

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présenté à l'Université de Lille I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Bernadette HENNACHE

**ETUDE BIOCHIMIQUE
DU RECEPTEUR CELLULAIRE
DE L'ADENOVIRUS**



Membres du Jury: J. MONTREUIL, Président
P. BOULANGER, Rapporteur
J. KREMBEL
A. VERBERT
G. MARTIN

PRÉSENTÉ LE 24 JUIN 1977

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Recherches
de Virologie n° 102 de l' I.N.S.E.R.M. (Directeur : Professeur
Jean SAMAILLE) sous la direction de Monsieur le Professeur
Pierre BOULANGER que je remercie tout particulièrement de
m'avoir guidée.

INTRODUCTION

1

HISTORIQUE

4

A - <u>Classification des adénovirus</u>	5
B - <u>Structure de l'adénovirus</u>	6
1°) Données morphologiques	6
a) La capsid externe	6
b) Le nucléofde central	7
2°) Données immunologiques	7
3°) Données biochimiques	7
C - <u>Processus d'infection de cellules permissives par l'adénovirus</u> ...	11
1°) Adsorption de l'adénovirus sur la cellule hôte	11
a) Concept de récepteur cellulaire	11
b) Inhibition de l'adsorption - réversible	13
- irréversible	13
c) Augmentation du taux d'adsorption	14
d) Facteurs affectant le pourcentage d'adsorption	15
e) Mécanisme de l'adsorption	16
2°) Pénétration du virus à l'intérieur de la cellule	16
a) Rôle de la température	17
b) Expérimentation	17
c) Processus de pénétration	18
3°) Décapsidation du génome viral	19
a) Localisation du processus	19
b) Processus	20
c) Participation du métabolisme cellulaire	21
d) Action de différents facteurs sur la décapsidation	21
4°) Entrée de la nucléoprotéine dans le noyau de la cellule	22

ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE OU IMMUNOADSORBANT
D'UNE GLYCOPROTEINE DE MEMBRANE DE CELLULES KB, RECEPTEUR DE
L'ADENOVIRUS TYPE 2.

<u>INTRODUCTION</u>	27
1°) Principe de la chromatographie d'affinité	27
2°) Application à l'isolement d'un récepteur viral cellulaire ...	28
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	29
I - <u>UTILISATION DU SEPHAROSE 4 B</u>	29
A - <u>Préparation du gel</u>	29
1°) Structure du Sepharose	29
2°) Réticulation et activation du Sepharose 4 B par le bromure de cyanogène	30
3°) Fixation du bras sur le Sepharose activé	31
a) Intérêt d'un bras	31
b) Préparation de l'amino-Sepharose	32
c) Test coloré au sodium 2, 4, 6 trinitro benzène sulfonate	32
4°) Couplage du ligand sur l'amino-Sepharose	33
a) Problèmes posés par la fibre	33
- pontages inter-fibres	33
- blocage des groupements aminés de la fibre	33
b) Citraconylation de l'antigène fibre	33
c) Couplage de la fibre citraconylée sur l'amino- Sepharose	34
d) Réaction de décitraconylation	35

B - <u>Contrôle de l'efficacité du gel d'affinité</u>	37
1°) Passage sur le gel d'un immunosérum anti-fibre	37
2°) Test d'immunoprécipitation en présence de fibre	37
C - <u>Isolement d'un récepteur protéique de membrane</u>	38
1°) Extraction des protéines de membrane	38
2°) Chromatographie d'affinité	38
D - <u>Tests d'activité de la protéine isolée</u>	39
1°) Réaction d'immunoprécipitation de l'antigène fibre	39
2°) Cinétique d'adsorption virale sur les cellules KB	40
3°) Analyse en gel de polyacrylamide dissociant	40
II - <u>ESSAIS SUR LE BIOGEL DE POLYACRYLAMIDE P₃₀₀</u>	41
A - <u>Modèle chromatographique</u>	41
B - <u>Préparation du gel</u>	41
1°) Structure du Biogel de polyacrylamide	41
2°) Activation du Biogel de polyacrylamide par le glutaraldéhyde	42
3°) Fixation des immunoglobulines anti-base du penton ..	43
a) Préparation des immunoglobulines	43
b) Fixation des immunoglobulines anti-base du penton sur le Biogel P ₃₀₀ activé	43
c) Blocage à la lysine des groupements aldéhydiques libres	44
4°) Couplage du penton sur les immunoglobulines anti- base du penton	44
5°) Fixation-Pontage du Biogel-immunoglobulines anti-base du penton-penton	46

C - <u>Contrôle de l'efficacité de l'immunoabsorbant</u>	46
1°) Immunoabsorption sur le gel d'un immunosérum anti-fibre .	46
2°) Test d'immunoprécipitation en présence de fibre	47
D - <u>Isolement d'une protéine de membrane</u>	47
1°) Extraction des protéines de membrane de cellules KB ...	47
2°) Immunoabsorption sur le gel d'un extrait de protéines de membrane	48
E - <u>Tests d'activité du récepteur isolé</u>	48
1°) Adsorption virale sur les cellules KB	48
a) En fonction de la quantité de récepteur	48
b) En fonction du temps d'adsorption sur les cellules ..	49
c) Après action d'un enzyme protéolytique sur le récepteur	50
2°) Adsorption virale sur les hématies de rat	51
3°) Etude du récepteur par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	52
<u>RESULTATS</u>	54
I - <u>CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR SEPHAROSE 4 B - FIBRE</u> <u>D'ADENOVIRUS</u>	54
A - <u>Contrôle de l'efficacité du gel</u>	54
1°) Adsorption sur le gel d'un immunosérum anti-fibre	54
2°) Test d'immunoprécipitation	54
B - <u>Extraction des protéines de membrane par le désoxycholate</u> <u>de sodium</u>	55

