged the tails. The bare particles are likely procapsids that expanded spontaneously, as happens for HK97 and T7, but in the absence of decoration molecules. We also noted a few procapsids with darker appearances that may represent unproteolysed or partially proteolysed procapsids, akin to the HK97 prohead I which is also darker in appearance than the proteolysed prohead II (Conway et al., 1995). However, these were too few for structural analysis. In total we have 4 different capsid forms in solution: dark procapsid, procapsid, expanded procapsid and empty mature capsid. The structures of three of these have been determined by cryo-electron microscopy and image analysis (see Table 1 for details). All the capsid forms exhibit icosahedral symmetry with a triangulation number T=7 as is common for λ-like bacteriophages.

Procapsid reconstruction.

The procapsid reconstruction achieved the highest resolution of this study – 11.8Å – due to the large dataset of particles from which 6200 images were included in the final map (Fig. 4a). The exterior surface reveals the typical T=7 arrangement of pentamers at the vertices and hexamers elsewhere. The latter are skewed and respect non-imposed pseudo two-fold symmetry, as for HK97 (Conway et al., 1995). The sectioned view of the interior surface emphasizes the highly contoured capsid wall that includes the capsomer blisters as well as clusters on the local 3-fold axes separated by distinct grooves at the 2-fold axes. These trimeric clusters appear to mediate contacts between capsomers. The central section (Fig. 5a, left) corresponding to the sectioning plane reveals pores in the capsid along the 5-fold and local 3-fold axes indicating that the structure is not fully closed and would allow the exit of

peptides (such as products of proteolysis), as proposed for the HK97 prohead (Conway et al., 1995).
The gifsy-2 procapsid is at the same stage along the assembly pathway as the Prohead II of HK97: proteolysed and ready for packaging the DNA genome and for expanding. The trimmed lengths of the two capsid proteins are 32 and 31 kDa for gifsy-2 and HK97 respectively. In comparison with the HK97 prohead II structure, solved to 12Å resolution by cryoEM (Conway et al., 2001), the overall morphology of the gifsy-2 procapsid is quite similar, especially the skewed hexamers. Central sections side-by-side (Fig 5a,b) show similar general features but differences in diameter (570Å for Gifsy-2, d = 470Å for HK97) and degree of curvature in the region of the vertices.

Expanded procapsid reconstruction.

The observation of spontaneous expansion among purified procapsids in storage buffer indicates that the procapsid is capable of embarking upon maturation. However, as not all procapsids have expanded, we may suppose that there are one or more intermediate states between procapsid and expanded procapsid that could be persistent enough to be represented in the micrographs (Lata et al., 2000). Any such images may be difficult to distinguish from the two end-points but we think not to have inadvertently included many such particles since we achieved a quite respectable resolution of 15.3Å from 3281 particle images for the expanded procapsid map. The surface views (Fig. 4b) show the large scale of the changes when compared to the procapsid. The general aspect of the expanded procapsid is flatter than the procapsid – the capsid wall thickness is reduced from 44 to 30Å while the diameter has increased to ~630 Å and the interior volume is larger by ~58%. As for HK97, the hexamers are no longer skewed and now exhibit 6-fold symmetry or close to it. On the exterior surface, we see a continuous groove surrounding each hexamer and pentamer, appearing to delimit the boundary between capsomers, and the main intra-capsomer contacts seem to be located at the 3-fold axis as for the procapsid but on the outside surface. Comparing the central section with that from the atomic model of the HK97 mature capsid rendered at the same resolution (Fig. 5b) reveals a similar thickness for the capsid wall and similar overall shape, with gifsy-2 being larger, less angular and with more protrusions.

Empty mature capsid reconstruction.

The empty mature capsid was the least well represented among the three different gifsy-2 capsid forms on the cryo-electron micrographs and was difficult to distinguish from the expanded procapsid. However, careful assignment of particles to one or the other class yielded quite distinct results. The exterior surface of the empty mature capsid, resolved to 16.7Å (Fig. 4c), has the same organization of pentamers and hexamers as the other capsids as well as similar shape and dimensions as the expanded procapsid. However, additional density is visible at all sites of local 3-fold symmetry, consistent with the cryoEM images, and which represent a decoration molecule. By location, this molecule is analogous to gpD of phage λ (Dokland and Murialdo, 1993) and soc of phage T4 (Iwasaki et al., 2000), both of which form trimers, but its mushroom-like shape (Figs. 4f, 5c) is more reminiscent of the gpD trimer that is necessary for stabilization of the capsid and for packaging the full viral genome (Sternberg and Weisberg, 1977; Yang et al., 2000). We suppose that this gifsy-2 decoration molecule is similarly a trimer and involved in capsid stabilization, binding during or after capsid expansion. The gifsy-2 molecule is larger than λ's gpD, as visualized in the comparison of sections (Fig. 5c) and when modeled by the λ gpD trimer (see below). The interior surfaces of the gifsy-2 expanded procapsid (Fig. 4b) and mature capsid (Fig. 4c) appear unchanged by

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

binding the decoration molecule, suggesting that the contact is entirely on the outer surface. However, the estimated interior volume of the mature capsid is 7% larger than for the expanded procapsid indicating that binding the decoration molecule induces some small change on the capsid.

Detailed mechanism of the binding of the minor capsid protein

The binding site of the decoration protein on the gifsy-2 capsid is revealed in more detail by comparing sections perpendicular to the binding site at the icosahedral 3-fold axis from the expanded procapsid and empty mature capsid as well as from a difference map calculated between them (Fig. 6). At a radius just beneath the exterior surface of the capsid (column A), no difference density is visible at the icosahedral 3-fold axis, although adjacent, obliquely sectioned trimer densities appear at the periphery of the sections. At the capsid surface (column B), three small spots, surrounded by the colorized hexamer densities, indicate the onset of the central trimer which strengthens towards the radius of the hexamer tips (column C) and merge into a strong, trimeric blob above the height of the hexamers (column D). Contacts between the trimer and the underlying hexamers are evident in the empty mature capsid sections (columns B & C).
Correlation of the density sections and surface features allows us to distinguish subunit boundaries and propose a model for the pattern of interactions between the capsid and decoration proteins, as indicated schematically in Figure 7. According to the numbering system for HK97 capsid protein subunits (Conway et al., 2001), D subunits from 3 hexamers approach at the icosahedral 3-fold axis but do not appear to have extensive contacts as there is a noticeable groove separating them in the expanded procapsid surface (Fig. 7a). The decoration molecule of the mature empty capsid (Fig. 7b – indicated in yellow) appears to contact the capsid surface in these grooves, each decoration subunit contacting two of the D subunits, and also extending away from the 3-fold axis towards an adjacent E subunit. This pattern is repeated at the local 3-fold sites with the local capsid subunits. In summary, the decoration molecule appears to contact as many as six capsid protein subunits, presumably conferring significant stability on the expanded gifsy-2 capsid.

Structural comparison of Gifsy-2 with available atomic models

The mature HK97 capsid, solved crystallographically (Helgstrand et al., 2003; Wikoff et al., 2000), has been successful in modeling the major capsid proteins of phages T4 (Fokine et al., 2005) and phi29 (Morais et al., 2005), and fits very well into the cryoEM structures of phages P22 (Jiang et al., 2003) and T5 (Effantin et al., 2005) despite low homology at the protein sequence level. The HK97 gp5 fold may well represent a family utilized widely by phages and possibly some animal viruses (Duda et al., 2005; Steven et al., 2005). Given the apparent similarities in the ordering of structural genes, and the capsid geometries between HK97 and gifsy-2, we have attempted to dock the HK97 gp5 subunit atomic model into our density map of the mature capsid (Fig. 8 a,b). Even at 16.7Å resolution, the fit is visibly good for the core A and P domains of HK97 gp5, with most difference for the region of the P domain adjacent to the 3-fold axes (Fig. 8a). This may be expected as the gifsy-2 capsid binds a decoration molecule here while HK97 does not. The remainder of HK97 gp5 – the E-loop and N-terminal arm – does not fit well, and again we may expect this as the functions of these regions are not expressed in the same manner for gifsy-2. In particular, a residue at the tip of the HK97 E-loop is cross-linked to a neighboring subunit and no such crosslink is evident for gifsy-2. This crosslink is most likely a stabilizing mechanism that is an alternative to binding decoration molecules. A region of unoccupied density in the gifsy-2 map (ovals in Fig. 8b) is