C - <u>Chromatographie d'affinité</u>	56
D - <u>Tests d'activité de la protéine isolée</u>	58
1°) Réaction d'immunoprécipitation en présence d'antigène fibre	58
2°) Cinétique d'adsorption virale sur les cellules KB	59
3°) Analyse en gel de polyacrylamide dissociant	61
II - <u>ISOLEMENT SUR LE BIOGEL DE POLYACRYLAMIDE P₃₀₀</u> <u>IMMUNOADSORBANT</u>	61
A - <u>Témoin d'adsorption sur le gel d'un immunsérum anti-fibre</u> .	61
1°) Adsorption sur le gel d'un immunsérum anti-fibre	62
2°) Tests d'immunoprécipitation	62
B - <u>Asorption sur le gel d'un extrait de protéines de membrane</u> ..	63
1°) Extraction des protéines de membrane	63
2°) Immunoadsorption sur le gel d'un extrait de protéines de membrane	63
C - <u>Tests d'activité sur le récepteur</u>	64
1°) Adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB	64
a) En fonction de la quantité de récepteur	64
b) Cinétique d'adsorption sur les cellules	66
c) Nature protéique du récepteur : Adsorption virale après action de protéase sur le récepteur	68
2°) Adsorption de l'adénovirus sur les hématies de rat ...	70
3°) Analyse sur gel de polyacrylamide dissociant	70
<u>DISCUSSION</u>	73

II ème PARTIE

IDENTIFICATION ET ISOLEMENT DU SITE RECEPTEUR D'ADENOVIRUS
PAR ATTACHEMENT COVALENT DES VIRIONS A LA MEMBRANE CELLULAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	79
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	80
A - <u>Préparation du complexe virus-récepteur membranaire</u>	80
1°) Marquage des cellules	80
2°) Saturation des sites récepteurs par des particules virales	80
3°) Amidination des protéines virales et cellulaires	80
4°) Formation des ponts disulfure	81
5°) Extraction du complexe adénovirus-récepteur membranaire	81
B - <u>Isolement du complexe virus-récepteur sur gradient de sucrose</u>	81
C - <u>Analyse sur gel de polyacrylamide dissociant</u>	82
<u>RESULTATS</u>	83
A - <u>Extraction du complexe virus-récepteur membranaire</u>	83
B - <u>Isolement du complexe en gradient de sucrose</u>	83
C - <u>Analyse du complexe sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant</u>	85
<u>DISCUSSION</u>	87

<u>DISCUSSION</u>	87
<u>CONCLUSION</u>	93
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	95
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	106

INTRODUCTION

Le processus d'infection des cellules KB par l'adénovirus commence par l'adsorption des virions sur des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique de la cellule hôte ; la particule virale étant liée aux récepteurs cellulaires par l'intermédiaire de l'antigène fibre.

Dans le but de caractériser le récepteur des cellules KB pour l'adénovirus, nous avons utilisé trois méthodes d'approche différentes : les deux premières mettent à profit l'affinité des structures membranaires pour certaines structures externes du virus (chromatographie d'affinité et immuno-adsorption) ; la troisième voie d'approche consiste à ponter des particules d'adénovirus sur des cellules KB et à isoler les complexes membranes-virions.

Dans le premier système, des molécules de fibre sont fixées sur une matrice insoluble, le Sepharose 4 B par l'intermédiaire d'un bras diamminodipropylamine ; les groupements aminés de la fibre étant préalablement préservés par une réaction de citraconylation.

Dans la deuxième méthode, nous orientons la fibre vers l'extérieur, telle qu'elle est dans la particule virale, en fixant du penton sur des immunoglobulines antibase du penton liées à un polymère insoluble, le Biogel de polyacrylamide P₃₀₀.

Ces deux systèmes d'affinité permettent d'isoler, à partir d'un extrait de protéines de membrane de cellules KB, des protéines se liant spécifiquement à la fibre ou au penton et inhibant l'adsorption de l'adénovirus sur les cellules.

La dernière technique utilisée nous permet de fixer des particules virales sur des cellules KB intactes et de fixer le modèle obtenu (virus sur récepteur) en le liant de façon covalente à l'aide du méthyl 4-mercaptopbutyrimidate, agent d'amidation des groupements ϵ -NH₂ des radicaux latéraux des lysines des protéines. Une oxydation ultérieure permet la formation de ponts disulfure clivables en milieu réducteur.

L'analyse sur gel de polyacrylamide dissociant des protéines réceptrices de l'adénovirus, isolées selon les trois méthodes permet d'en comparer l'efficacité et la spécificité et d'élaborer un modèle quant à la structure et à la fonction du "récepteur" de l'adénovirus type 2 présent à la surface des cellules KB.

HISTORIQUE

Les adénovirus furent découverts en 1953 par ROWE, HUEBNER, GILMORE, PARROT et WARD (1) dans des cultures de tissu d'amygdale humaine. Ils sont responsables de certaines affections respiratoires humaines (pharyngites aiguës, bronchopneumopathies, fièvre pharyngo-conjonctivale), de conjonctivites (de type folliculaire, kérato-conjonctivite épidémique), de certaines affections digestives (adénite mésentérique aiguë) et de certaines infections inapparentes. Les virus peuvent persister très longtemps à l'état latent dans les amygdales, les végétations adénoïdes et les ganglions lymphatiques.

A - CLASSIFICATION DES ADENOVIRUS.

En 1962, TRENTIN et coll. (2) et HUEBNER et coll. (3) mettent en évidence le pouvoir oncogène de certains sérotypes d'adénovirus, c'est-à-dire la propriété d'induire des tumeurs chez des animaux, en l'occurrence le hamster nouveau-né.

32 sérotypes humains ont été isolés et classés par GREEN (4) suivant leur pouvoir oncogène :

- Les adénovirus du groupe A (sérotypes 12, 18, 31) sont hautement oncogènes. Ils peuvent induire des tumeurs chez les hamsters nouveau-nés deux mois après l'injection de virus purifié.

- Les adénovirus du groupe B (sérotypes 3, 7, 11, 14, 16, 21) sont faiblement oncogènes. Les tumeurs ne sont induites que 4 à 18 mois après l'infection.

- Les adénovirus du groupe C (sérotypes 1, 2, 5, 6) ne sont pas oncogènes. Mais, en 1967, FREEMAN et coll. (5) ont mis en évidence leur capacité à induire la transformation maligne de cellules embryonnaires de rat, "in vitro".

B - STRUCTURE DE L'ADENOVIRUS.

1°) Données morphologiques.

De poids moléculaire total de 175.10^6 daltons et de densité 1,345, les adénovirus sont constitués d'un nucléoïde central d'acide désoxyribonucléique entouré d'une capsidie protéique externe.

En 1959, par des études en microscopie électronique, HORNE (6) montre que la particule virale est dépourvue d'enveloppe, ce qui la rend résistante à l'éther, au chloroforme ou au désoxycholate de sodium et lui permet de supporter certaines variations de température et de pH.

a) La capsidie externe : La capsidie protéique externe a la forme d'un icosaèdre, polyèdre régulier de 720 Å de diamètre, comportant 20 faces égales qui sont des triangles équilatéraux unis par 30 arêtes et possédant 12 sommets.

L'icosaèdre a une symétrie 5, 3, 2 :

- Posé sur un sommet, l'icosaèdre a un contour pentagonal ; en le faisant tourner d' $1/5$ de tour la structure est identique. L'icosaèdre possède 6 axes de symétrie d'ordre 5 passant chacun par deux sommets opposés.

- Posé sur une face ou une arête, l'icosaèdre a un contour hexagonal. Il a 10 axes de symétrie d'ordre 3 passant par le centre de deux faces opposées et 15 axes de symétrie d'ordre 2 passant par le milieu de deux arêtes opposées.

La capsidie externe est constituée de 252 unités morphologiques, les capsomères, qui s'assemblent en respectant la symétrie 5/3/2, donc occupant sur l'icosaèdre des positions équivalentes :

- 240 "hexons", de forme hexagonale, situés sur les faces et les arêtes de l'icosaèdre.

- 12 "pentons", de forme pentagonale, situés à chaque sommet de la capsidie et prolongés par une spicule, de longueur variable suivant les sérotypes selon VALENTINE et PEREIRA (7) et désignée sous le nom de "fibre".

b) Le nucléoïde central : Des coupes ultrafines d'adénovirus révèlent un nucléoïde central opaque aux électrons, de 400 à 450 Å, sensible à la DNase et à la trypsine, donc constitué de DNA et de protéines.

Le DNA viral est linéaire et bicaténaire, son poids moléculaire est de $22 \cdot 10^6$ daltons, sa longueur de 12 μ . Il n'existe qu'une seule molécule de DNA par virion.

2°) Données immunologiques.

Les cellules eucaryotes infectées par les adénovirus produisent un excès de matériel viral, en particulier des antigènes solubles retrouvés dans le milieu de culture cellulaire. Ces antigènes correspondent aux sous-unités structurales de la capsidie virale :

- L'antigène A, spécifique du groupe, fixe le complément de la même façon avec un immunosérum homologue ou hétérologue ; il correspond à l'hexon.

- L'antigène B, responsable de l'effet cellulo-détachant, est constitué du capsomère de sommet (base du penton) associé à la fibre.

- L'antigène C, spécifique du type, réagissant uniquement avec un immunosérum homologue, est libéré du penton ; il est formé d'une fibre terminée par une sphérule.

3°) Données biochimiques.

- L'hexon est une holoprotéine riche en acides aminés dicarboxyliques (25 %), assez riche en sérine, thréonine, leucine et alanine. Les acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine) ne constituent que 10 % des acides aminés totaux.

BOULANGER et PUVION, en 1973 (8), montrent que l'hexon est un trimère dont la sous-unité polypeptidique a un poids moléculaire de 120.000 selon MAIZEL et coll. 1968a (9); CROWTHER et FRANKLIN, 1972 (10).

Sa séquence de 1000 acides aminés est en cours de détermination par PHILIPSON et PETERSSON, 1973 (11) et JÖRNWALL et coll., 1974 b (12). On y trouve 17 résidus de méthionine et 7 demi-cystéine donc vraisemblablement 3 ponts disulfure.

- Le penton, comme l'hexon, est riche en acides aminés dicarboxyliques (20 %) et pauvre en acides aminés basiques (11,5 %) mais en diffère par sa richesse relative en cystéine. Son poids moléculaire est voisin de 500.000, 300.000 pour la base du penton constituée de 5 sous-unités polypeptidiques identiques et 200.000 pour la fibre composée de 3 sous-unités polypeptidiques différentes.

La composition en polypeptides contribuant au maintien de la structure de l'adénovirus 2 a été étudiée par la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de lauryl sulfate de sodium (SDS) par MAIZEL et coll. en 1968_{a,b} (13, 14); 9 polypeptides majeurs ont été ainsi détectés (II à X).

En 1971, PEREIRA et SKEHEL (15), puis en 1973, EVERITT et coll. (16), ANDERSON et coll. (17) dénombrent 12 polypeptides :

- Les polypeptides II, III, IV ont été identifiés aux composants des capsomères : l'hexon (II), la base du penton (III) et la fibre (IV).