adjacent to the HK97 gp5 E-loops, and we may suppose that the gifsy-2 capsid protein is folded differently from the E-loop so as to fill this region. The proteolysed gifsy-2 capsid protein is also approximately 10 residues longer than for HK97, and these residues may also contribute to the unmodelled volume.
We have also fit the HK97 gp5 subunit from a pseudo-atomic resolution structure of the HK97 procapsid (Conway et al., 2001) into our density map of the gifsy-2 procapsid (Fig. 8c,d). Most observations for the empty mature capsid fitting also apply here, despite the ~40Å and ~40° tumbling of the HK97 gp5 subunits from their positions in the mature capsid. As before, the E-loop noticeably extends outside the gifsy-2 density map and an unoccupied region of density is adjacent to it. The two procapsid maps differ more by size than the mature capsid maps do and our modeling indicates that the differences are principally in curvature of the capsid and in the pentamer, which is wider for gifsy-2 than for HK97 (Fig. 8d). These differences precluded our docking the HK97 asymmetric unit directly into the gifsy-2 procapsid, and instead we modeled the procapsid with the HK97 gp5 hexamer and a pentamer subunit allowing some freedom of movement for the latter.
The decoration molecule was also modeled by fitting the atomic model of the λ gpD trimer (Yang et al., 2000) into the gifsy-2 empty mature capsid (Fig. 8e,f). The gpD molecule follows the shape of the gifsy-2 density very well, especially the lobes that give the strong trimeric appearance, although it is clearly smaller leaving some unoccupied density at the top of the gifsy-2 mushroom, corresponding to ~15 residues per monomer, and also at the base. As the gpD crystal structure lacked the amino-terminal 14 residues, which interface with the capsid surface, the poor fit at the base is expected, and combined with the poor fit for the adjacent major capsid subunit density, modeling of the decoration-capsid interface was not possible. However, the λ gpD interaction with the underlying capsid protein (gpE) appears more limited to the 3-fold subunits in the D positions, and not with those in the more distant E positions, by inspection of sections through the mature λ capsid reconstruction (Fig. 7). Generally the morphological evidence supports assignment of the gifsy-2 decoration molecule as the analog of λ gpD and to be formed by a trimer of a similarly sized protein.

Discussion

Several lambdoid phage capsids have been solved to moderate resolution by cryoEM, including λ (Dokland and Murialdo, 1993; Yang et al., 2000), P22 (Jiang et al., 2003; Zhang et al., 2000), and T7 (Cerritelli et al., 2003), and one – HK97 – has solved crystallographically (Helgstrand et al., 2003; Wikoff et al., 2000). Other capsids with related structural features include T5 (Effantin et al., 2005), phi29 (Morais et al., 2005) and T4 (Fokine et al., 2004; Fokine et al., 2005). These capsids generally assemble as a precursor expressing asymmetric hexons, but expand into a thin-walled polyhedral capsid with hexon asymmetry cured. The capsid morphologies and underlying folds are becoming increasingly familiar, with the HK97 gp5 capsid protein fold found to date in the T4 and phi29 major capsid proteins, and consistent with the other capsids for which less detailed structures are available. Gifsy-2 does not depart from this pattern, but does extend it further in certain directions. The good fitting of the core HK97 gp5 domains suggests that it too may have the HK97 fold, although sequence homology is typically low, and similarly its decoration molecule appears to be a close structural analog of λ's gpD (see below). This mosaic of structural features is reflected in the mosacity of phage genomes in general. Furthermore, the unique capsid gene structure appears also to be a combination of HK97 and λ strategies that would be expected to have consequences in the assembly pathway. These points will be developed below.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

One of the unique aspects of gifsy-2 is the long capsid protein gene that includes three regions: the N-terminal Clp protease-like domain, a central domain of unknown function, and the C-terminal mature capsid protein as established by N-terminal sequencing of assembled particles. It is tempting to speculate that the central domain performs a scaffolding role, similar to that proposed for the N-terminal 102 residues of the HK97 gp5 capsid protein and the N-terminal 159 residues of the T5 gp8 capsid protein, and that the viral protease removes itself and this domain after assembly of the first procapsid form, but we have as yet little direct evidence to support this other than the visualization of a few "dark" procapsids that conceivably retain some unproteolysed scaffold-capsid protein. N-terminal sequencing was not definitive on this point as the vast majority of particles were proteolized and the evidence already removed. A distinctive feature predicted for the HK97 and T5 N-terminal domains is a high proportion of coiled-coil, but in the gifsy-2 central region we see only a very modest prediction. However, the λ gpC/Nu3 gene that combines protease and scaffold functions likewise has no remarkable prediction for coiled-coil structure. Gifsy-2 may once again combine features of HK97 and λ to produce a unique assembly strategy – combined protease-scaffold that is covalently-linked to the capsid protein. To address this, we propose to express mutants of the long capsid protein gene with the Clp protease catalytic residues replaced, thereby hoping to assemble large quantities of particles corresponding to the unproteolysed HK97 prohead I.

Both the interior and exterior surfaces of the gifsy-2 capsid appear to have special features related to the local and icosahedral three-fold sites. The protruding trimer clusters on the inside of the gifsy-2 procapsid are more marked than for the HK97 prohead II, and bear some resemblance to the 'nubbins' of density observed on the interior of the T7 procapsid that may be remnants of the gp9 scaffold protein (Cerritelli et al., 2003). The internal 3-fold sites of the phage P22 capsid are also involved in interactions with scaffold proteins (Thuman-Commike et al., 1999a; Thuman-Commike et al., 1998). Preliminary analysis of the few gifsy-2 "dark" procapsids reveals additional density continuous with the internal local 3-fold sites that is likely to be scaffolding and follows the T7 and P22 binding patterns (data not shown). We conclude that the trimer clusters we observe in the gifsy-2 procapsid reconstruction most probably includes the post-proteolysis N-terminal of the mature capsid protein.

Supplementary proteins that bind as trimers to the external 3-fold sites and stabilize the mature form of the viral capsid have been observed for other phages, including T4's soc (Iwasaki et al., 2000; Olson et al., 2001) and λ's gpD (Dokland and Murialdo, 1993). The T4 soc molecule binds around the hexamers (but not the pentamers) forming continuous rings, unlike the more 3-fold-localized mushrooms observed for gifsy-2 and λ. The differences in shape and in contact area with the capsid likely reflect different structural requirements between the larger T4 capsids and the T=7 lambdoid phages. Although the gifsy-2 decoration molecule has a similar trimeric shape to the λ gpD trimer, it has extra density located near the corresponding C-terminal of each gpD monomer (see Fig. 8) suggesting a longer protein. The sequence of the gifsy-2 molecule is currently unknown, but since no part of the gifsy-2 genome scores any significant homology with λ gpD, the two proteins are clearly unalike at this level despite structural similarity, much as for viral capsid proteins in general.

The λ gpD molecules are essential for packaging of the complete λ genome (Sternberg and Weisberg, 1977) and will bind gpD$^-$ capsids (analog to the gifsy-2 expanded procapsid) but not to procapsids (Imber et al., 1980). This suggests that the accessory protein is necessary for accommodating the high internal pressure of the packaged DNA (Kindt et al., 2001) but expansion is required to establish the binding site. We suppose that the gifsy-2 molecule has the same function and binding pathway, although the details of binding appear to be different by comparison of cryo-EM density maps (Fig. 6). The orientation of the binding interface is rotated and the gifsy-2 subunit appears to extend further, contacting 2 subunits beyond those

adjacent to the 3-fold site. Note that the atomic model of the gpD trimer does not include the N-terminal 15 residues that bind the capsid, possibly because they are not constrained by the binding interface, and so is mute on the likely footprint of gpD on the capsid surface.

Materials and Methods

Bacterial strains

Two different strains of Salmonella Typhimurium ATCC14028 were used to produce bacteriophages. Gifsy-2 phage was induced in the donor strain, MA7599 (gifsy-1$^-$/gifsy-2$^+$/gifsy-3$^-$), to a concentration of 10^4 ph/mL after overnight incubation in LB at 30°C. Amplification of gifsy-2 was done by the recipient strain, MA6710 (gifsy-1$^-$/gifsy-2$^-$/gifsy-3$^-$), also cultured overnight in LB at 30°C without shaking. Unless specified, the buffer used for dilution, pellet suspension and sucrose gradient is a λ-dil like buffer (10 mM Tris-HCl.pH7.5, 10 mM $MgSO_4$) (Dokland and Murialdo, 1993). The two strains were cured of phages gifsy-1 and gifsy-3 to avoid contamination as these have been shown to grow more easily than gifsy-2 (Figueroa-Bossi and Bossi, 1999).