- Les polypeptides IVa₁, et IVa₂, situés entre le IV et le V ne sont pas encore identifiés.

- Les polypeptides V et VII, riches en arginine, sont associés au DNA ; le polypeptide VII est la protéine majeure du "core".

- Les autres polypeptides sont associés à l'hexon. Des dégradations séquentielles du virion montrent que le polypeptide VI est associé à tous les hexons dans la proportion de 2 par capsomère.

Les polypeptides VIII et IX sont associés aux groupes de 9 hexons composant les faces triangulaires de l'icosaèdre.

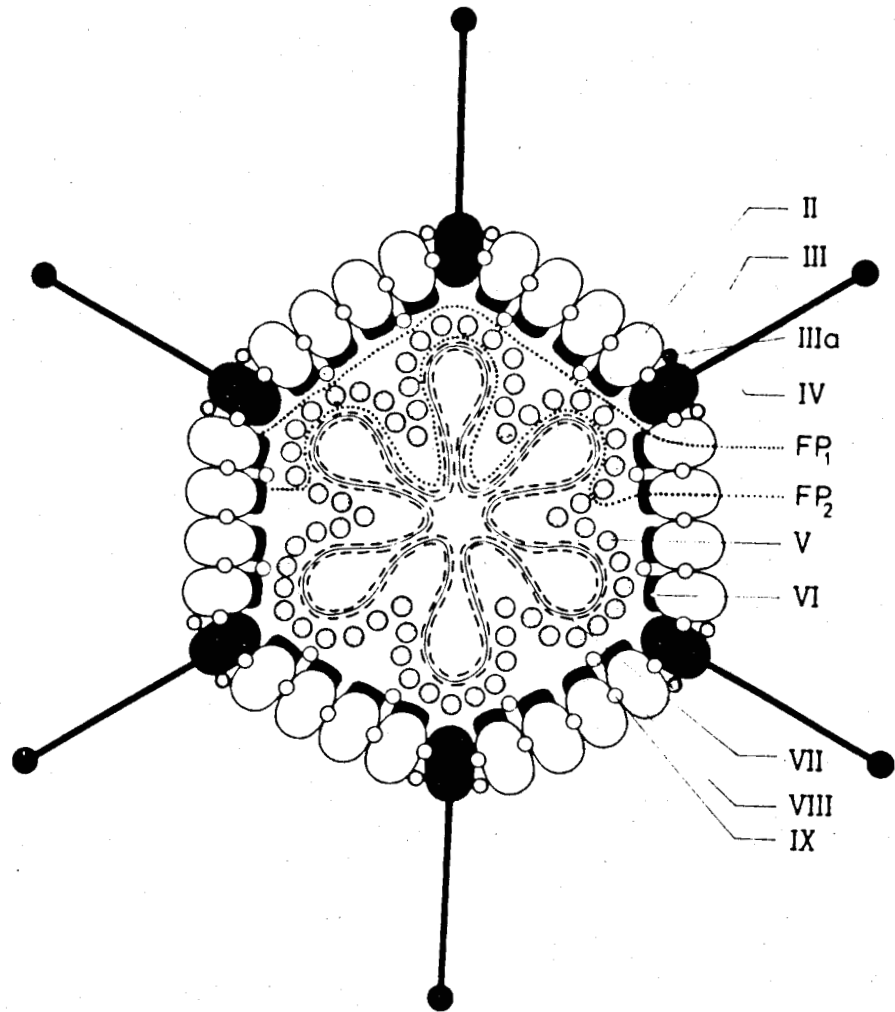


FIGURE N° 1

Localisation des protéines dans la particule virale de l'adénovirus type 2

Modèle proposé par PHILIPSON

(18)



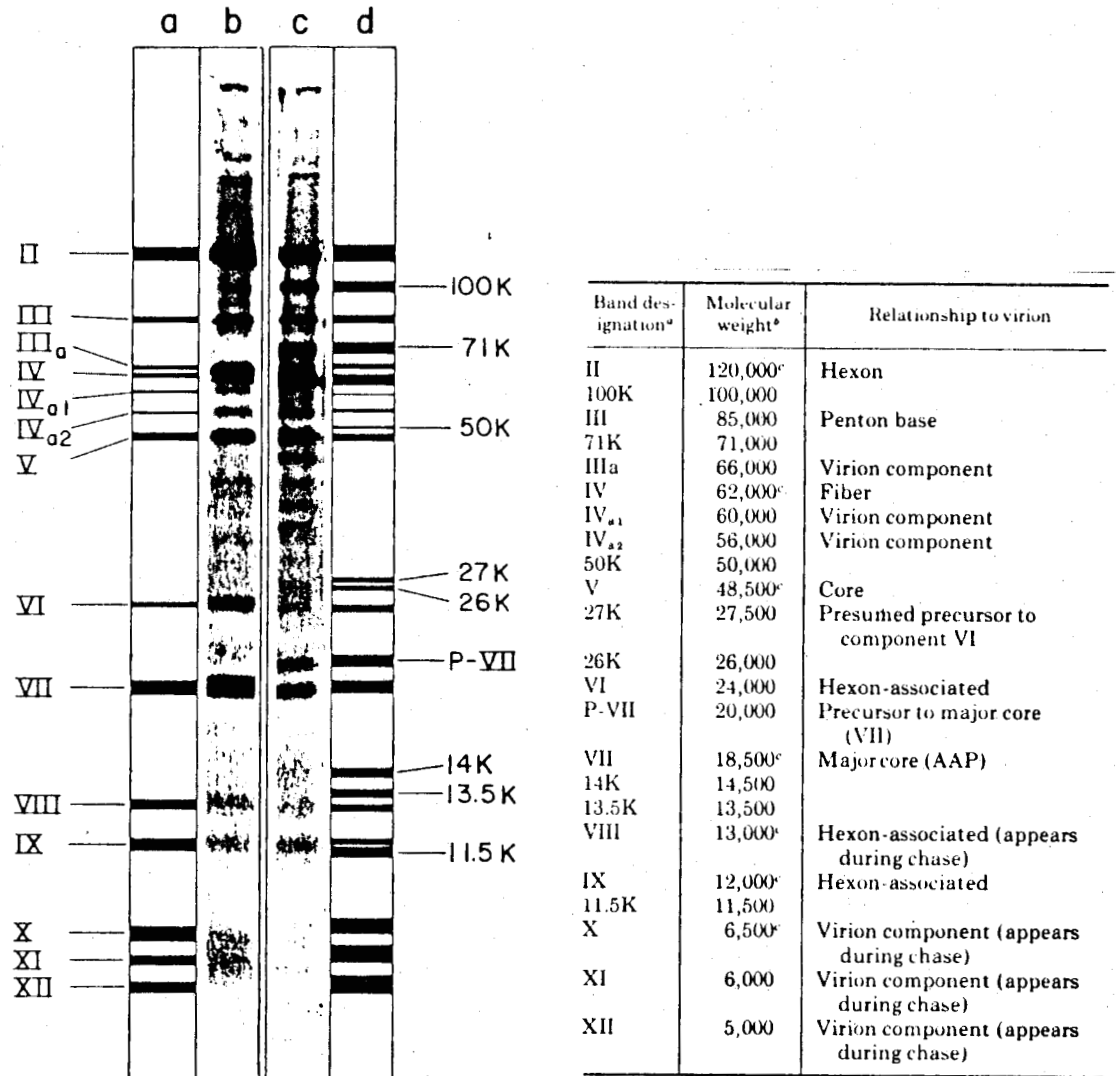


FIGURE N° 2

Anderson et coll. (19) Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide-SDS.

a - Polypeptides du virion marqués à la méthionine ³⁵S

d - Extraits de cellules KB infectées par ad2 = 22 composés polypeptidiques viro-induits marqués à la méthionine ³⁵S.



Le polypeptide IIIa est associé aux hexons péripentonaux.

- De petits polypeptides X, XI, XII migrent au niveau du front de migration. Les polypeptides XI et XII semblent provenir de la dégradation d'autres polypeptides de poids moléculaire plus élevé.

C - PROCESSUS D'INFECTION DE CELLULES PERMISSIVES PAR L'ADENOVIRUS.

Des cellules humaines poussant en lignée continue et provenant soit d'un cancer buccal (KB) soit d'un épithélioma du col utérin (HeLa), sont infectées par l'adénovirus à une multiplicité d'infection de 10 PFU par cellule (unité formant plaque).

1°) Adsorption de l'adénovirus sur la cellule hôte.

Le processus d'infection commence par l'adsorption des virions sur la surface cellulaire.

D'après LONBERG-HOLM et PHILIPSON (20), en moins de 30 minutes, à 37°C, des milliers de particules virales sont adsorbées sur chaque cellule. Au bout d'une heure, 80 à 90 % des virus sont fixés sur la membrane cellulaire mais seulement 6 à 10 % des particules adsorbées peuvent provoquer une infection ; leur durée de demi-vie est d'environ 15 minutes.

De plus, 20 % des virus fixés semblent être réfractaires à la décapsidation, ils doivent être attachés à des cellules non viables ou à des fragments cellulaires.

a) Concept de "récepteur cellulaire" : En fin d'adsorption les virus sont attachés sur la surface cellulaire par des récepteurs spécifiques de la membrane plasmatique de la cellule hôte.

- En 1968, PHILIPSON et al. (21) montrent que le composant viral constituant les points de contact entre le virus d'une part et les récepteurs cellulaires d'autre part, est fort probablement l'antigène fibre.

En effet, cet antigène hautement purifié inhibe, dans les conditions physiologiques, la fixation du virion sur la membrane cellulaire.

La capacité maximum de liaison serait de 150 ng de fibre pour 1 mg de protéines de membrane plasmique.

La fixation du virus sur la cellule dépendrait de la longueur de la fibre car l'adénovirus type 5, possédant de longues fibres, s'adsorbe plus fermement sur la cellule hôte que l'adénovirus type 7 à courtes fibres ; d'autre part le type 5 pénètre plus rapidement et en forte proportion dans le noyau, alors que le type 7 est préférentiellement dirigé vers les lysosomes et les vacuoles où il semble rester "sequestré" pendant plusieurs heures.

D'après PHILIPSON et coll., en 1968 (22), il existe 10^4 sites récepteurs pour l'adénovirus type 2 et 10 à 100 fois plus de sites récepteurs par cellule pour l'antigène fibre seul que pour le virion correspondant. Ces sites constituent 0,015 % des protéines de membrane plasmique selon HUGHES et MAUTNER, en 1973 (23).

La reconnaissance de tels sites et la non-équivalence numérique peuvent être attribués soit au couplage des petites protéines de fibre sur des sites inaccessibles aux virions pour des raisons d'empêchement stérique, ou soit à la possibilité que possède le virion de s'accrocher à plusieurs sites récepteurs par plusieurs fibres.

- RUSSELL, Mac INTOSH et SKEHEL, en 1971 (24), essaient de solubiliser le complexe "membrane-adénovirus" par des extractions douces en employant des détergents tels que le désoxycholate de sodium 1 % (D.O.C.) ou le Triton X 100 1 % qui laissent intactes les activités biologiques.

Une extraction douce avec du D.O.C. 0,5 % à 2°C, pendant 45 minutes, enlève 31 % des protéines de membrane et 60 % des glycoprotéines. Ces protéines seraient à l'extérieur des membranes de surface ; une telle localisation pour des sites récepteurs viraux semble logique.