Capsid preparation

Gifsy-2 procapsids, expanded procapsids and empty matured capsids were obtained as follows. First, after an overnight culture of both strains MA7599 and MA6710 (10^9 bacteria/mL), 100µl of the supernatant of MA7599 (9000 rpm, 5-10 min) were mixed with 100 µl of the 10^{-4} dilution of MA6710 (m.o.i = 1) in 2.5 mL of LB. To improve the phage titer (10^7 ph/mL), the same mixing was repeated at an m.o.i. = 1 with 100 µl of the supernatant of MA7599 and 100 µl of the 10^{-2} dilution of MA6710. The phage mixture was then sub-cultured at the same m.o.i in 30 mL of LB (1.5 mL of MA7599 supernatant with 150 µl of MA6710) and finally in 1L of LB (30 mL of MA7599 supernatant with 15 mL of MA6710). The last lysate was purified essentially as described (Yamamoto et al., 1970). First, it was treated with DNAase (1µg/mL) for 30 min at room temperature with shaking. NaCl was added to a final concentration of 1M with shaking and left on ice for 1h. Cells debris was removed by centrifugation at 8500 rpm, 25-30 min (Beckman JA-10) until the supernatant clarified. The phage particles were directly pelleted by centrifugation at 18000 rpm for 2h (Beckman JA-20) or subjected to an overnight precipitation (at 4°C) by addition of PEG8000 (10% w/v) followed by pelleting at 8500 rpm, 30-40 min (JA-10). For both methods, the pellets and the precipitated material were gently suspended in fresh buffer overnight at 4°C. The crude sample of particles was sometimes concentrated by ultracentrifugation on a TLS-55 rotor (30000 rpm, 2h) to obtain sufficient material for loading on top of a 15-30% sucrose gradient (Thuman-Commike et al., 1999b) which was centrifuged at 25000 rpm for 4h on a SW40 rotor. The most pure fractions of 1mL were identified by SDS-PAGE as well as direct visualization by negative-stain electron microscopy. The rejected impure material from the first sucrose gradient was reloaded onto a fresh sucrose gradient. The purified gifsy-2 particles (essentially procapsids) were pooled together, dialyzed against a new buffer (50mM Tris-HCl (pH = 7.6), 100 mM $MgCl_2$) for storage and concentrated with a Centricon 100kDa filter (Millipore). A 5-fold dilution was assayed for purity by negative stain EM prior to imaging by cryoEM.

Electron microscopy

Samples were prepared for negative-stain EM by pipetting ~2µl of sample between a sheet of mica and a film of evaporated carbon, floating the carbon film off in a pool of negative-stain (uranyl acetate for procapsids or ammonium molybdate for heads), placing a copper EM grid

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

on the floating film, and picking this up with a particularly absorbent type of newspaper. The grid-carbon-sample sandwich was placed on filter paper to blot and air-dry for at least 10 min before insertion into the column of a JEOL JEM 1200EX II microscope equipped with a tungsten filament and operating at 100 kV.

Cryo-electron microscopy was performed according to a standard procedure (Cheng et al., 1999). Briefly, ~2µl of purified sample at a concentration of 0.5-1 mg/ml was pipetted onto a copper grid covered by a thin holey carbon film. Excess liquid was removed by a brief blotting before plunge-freezing the grid into liquid ethane cooled by a liquid nitrogen bath. Frozen grids were transferred to a Gatan 626 cryoholder and inserted into an FEI CM200 with a LaB_6 filament operating at 200 kV, maintaining liquid nitrogen temperature throughout. Images were and taken at a nominal magnification of 38000x. For each selected area, image pairs were taken within a range of defocus of -1 to -4µm.

Three-dimensional image analysis

Negatives were screened for particle appearance and overlap, thickness and quality of ice, apparent defocus (contrast) and drift. 51 image pairs were selected and scanned on a Z/I Photoscan (previously called the Zeiss SCAI) at a step size of 7µm corresponding to 1.84Å/pixel at the sample. Image analysis followed an established method (Conway and Steven, 1999) but starting from reconstructions calculated from negative-stain images (Effantin et al., 2005). Resolution estimation was done by calculating the Fourier Shell Correlation (Saxton and Baumeister, 1982) between independent half-dataset density maps and applying a cutoff at a correlation coefficient of 0.3 (see Supplementary Information). Details of the reconstructions are listed in Table 1. All analyses were run on PowerMac G5 computers (Apple Computer, Cupertino CA, USA) and surface views of reconstructions were generated with Amira (Mercury Computer Systems/3D Viz group, San Diego CA, USA and Merignac, France) running on Linux workstations (Dell, Austin TX, USA).

Images of expanded procapsids and mature empty capsids, being visually similar, were treated together during the first part of the analysis. The numerical dominance of expanded procapsids led to a solution that excluded the mature empty capsids. These excluded images were then refined independently to give the density map for the mature empty capsid of gifsy-2.

SDS polyacrylamide gel analysis and amino-terminal protein sequencing

Pre-cast gels (15% acrylamide, 12 wells, 20µl/well) from Bio-Rad were run on a Mini-PROTEAN 3 cell (Bio-Rad) under conditions specified by the manufacturer that corresponded essentially to the standard method as originally described (Laemmli, 1970). Transfer of the protein bands onto PVDF membrane (Millipore Immobilon PSQ) was done at room temperature in a standard CAPS buffer (10 mM CAPS, pH11, 10% v/v methanol) for 2h at 50V. Staining was done for 1 min in 0.1% Coomassie blue, 1% acetic acid and 40% methanol, and de-staining in 50% methanol until bands appeared clearly (5 to 10 mins). Amino acid sequence determination based on Edman degradation was done on an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492.

Amino acid sequence analysis

Sequence alignment illustrating the protease character of gifsy-2 gene product that included the capsid protein was generated using ClustalW (Thompson et al., 1994) as available from the EMBL-EBI website http://www.ebi.ac.uk/clustalw. Assignment of the C-terminal major capsid protein function to the same gene product from the N-terminal sequencing result and sequence similarities were done using the program BLAST (Altschul et al., 1997) at the NIH-NCBI website http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

Docking of atomic subunits in gifsy-2 density maps

The pseudo-atomic model of the HK97 procapsid (Conway et al., 2001) and atomic models of the HK97 mature capsid (Helgstrand et al., 2003; Wikoff et al., 2000) and the λ gpD trimer

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

(Yang et al., 2000) were obtained from the PDB (http://www.rcsb.org/pdb/) with ID's of 1IF0, 1OHG and 1C5E respectively. Initially the atomic models were manually fit into gifsy-2 density maps using O (Jones et al., 1991). All subsequent docking procedures were carried out using the SITUS package (Wriggers and Birmanns, 2001) and particularly the CoLoRes module for rigid-body docking (Chacon and Wriggers, 2002). Electron density maps were first truncated to the zone of interest. Visualization of the docking results were done with the VMD package (Humphrey et al., 1996) available at http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Jean Lepault for proposing and encouraging this project, and to Drs R.W. Hendrix, R.L Duda and Dr A.C. Steven for helpful discussions and advice, and together with Dr. R.H. Wade for support. We are grateful to J. P. Andrieu for aid with N-terminal sequencing and to Drs D.M. Belnap, B. Heymann, and T.S. Baker kindly aided with 3D analysis software. Dr. R.H. Ruigrok provided access to his JEOL 1200EX microscope, and expert technical assistance in cryoEM by Drs. E. Neumann and E.A. Hewat, and in computational support by Dr. F. Metoz is gratefully recognized. The cryoEM reconstruction of phage λ was provided by Drs. A.C. Steven and N. Cheng. Support is acknowledged by JFC from the CNRS in the form of an ATIP grant.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.

Bamford, D.H., Burnett, R.M. and Stuart, D.I. (2002) Evolution of viral structure. *Theor Popul Biol*, **61**, 461-470.

Cerritelli, M.E., Conway, J.F., Cheng, N., Trus, B.L. and Steven, A.C. (2003) Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment. *Adv Protein Chem*, **64**, 301-323.

Chacon, P. and Wriggers, W. (2002) Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *J Mol Biol*, **317**, 375-384.

Cheng, N., Conway, J.F., Watts, N.R., Hainfeld, J.F., Joshi, V., Powell, R.D., Stahl, S.J., Wingfield, P.E. and Steven, A.C. (1999) Tetrairidium, a four-atom cluster, is readily visible as a density label in three-dimensional cryo-EM maps of proteins at 10-25 A resolution. *J Struct Biol*, **127**, 169-176.

Conway, J.F., Duda, R.L., Cheng, N., Hendrix, R.W. and Steven, A.C. (1995) Proteolytic and conformational control of virus capsid maturation: the bacteriophage HK97 system. *J Mol Biol*, **253**, 86-99.