D'autre part, le traitement des membranes de cellules KB avec du D.O.C. 1 % détruit 80 % de l'activité de liaison fibre-membrane, ce qui est un argument de plus en faveur de la fixation de l'adénovirus par sa fibre sur les récepteurs cellulaires.

Cependant, d'après HUGHES et MAUTNER, en 1973 (25), on ignore encore actuellement si les récepteurs spécifiques de chaque adénovirus, situés sur les membranes de cellules KB, sont tous sensibles aux détergents.

BUTTERS et HUGHES, en 1974 (26), ont montré par double marquage de cellules KB à la glucosamine ^3H et à la méthionine ^{35}S , puis extraction des protéines de membrane par le Triton X 100, que le complexe "membrane-virus" était stable et que 3 polypeptides majeurs glycosylés sont responsables de l'adsorption de l'adénovirus type 5 sur les cellules KB, leurs poids moléculaires apparents étant de 92.000, 72.000 et 62.000 daltons.

b) Inhibition de l'adsorption: * Réversible : Les fibres de certains adénovirus, produits en grand excès dans les cellules infectées, peuvent réagir de façon stochiométrique avec les récepteurs d'un certain nombre de sérotypes d'adénovirus.

SHORTRIDGE et BIDDLE, en 1968 (27), inhibent de façon réversible l'hémagglutination de l'adénovirus type 5 à l'aide d'une $\alpha 1$ globuline de sérum humain, de faible poids moléculaire et s'attachant à l'antigène fibre.

Les récepteurs de la plupart des virus peuvent être saturés par un excès de virus. En effet, MORI et coll. (28) montrent que le virus influenza peut saturer les sites récepteurs érythrocytaires du virus polyoma mais, par contre, le virus polyoma ne peut saturer que quelques uns des récepteurs du virus influenza.

Il existe également, d'après HUGHES et MAUTNER, en 1973 (29), une inhibition de 50 à 60 % avec la concanavaline A, lectine qui se fixe sur les groupements α glycosyles. On ignore cependant si le site de fixation est le même pour la lectine et pour la fibre.

* Irréversible : Philipson, en 1968 (30), montre que les récepteurs d'adénovirus 2 des cellules HeLa ne sont pas inactivés par des protéases à spécificité étroite comme la trypsine ou la chymotrypsine ; au contraire, l'adsorption du virus est augmentée après action de ces enzymes. Les protéases à spécificité large comme la subtilisine détruisent

les récepteurs.

Par contre, d'après NEURATH et coll., en 1969 (31), les récepteurs d'adénovirus 7 des membranes érythrocytaires sont détruits par la trypsine et la chymotrypsine.

Les récepteurs d'adénovirus 2 ont un temps de demi-régénération de six heures après traitement des cellules à la subtilisine. Pour le poliovirus, après traitement des cellules à la trypsine, la régénération est de une à deux heures. Quant au virus coxsackie B, la régénération a lieu au bout de deux jours après traitement par la chymotrypsine.

Selon SHEN et GINSBURG, en 1968 (32), alors que la trypsine relâche une grande partie des carbohydrates de la cellule sous forme de glycopeptides, il est possible que la sensibilité des récepteurs aux enzymes protéolytiques résulte de la perte, et non de la destruction, de la partie responsable de l'interaction "virus-cellule" qui serait un polysaccharide.

Certains réactifs chimiques réagissent avec les composants protéiques des membranes cellulaires ; ils ont été utilisés, en particulier, pour l'étude des récepteurs érythrocytaires de l'adénovirus type 7.

En 1970, NEURATH et coll. (33) inhibent sélectivement ces récepteurs en modifiant leurs groupements carboxyliques par le 1 cyclohexyl 3 (2 morpholinoéthyl) carbodiimide paratoluène sulfonate. Une protéine à groupement carboxylique est donc impliquée lors du processus d'adsorption.

Les mêmes auteurs inactivent l'activité hémagglutinante de l'adénovirus type 7 avec la 2 - 3 butane-dione, réactif spécifique de l'arginine. Par contre, ni le formaldéhyde, réactif des groupements aminés libres, ni les réactifs des groupements sulfhydryles n'inactivent les récepteurs érythrocytaires (34).

c) Augmentation du taux d'adsorption : En 1968, PHILIPSON (35) montre que l'adsorption de l'adénovirus 2 sur les cellules KB ou HeLa est augmentée après traitement des cellules intactes par la trypsine.

BOULANGER et coll. (36) obtiennent également une augmentation de l'adsorption après action de la neuraminidase sur les cellules hôtes. Si le traitement par la neuraminidase est suivi de l'action d'une fucosidase, l'adsorption est encore accrue. Ce phénomène peut s'expliquer soit par une diminution de la rigidité membranaire après désialidation, soit par une diminution de l'empêchement stérique, soit par une diminution de charges électriques répulsives permettant une meilleure interaction "virus-récepteur".

On peut assister aussi à un réarrangement de la surface cellulaire par suite d'une réduction des forces répulsives entre les sous-unités membranaires, d'où une certaine aggrégation. L'augmentation de l'adsorption, dans ce cas, est la conséquence d'une densité plus grande de récepteurs au niveau des membranes, selon les régions de la surface d'une même cellule.

d) Facteurs affectant le pourcentage d'adsorption : L'adsorption du virus implique une séquence d'évènements conduisant d'une liaison lâche à une liaison étroite, la progression de cette séquence peut dépendre de différents facteurs.

- Le pourcentage d'adsorption du virus dépend de la concentration en récepteurs donc du nombre de cellules par ml. Si l'on emploie une quantité de virus inférieure à la saturation et si la concentration en cellules reste constante, l'adsorption du virus suit approximativement une cinétique d'ordre 1.

Selon VALENTINE et ALLISON (37), la fréquence de collision d'un virion avec la surface cellulaire, par mouvement brownien, est 10^4 fois supérieure à la fréquence d'attachement, l'efficacité d'adsorption est donc excessivement basse.

- PHILIPSON, en 1967 (38), montre que la température joue sur le maximum de fréquence de collisions entre le virion et la cellule, de telle sorte que le pourcentage d'adsorption décroît lorsque la température diminue.

D'autre part, la diffusion des récepteurs sur la surface cellulaire dépend de la température car la viscosité des membranes, riches en lipides, varie de façon importante de 0°C à 37°C.

- L'interaction "virus-récepteur" est également sensible aux changements de pH. D'après NEURATH et HARTZELL, en 1970 (39), l'adsorption de l'adénovirus type 7 sur des membranes érythrocytaires est maximum si le pH est situé entre 5,5 et 8,7.

- Selon les mêmes auteurs, l'attachement optimum de l'adénovirus 7 sur les membranes érythrocytaires requiert une concentration saline de 0,1 M.

e) Mécanisme de l'adsorption : Le virus, dans un premier temps, réagit avec une ou plusieurs sous-unités de récepteurs spécifiques situés sur la surface de la cellule.

La liaison "virus-cellule" se formerait entre les résidus arginine non terminaux chargés positivement sur la fibre du virion et les groupements carbonyle des acides aspartique et glutamique ionisés négativement sur le récepteur.

Chaque étape dans l'établissement des ponts multivalents est dite "réversible" ; le virus adsorbé sur une cellule peut en être dissocié par lavages répétés ou par incubation dans un milieu dépourvu de virus.

A la fin de ces étapes de "pontage", l'adsorption devient irréversible. Des cations divalents participent à la liaison "récepteur-virus" car leur suppression par l'éthylène diamine tétra acétate (E.D.T.A.) conduit à une dissociation, mais les particules virales fermement adsorbées sur la membrane cellulaire par plusieurs récepteurs ou celles qui ont déjà pénétré dans la cellule résistent à cette dissociation.

2°) Pénétration du virus à l'intérieur de la cellule.

La pénétration du virus à l'intérieur de la cellule est la seconde étape du début de l'interaction "virus-cellule". Elle peut être mesurée par la perte de la sensibilité aux anticorps des centres infectieux,

quoique ce critère ne soit pas très spécifique à l'intérieur même de la cellule.

a) Rôle de la température : La pénétration virale a lieu rapidement, en quelques minutes les particules virales adsorbées sont incorporées dans la cellule ; cette étape est presque terminée 30 minutes après l'adsorption. Le virus entre alors, à l'intérieur de la cellule, en phase d'éclipse.

En 1967, LAWRENCE et GINSBERG (40) montrent que, pour l'adénovirus, les phases de pénétration et d'éclipse sont inhibées à basse température. Pour mieux étudier cette deuxième étape du début de l'interaction, on adsorbe le virus sur les cellules à 0°C pour bloquer les étapes suivantes conduisant à la perte irréversible de l'infectivité, on réchauffe ensuite brutalement à 37°C pour initier la pénétration du virus dans la cellule et pour favoriser une meilleure synchronisation des phénomènes.

b) Expérimentation : Le virion doit suivre un processus particulier pour passer la barrière de la membrane cellulaire.

En 1962, DALES (41) suggère que les particules virales sont ingérées par phagocytose, puis entassées dans le cytoplasme, dans de larges inclusions.

PHILIPSON, en 1968 (42), montre que les particules d'adénovirus sont dégradées au cours de leur pénétration dans la cellule hôte et que quelques produits de dégradation sont retrouvés dans le milieu extracellulaire : 5 à 8 % de radioactivité protéique sont ainsi rejetés pendant la phase de pénétration (43).

MORGAN et coll., en 1969 (44), observent en microscopie électronique, 10 minutes après le début de l'interaction "virus-cellule", à 37°C, quelques particules virales à l'intérieur de vacuoles de phagocytose, près de la surface cellulaire. La phagocytose, avec rupture de la vacuole dans le cytoplasme, aurait pu justifier de l'entrée de quelques particules.

En 1970, CHARDONNET et DALES (45, 46) révèlent que les particules virales se déplacent de la surface cellulaire vers le cytoplasme par pinocytose pour venir se loger au voisinage du noyau afin d'y poursuivre leur décapsidation.

D'après SUSSENBACH (47), peu de temps après leur pénétration à l'intérieur de la cellule, les particules virales ont l'apparence de virions intacts mais elles ont perdu leur activité hémagglutinante (due aux pentons) et leur densité augmente de 1,34 à 1,35 ce qui correspond à une perte de 5 % en protéines par rapport au virion intact. Le penton représente 5 % de la masse totale des protéines du virion. Ces particules ont donc perdu leurs pentons et, par conséquent, leur pouvoir infectieux et leur pouvoir hémagglutinant.

La perte d'une telle protéine de structure aurait lieu lors du passage du virus à travers la membrane plasmique ; cette perte relâche la structure icosaédrale de la particule virale lui permettant d'acquérir une forme sphérique décelée dans les répliques de "freeze-etching" de cellules infectées, par BROWN et BURLINGHAM en 1973 (48).