Conway, J.F. and Steven, A.C. (1999) Methods for reconstructing density maps of "single" particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. *J Struct Biol*, **128**, 106-118.

Conway, J.F., Wikoff, W.R., Cheng, N., Duda, R.L., Hendrix, R.W., Johnson, J.E. and Steven, A.C. (2001) Virus maturation involving large subunit rotations and local refolding. *Science*, **292**, 744-748.

Davis, B.M., Lawson, E.H., Sandkvist, M., Ali, A., Sozhamannan, S. and Waldor, M.K. (2000) Convergence of the secretory pathways for cholera toxin and the filamentous phage, CTXphi. *Science*, **288**, 333-335.

Davis, B.M. and Waldor, M.K. (2003) Filamentous phages linked to virulence of Vibrio cholerae. *Curr Opin Microbiol*, **6**, 35-42.

Dokland, T. and Murialdo, H. (1993) Structural transitions during maturation of bacteriophage lambda capsids. *J Mol Biol*, **233**, 682-694.

Duda, R.L., Hempel, J., Michel, H., Shabanowitz, J., Hunt, D. and Hendrix, R.W. (1995a) Structural transitions during bacteriophage HK97 head assembly. *J Mol Biol*, **247**, 618-635.

Duda, R.L., Hendrix, R.W. and Conway, J.F. (2005) The capsids of bacteriophage SPO1 and herpesviruses have a similar architecture. *Manuscript in submission*.

Duda, R.L., Martincic, K. and Hendrix, R.W. (1995b) Genetic basis of bacteriophage HK97 prohead assembly. *J Mol Biol*, **247**, 636-647.

Duda, R.L., Martincic, K., Xie, Z. and Hendrix, R.W. (1995c) Bacteriophage HK97 head assembly. *FEMS Microbiol Rev*, **17**, 41-46.

Effantin, G., Boulanger, P., Neumann, E., Letellier, L. and Conway, J.F. (2005) Bacteriophage T5 structure reveals similarities with HK97 & T4 suggesting evolutionary relationships. *Manuscript in submission*.

Figueroa-Bossi, N. and Bossi, L. (1999) Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. *Mol Microbiol*, **33**, 167-176.

Figueroa-Bossi, N., Coissac, E., Netter, P. and Bossi, L. (1997) Unsuspected prophage-like elements in Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol*, **25**, 161-173.

Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D. and Bossi, L. (2001) Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in Salmonella. *Mol Microbiol*, **39**, 260-271.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Fokine, A., Chipman, P.R., Leiman, P.G., Mesyanzhinov, V.V., Rao, V.B. and Rossmann, M.G. (2004) Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6003-6008.

Fokine, A., Leiman, P.G., Shneider, M.M., Ahvazi, B., Boeshans, K.M., Steven, A.C., Black, L.W., Mesyanzhinov, V.V. and Rossmann, M.G. (2005) Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7163-7168.

Helgstrand, C., Wikoff, W.R., Duda, R.L., Hendrix, R.W., Johnson, J.E. and Liljas, L. (2003) The refined structure of a protein catenane: the HK97 bacteriophage capsid at 3.44 A resolution. *J Mol Biol*, **334**, 885-899.

Hendrix, R.W. (2002) Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol*, **61**, 471-480.

Hendrix, R.W. and Casjens, S.R. (1975) Assembly of bacteriophage lambda heads: protein processing and its genetic control in petit lambda assembly. *J Mol Biol*, **91**, 187-199.

Hendrix, R.W. and Duda, R.L. (1998) Bacteriophage HK97 head assembly: a protein ballet. *Adv Virus Res*, **50**, 235-288.

Hohn, B. (1975) DNA as substrate for packaging into bacteriophage lambda, in vitro. *J Mol Biol*, **98**, 93-106.

Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, **14**, 33-38, 27-38.

Imber, R., Tsugita, A., Wurtz, M. and Hohn, T. (1980) Outer surface protein of bacteriophage lambda. *J Mol Biol*, **139**, 277-295.

Iwasaki, K., Trus, B.L., Wingfield, P.T., Cheng, N., Campusano, G., Rao, V.B. and Steven, A.C. (2000) Molecular architecture of bacteriophage T4 capsid: vertex structure and bimodal binding of the stabilizing accessory protein, Soc. *Virology*, **271**, 321-333.

Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M.L., Prevelige, P.E., Jr. and Chiu, W. (2003) Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat Struct Biol*, **10**, 131-135.

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47 (Pt 2)**, 110-119.

Khayat, R., Tang, L., Young, M.J. and Johnson, J.E. (2005) Structure of an archaeal virus capsid protein reveals an evolutionary relationship to eucaryotic and bacterial viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, accepted in principal, under revision.

Kindt, J., Tzlil, S., Ben-Shaul, A. and Gelbart, W.M. (2001) DNA packaging and ejection forces in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13671-13674.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lata, R., Conway, J.F., Cheng, N., Duda, R.L., Hendrix, R.W., Wikoff, W.R., Johnson, J.E., Tsuruta, H. and Steven, A.C. (2000) Maturation dynamics of a viral capsid: visualization of transitional intermediate states. *Cell*, **100**, 253-263.

Morais, M.C., Choi, K.H., Koti, J.S., Chipman, P.R., Anderson, D.L. and Rossmann, M.G. (2005) Conservation of the capsid structure in tailed dsDNA bacteriophages: the pseudoatomic structure of phi29. *Mol Cell*, **18**, 149-159.

Morgan, G.J., Hatfull, G.F., Casjens, S. and Hendrix, R.W. (2002) Bacteriophage Mu genome sequence: analysis and comparison with Mu-like prophages in Haemophilus, Neisseria and Deinococcus. *J Mol Biol*, **317**, 337-359.

Murialdo, H. and Ray, P.N. (1975) Model for arrangement of minor structural proteins in head of bacteriophage lambda. *Nature*, **257**, 815-817.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Olson, N.H., Gingery, M., Eiserling, F.A. and Baker, T.S. (2001) The structure of isometric capsids of bacteriophage T4. *Virology*, **279**, 385-391.

Rice, G., Tang, L., Stedman, K., Roberto, F., Spuhler, J., Gillitzer, E., Johnson, J.E., Douglas, T. and Young, M. (2004) The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7716-7720.

Saxton, W.O. and Baumeister, W. (1982) The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *J.Microsc.*, **127**, 127-138.

Sternberg, N. and Weisberg, R. (1977) Packaging of coliphage lambda DNA. II. The role of the gene D protein. *J Mol Biol*, **117**, 733-759.

Steven, A.C., Heymann, J.B., Cheng, N., Trus, B.L. and Conway, J.F. (2005) Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 227-236.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.

Thomson, N., Baker, S., Pickard, D., Fookes, M., Anjum, M., Hamlin, N., Wain, J., House, D., Bhutta, Z., Chan, K., Falkow, S., Parkhill, J., Woodward, M., Ivens, A. and Dougan, G. (2004) The role of prophage-like elements in the diversity of Salmonella enterica serovars. *J Mol Biol*, **339**, 279-300.

Thuman-Commike, P.A., Greene, B., Jakana, J., Prasad, B.V., King, J., Prevelige, P.E., Jr. and Chiu, W. (1996) Three-dimensional structure of scaffolding-containing phage p22 procapsids by electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, **260**, 85-98.

Thuman-Commike, P.A., Greene, B., Malinski, J.A., Burbea, M., McGough, A., Chiu, W. and Prevelige, P.E., Jr. (1999a) Mechanism of scaffolding-directed virus assembly suggested by comparison of scaffolding-containing and scaffolding-lacking P22 procapsids. *Biophys J*, **76**, 3267-3277.

Thuman-Commike, P.A., Greene, B., Malinski, J.A., King, J. and Chiu, W. (1998) Role of the scaffolding protein in P22 procapsid size determination suggested by T = 4 and T = 7 procapsid structures. *Biophys J*, **74**, 559-568.

Thuman-Commike, P.A., Tsuruta, H., Greene, B., Prevelige, P.E., Jr., King, J. and Chiu, W. (1999b) Solution x-ray scattering-based estimation of electron cryomicroscopy imaging parameters for reconstruction of virus particles. *Biophys J*, **76**, 2249-2261.

Wikoff, W.R., Liljas, L., Duda, R.L., Tsuruta, H., Hendrix, R.W. and Johnson, J.E. (2000) Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid. *Science*, **289**, 2129-2133.

Wriggers, W. and Birmanns, S. (2001) Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data. *J Struct Biol*, **133**, 193-202.

Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L. and Treiber, G. (1970) Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, **40**, 734-744.

Yang, F., Forrer, P., Dauter, Z., Conway, J.F., Cheng, N., Cerritelli, M.E., Steven, A.C., Pluckthun, A. and Wlodawer, A. (2000) Novel fold and capsid-binding properties of the lambda-phage display platform protein gpD. *Nat Struct Biol*, **7**, 230-237.

Zhang, Z., Greene, B., Thuman-Commike, P.A., Jakana, J., Prevelige, P.E., Jr., King, J. and Chiu, W. (2000) Visualization of the maturation transition in bacteriophage P22 by electron cryomicroscopy. *J Mol Biol*, **297**, 615-626.

Table 1. Details of reconstructions

	Count of focal pairs	Count of particles extracted	Count of particles used	Estimated Resolution (Å)
Procapsids	51	12303	6200	11.8
Expanded procapsids	49	5266	3281	15.3
Empty mature capsids	49	2706	1090	16.7

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Figure Captions

Figure 1. Generalized capsid assembly pathway, adapted from (Steven et al., 2005). The procapsid assembles around a nucleating connector located at an icosahedral vertex, and may employ a scaffold protein, or in the case of phage HK97 a scaffold domain that is the N-terminal part of the major capsid protein. The scaffold is subsequently removed and, together with the N-terminal of the major capsid protein, may be proteolysed. DNA packaging triggers expansion that significantly transforms the capsid and allows any stabilization mechanisms to proceed, such as binding of any accessory molecules or crosslinking between capsid protein subunits.

Figure 2. (a) Structural gene organization for phages P22, λ and HK97, and those known or inferred for gifsy-2. Coding regions are mutually scaled – the HK97 gp3 codes for 424 amino acids. (b) ClustalW sequence alignment of the protease function of phages PSA (CAC85560), Gifsy-2 (NP_460008), D3 (AAD38956) and subunit A of the E. Coli Clp protease (X-ray model: PDB ID 1TYFA). Location of the ClpP catalytic triad and residues aligned with them are boxed.

Figure 3. Induced and purified phage particles imaged by cryoEM as (a) a freshly prepared sample; (b) after two weeks storage at 4°C, and (c) one month later. Some expanded particles in (b) appear to have ruptured, and examples of darker particles are marked in (c) including a procapsid (asterisk) and mature capsid (arrow). Particles representative of various classes include (d) dark procapsid, possibly before proteolysis; (e) procapsid after proteolysis, for which the connector appears to be visible (arrowhead); (f) expanded procapsid; and (g) mature empty capsid with additional density indicated (arrow). Bars = 250Å.

Figure 4. Reconstructions from cryoEM data viewed along an icosahedral 2-fold axis: top row – exterior view; bottom row – inside view. (a) Gifsy-2 procapsid (orange). (b) Expanded procapsid (green). (c) Mature empty capsid (blue). Inset is a diagram of the capsomer positions corresponding to a lattice with T=7*laevo* geometry. Bar = 100Å.

Figure 5. Comparison of central sections: (a) Gifsy-2 procapsid (left) and HK97 prohead II at 12Å (right) (Conway et al., 2001). (b) Gifsy-2 expanded procapsid (left) and HK97 atomic model of the mature capsid rendered at 15Å (right). (c) Gifsy-2 mature empty capsid (left) and λ mature capsid at 17Å (right) (Yang et al., 2000). Positions of symmetry axes are indicated in (a) and decoration density in gifsy-2 and the corresponding gpD density in λ are indicated by arrowheads in (c). Bar = 100Å.

Figure 6. Selected sections through the density maps of (a) the expanded procapsid, (b) mature empty capsid and (c) the difference map between them, perpendicular to the icosahedral 3-fold axis. The blue, red and green colors represent the density of the 3 hexamers of the major capsid protein adjacent to this axis. Density identified as the decoration molecule, according to the difference map, is colored yellow. (d) Below are corresponding sections from the mature capsid of phage λ (Yang et al., 2000) where the hexamer (gpE) and decoration (gpD) densities are similarly colored. Note the slight rotation of the gpD trimer and its less extensive "footprint" compared to that for gifsy-2. Bar = 100Å.

Figure 7. An icosahedral facet of the rendered surfaces of the expanded procapsid (a) and mature empty capsid (b) viewed along an icosahedral 3-fold axis. Hexamers of the major capsid protein are colored in blue, green and red, pentamers in grey, and the decoration molecules in yellow. The dashed lines in (a) represent the approximate position of the binding "footprint" of one decoration molecule on the surface. Schematic representations of the major capsid subunit locations are given in (c) and (d), corresponding to panels (a) and (b) respectively, and using the A-G numbering for HK97 (Conway et al., 2001). The yellow regions indicate the binding footprints of the decoration molecules, which appear to extend

between adjacent copies of the major capsid protein from different hexamers towards a third copy.

Figure 8. Docking of atomic models into the gifsy-2 density maps (blue mesh) with unoccupied regions of the cryoEM density map indicated with ovals. Views of the mature HK97 capsid protein hexamer (PDB: 1OHG) docked into the gifsy-2 empty mature capsid from the top (a), and side (b). The four different domains of the HK97 gp5 subunit are indicated in (a). Docking of the pseudo-atomic model of HK97 procapsid (PDB: 1IF0) into the gifsy-2 cryoEM density is shown as a top-view (c) and side view (d) where the HK97 gp5 E-loop protruding from the cryoEM envelope is indicated. Fit of the phage λ gpD decoration molecule (PDB: 1C5E; colored grey) into the mature empty capsid is shown from the top (e) and side (f), which also includes the HK97 gp5 models for hexamers. At the 3-fold axis, the N-terminal arms (red and green) of the gp5 models clash, and density at the base of the gifsy-2 decoration are not fit by the truncated gpD molecule, as indicated with arrows.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

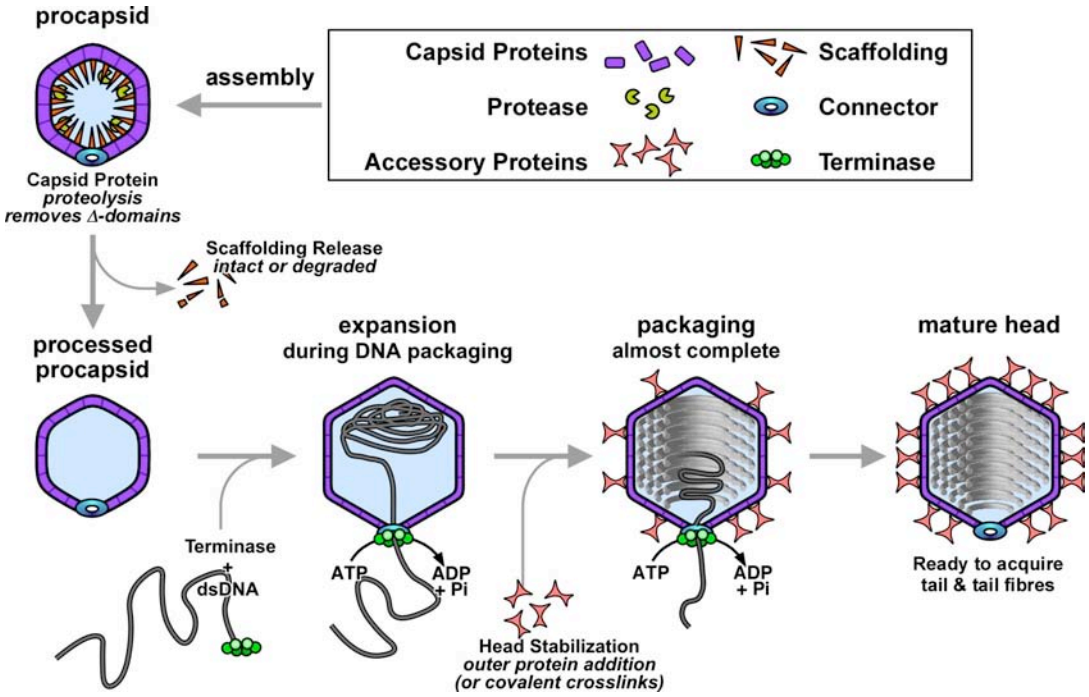


Figure 1. Effantin *et al*, Maturation pathway of gifsy-2.

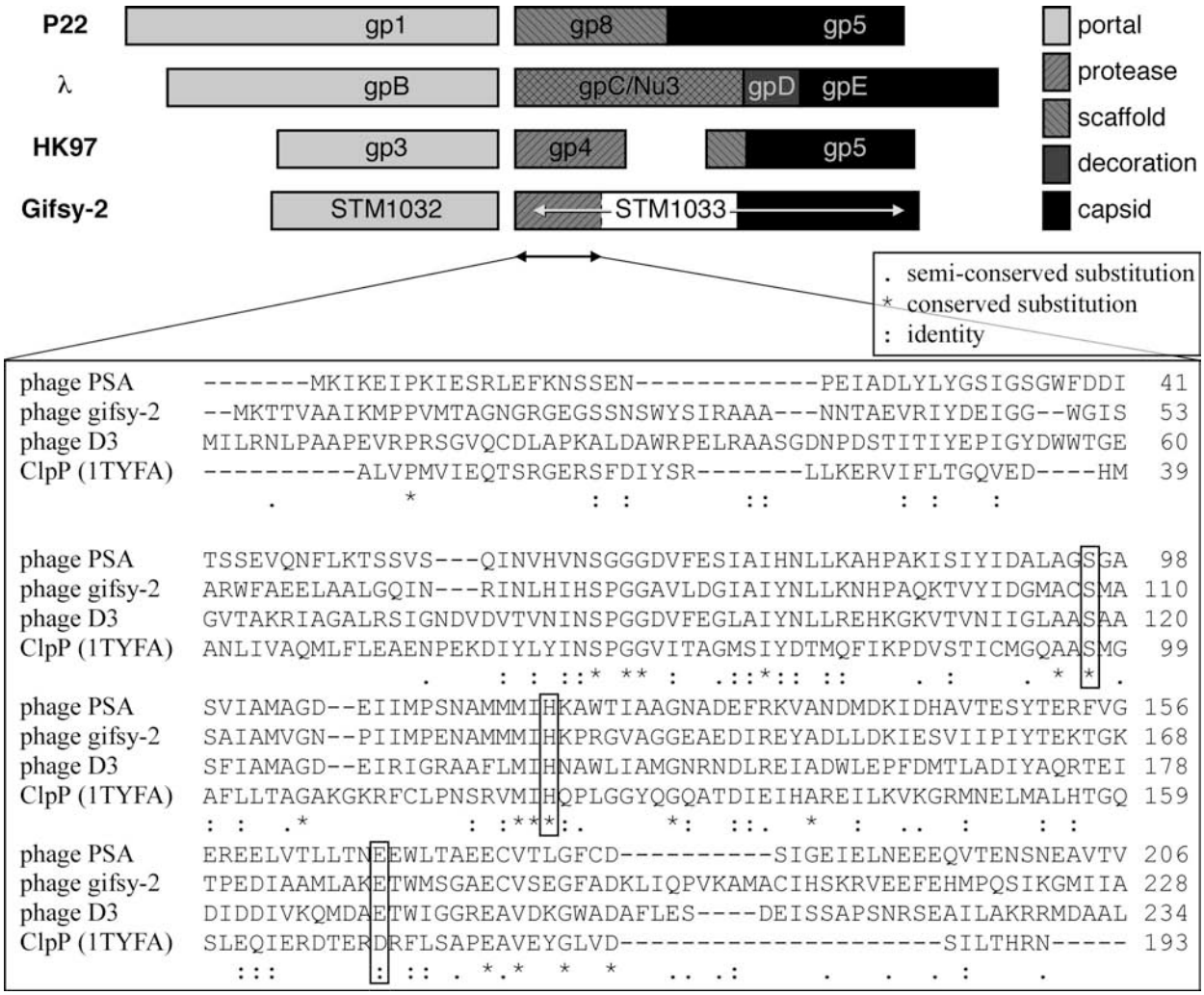


Figure 2. Effantin *et al*, Maturation pathway of gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

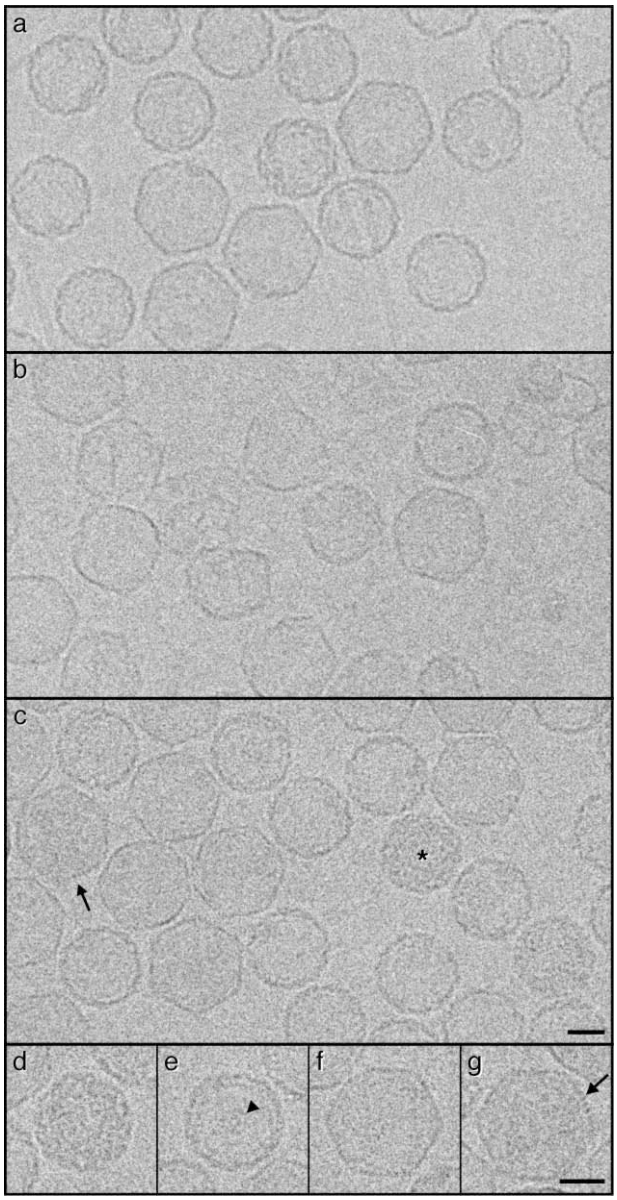


Figure 3. Effantin *et al*, Maturation pathway of gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

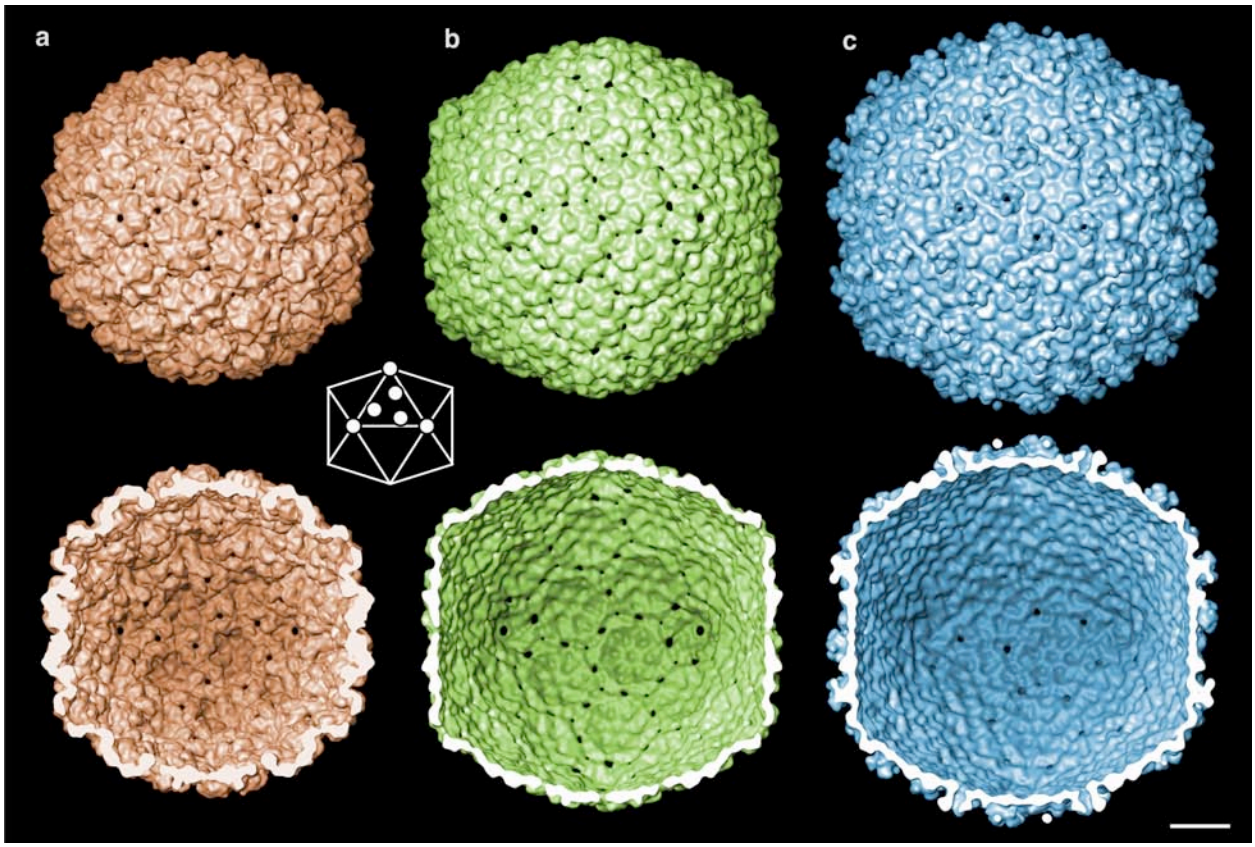


Figure 4. Effantin *et al*, Maturation pathway of gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

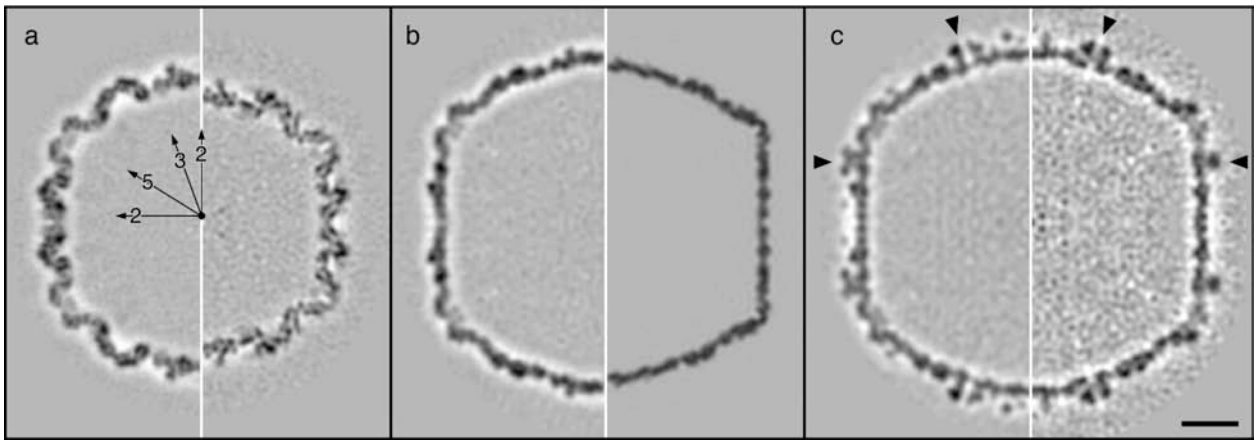


Figure 5. Effantin *et al*, Maturation pathway of gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

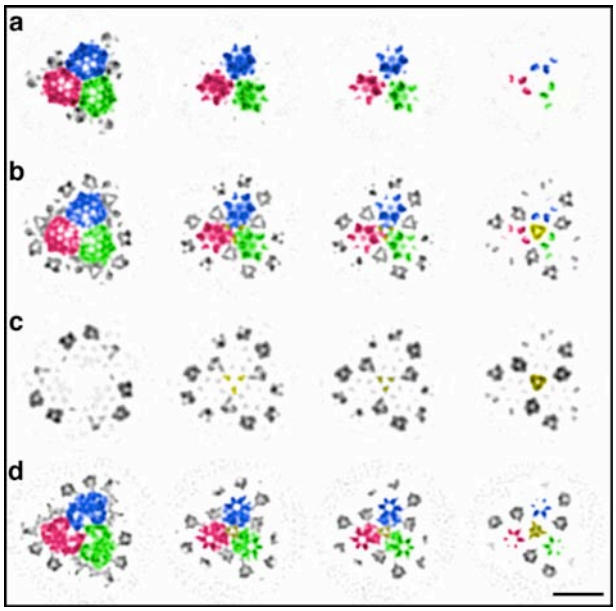


Figure 6. Effantin *et al*, Maturation pathway of gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

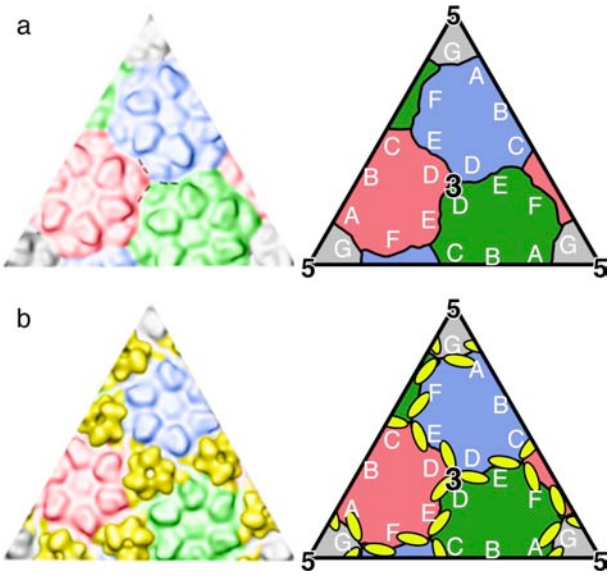


Figure 7. Effantin *et al*, Maturation pathway of gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

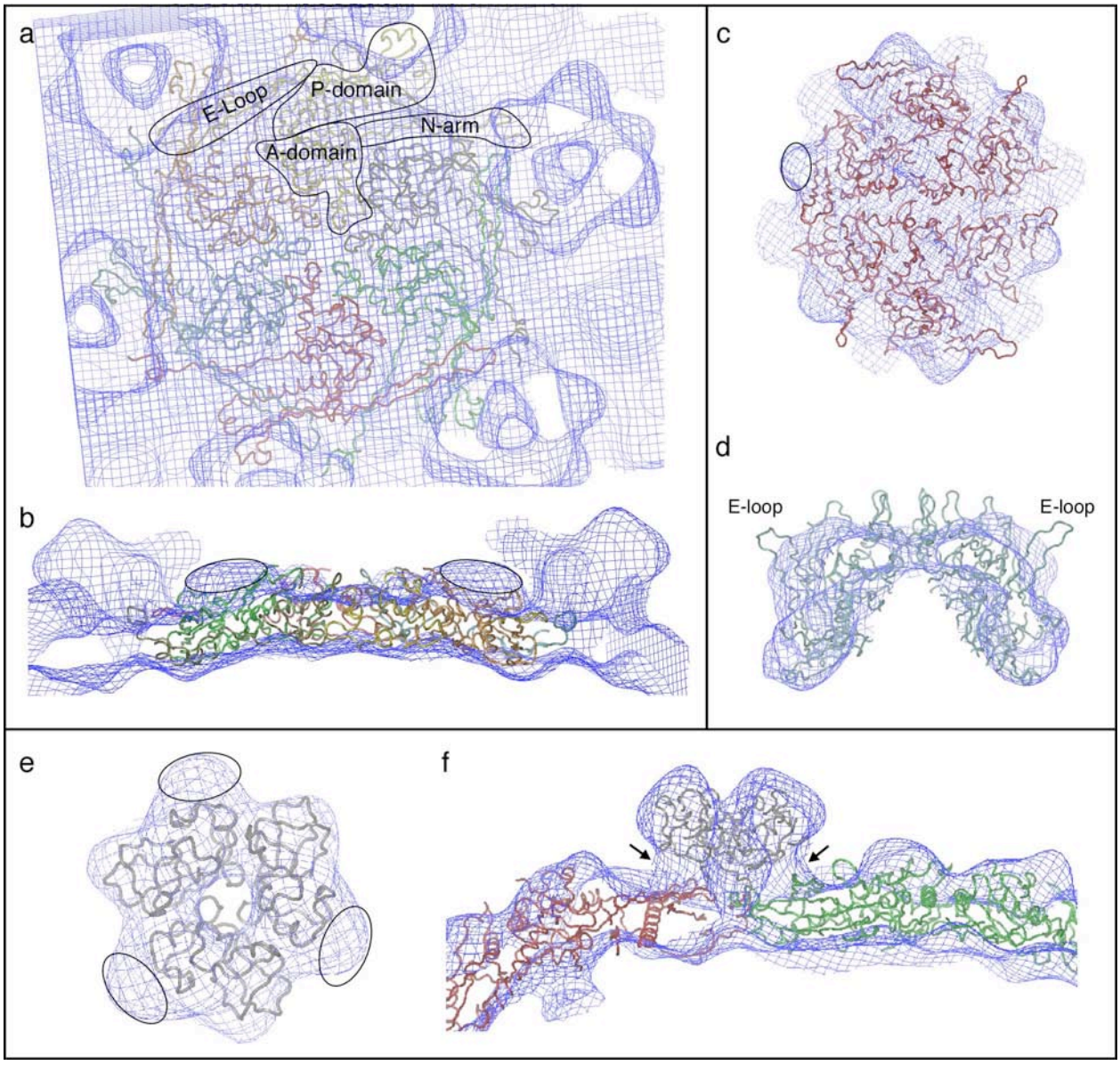
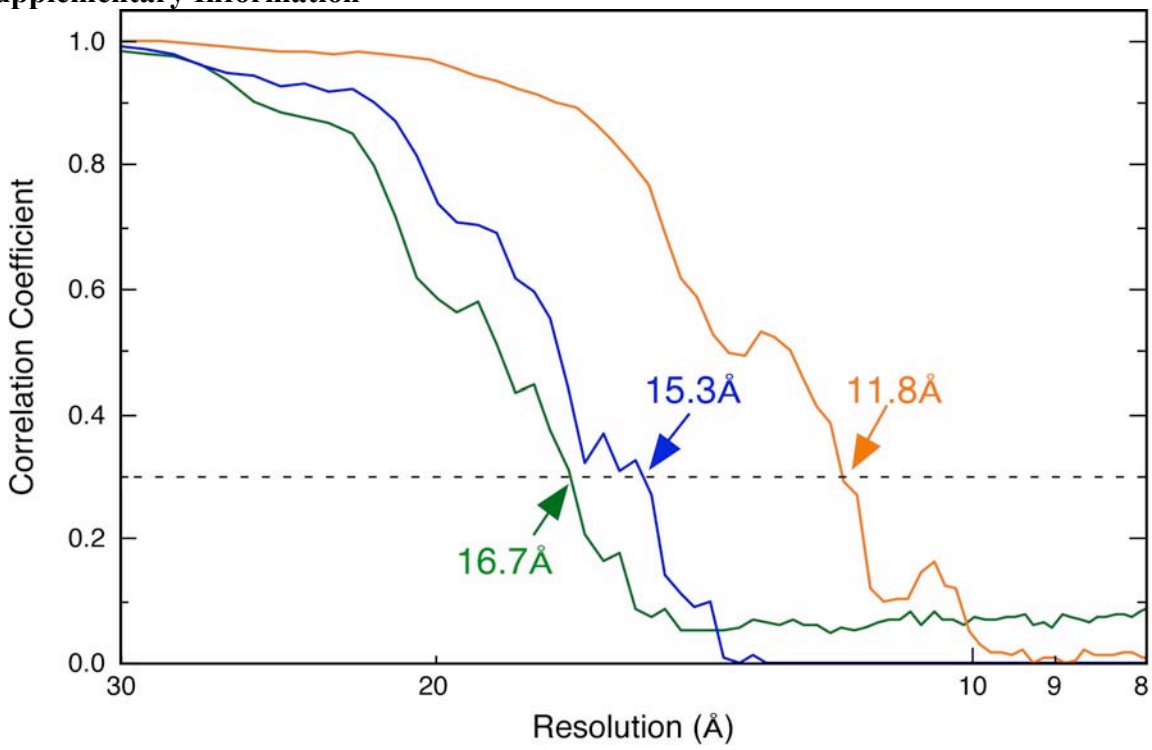


Figure 8. Effantin *et al*, Maturation pathway of gifsy-2.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Supplementary Information



Caption to Supplementary Figure 1. Resolution curves for the three reconstructions with limits evaluated at the Fourier Shell Correlation criteria of 0.3 (dashed line). Color-coding matches Figure 4: procapsid in orange; expanded procapsid in green; mature empty capsid in blue.

tel-00011108, version 1 - 24 Nov 2005

Résumé

Gifsy-2 est un bactériophage tempéré infectant différentes souches de bactéries du genre *Salmonella Typhimurium*. D'une manière similaire au coliphage Lambda, Gifsy-2 possède une capside à symétrie icosaédrique, contenant un génome de 45500 paires de base sous la forme d'un double brin d'ADN linéaire, à laquelle est attachée une longue queue flexible et non contractile. D'une façon identique aux phages à queue connus, la capside de Gifsy-2 s'assemble tout d'abord sous la forme d'un précurseur rond d'un diamètre de 575 Å appelé procapside qui, par la suite, est converti après maturation, en une forme de capside plus angulaire, d'un diamètre de 650 Å et contenant le génome viral. Ces 2 états ont été visualisés en cryo-microscopie électronique et des reconstructions tridimensionnelles ont été calculées à 12 Å de résolution pour la procapside et à 17 Å pour la capside mature vide de son ADN. La géométrie de ces 2 capsides est décrite par un nombre de triangulation T = 7 et leur surface est constituée par un ensemble de pentamères et d'hexamères de la protéine de capside majeure. Des protubérances apparaissent à chaque axe de symétrie local d'ordre 3 sur la surface extérieure de la capside mature vide, d'une manière similaire aux trimères formés par la protéine gpD du phage Lambda. Nous avons aussi obtenu une structure à 15 Å d'une capside mature où ces protubérances ne sont plus visibles confirmant que celles-ci correspondent bien à des trimères d'une seconde protéine de capside participant à la stabilisation de la capside mature. Par séquençage N-terminal, nous avons localisé la protéine de capside majeure (32 kDa) en partie C-terminale d'un large gène codant pour une protéine de 75 kDa et dont la partie N-terminale contient un motif relatif aux protéases de la famille Clp. Une possibilité est que cette région de 75 kDa code à la fois pour la protéase, la protéine d'échafaudage et les protéines de capside majeure et mineure étant donné que les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'assemblage des capsides de phages sont généralement adjacents et dans le même ordre. Ce nouvel agencement en un seul gène serait alors une preuve supplémentaire des diverses stratégies employées par les phages pour modifier leur cycle de vie.

Le bactériophage T5 possède plusieurs caractéristiques inhabituelles pour un phage. Son génome de 121750 paires de base contient des interruptions sur l'un de ces brins et de nombreuses redondances en partie terminale. Aussi, l'injection de son ADN de la capside vers la bactérie infectée se fait par un transfert en deux étapes distinctes. La capside mature du phage T5 est plus grande et sa queue plus longue que ce qui est généralement observé chez les phages de la même famille tels lambda, HK97 et Gifsy-2. La structure de la capside de T5 ainsi que celle de sa queue ont été déterminées par cryo-microscopie électronique et coloration négative. Le tube de la queue de T5 dont l'une des extrémités est en contact avec la capside, est composé par la superposition de 40 trimères de la protéine pb6 s'arrangeant à la fois suivant une symétrie hélicoïdale et d'ordre 3. Dans sa partie distale, un anneau plus large joint le tube à la pointe et sert aussi probablement de site d'attachement aux 3 longues fibres en forme de L responsable de l'attachement réversible de T5 à la surface des bactéries. La capside de T5 est icosaédrique et sa surface plane est décrite par une géométrie quasi-équivalente de sa protéine de capside majeure pb8 s'arrangeant en pentamères et en hexamères suivant un nombre de triangulation T = 13. Sa surface extérieure est décorée par une seconde protéine dispensable s'attachant au centre de chaque hexamère et identifiée comme étant un monomère de la protéine pb10 similaire à la protéine hoc du phage T4. L'ADN empaqueté dans la capside apparaît arrangé en une succession de couches concentriques distantes de 24.4 Å d'une manière consistante avec le modèle en bobine déterminé pour le phage T7. Une analyse comparative des séquences primaires des protéines de capside majeure pb8 de T5 et gp5 d'HK97 révèlent des similarités incluant une longueur mature d'environ 290 résidus et un domaine N-terminal clivé durant la maturation de leur capside et prédit pour adopter une conformation en super hélice. Aucune protéine d'échafaudage n'apparaît dans le génome de T5 et par analogie avec HK97, nous proposons que cette fonction soit tenue par ce domaine N-terminal. La modélisation du modèle atomique des pentamères et hexamères d'HK97 dans la capside de T5 montre que le repliement 3D de leur protéine de capside majeure est proche et supporte encore plus la conclusion que la capside de T5 est similaire à celle d'HK97, leur différence de taille s'expliquant par l'addition d'hexamères supplémentaires sous le contrôle de la partie N-terminale de sa protéine de capside.