Selon LONBERG-HOLM et PHILIPSON (49), la demi-vie du virion intact associé aux cellules est de 15 minutes. Les particules d'adénovirus intracytoplasmiques n'ont qu'une vie transitoire dans le cytoplasme ; elles sont ultérieurement altérées en particules sensibles à la désoxyribonucléase, principalement au niveau ou à l'intérieur du noyau (50, 51, 52, 53).

c) Processus de pénétration : Contrairement donc aux virus éthéro-sensibles (herpès, influenza, sendai) qui semblent fusionner avec la membrane cellulaire et libérer leur contenu dans le cytoplasme, l'adénovirus pourrait passer directement à travers la membrane cellulaire. Ce mode de pénétration nécessite une capsid virale intacte ou peu altérée.

Cependant, un certain nombre de virions s'accumulent à l'intérieur de vacuoles de phagocytose où l'on peut les retrouver intacts trois heures après le début de l'infection, bien que la plupart des virus libres aient alors disparu du cytoplasme.

A l'aide de la microscopie électronique, différents auteurs (54, 55, 56, 57), décrivent la migration d'adénovirus à l'intérieur du cytoplasme, dans des vésicules lysosomiales. Cette migration, relativement lente pour l'adénovirus type 7, est plus rapide pour les types 2 et 5. Ces particules virales sont détectées à une fréquence relativement basse et il semble que les adénovirus présents dans les lysosomes y soient "sequestrés" et ne correspondent pas à des particules infectieuses: ils ne donneront pas de progéniture virale.

3°) Décapsidation du génome viral.

La décapsidation est le processus qui rend le DNA viral parental sensible à l'action de la désoxyribonucléase. En d'autres termes, c'est une altération intracellulaire de la capsid virale qui rend le génome viral accessible aux systèmes enzymatiques cellulaires qui effectuent son décodage.

Après la première étape de l'infection aboutissant à une altération morphologique du virus, MORGAN et coll., en 1969 (58), visualisent, à l'intérieur de la cellule, la nucléoprotéine de l'adénovirus sortant de la capsid virale et franchissant la membrane nucléaire.

HUANG et BALTIMORE, en 1970 (59), affirment qu'il est maintenant certain que l'acide nucléique viral parental n'a pas besoin d'être entièrement dépouillé des protéines du virion pour commencer sa transcription ou même sa réplication. Les acides nucléiques n'existent pas entièrement "nus" à l'intérieur de la cellule et sont toujours associés à des protéines virales ou même cellulaires.

a) Localisation du processus : Les membranes plasmique et nucléaire, ainsi que les lysosomes, sont souvent impliqués dans les phénomènes de décapsidation, mais leurs rôles respectifs diffèrent d'un virus à l'autre. Pour l'adénovirus, les étapes de décapsidation sont localisées, selon les auteurs, à différents endroits de la cellule.

DALES, en 1962 (60), par la microscopie électronique, retrouve, en quelques minutes, des particules libres à nucléofide dense aux abords de la matrice cytoplasmique périnucléaire au niveau des pores du

noyau. Le processus de décapsidation se situerait au niveau de la membrane nucléaire.

Pour JOKLIK, en 1965 (61), les virus animaux seraient décapsidés à l'intérieur ou au voisinage des vésicules de phagocytose.

En 1969, LONBERG-HOLM et PHILIPSON (62) localisent la première étape de décapsidation au niveau de la membrane plasmatique, conduisant à une particule dont le DNA peut être solubilisé à 70 % par la DNase. En effet, l'absence de virus intact, libre, dans le cytoplasme serait en accord avec l'existence d'un complexe intermédiaire "virus-récepteur cellulaire". De plus, les virions proches de la surface cellulaire paraissent moins altérés que ceux situés à l'intérieur du cytoplasme. Ils suggèrent donc que les virions soient partiellement décapsidés lors de leur libération de la membrane dans le cytoplasme.

Mais, pour MORGAN et al., en 1969 (63), l'altération de la capsid et du nucléofide aurait plutôt lieu sur les virions libres, à l'intérieur du cytoplasme. Les particules virales subissent une modification structurale. Le nucléofide deviendrait granulaire, tandis que, les faces cristallines s'estompant, la surface du virus prendrait une apparence diffuse.

En 1972, OGIER et coll. (64) ont prouvé que le DNA d'adénovirus extrait des lysosomes, bien que restant infectieux, était devenu sensible à la DNase pancréatique, ce qui suggère une décapsidation partielle des particules d'adénovirus absorbés par phagocytose et enfermés à l'intérieur des lysosomes. On ignore encore comment le pouvoir infectieux peut alors résister à l'action de la DNase lysosomale.

b) Processus : D'après LAWRENCE ET GINSBERG, en 1967 (65), 19 % des virus adsorbés à 4°C sur les cellules et réextraits par lavage sont décapsidés. La libération intracellulaire du DNA viral commencerait dès le début de l'incubation à 37°C.

Nos résultats obtenus en 1973 (66) sont compatibles avec les études faites "in vivo" par LONBERG-HOLM, PHILIPSON et MORGAN (67, 68) et "in vitro" par BOULANGER et WAROCQUIER (69) sur la dégradation des adénovirus par des préparations de membranes plasmatiques et nucléaires isolées de cellules KB.

On peut donc suggérer que la décapsidation est un processus à deux temps, l'étape initiale se déroulant à la surface de la cellule, au niveau de la membrane plasmique, la décapsidation complète s'achevant à la membrane nucléaire.

Une heure après la pénétration virale à l'intérieur de la cellule, 93 % du virus intracellulaire a son matériel protéique acido-précipitable (acide trichloracétique 5 %) et son DNA sensible à la désoxyribonucléase. Ce taux maximum dépend des conditions de culture des cellules, de l'adsorption, des méthodes de lavage et de la préparation des extraits cellulaires.

D'autre part, les protéines relâchées lors de la décapsidation ont une densité de 1,31 et sont insolubles dans l'acide trichloracétique. La décapsidation n'implique donc aucune dégradation profonde des protéines de capsid en petits peptides.

c) Participation du métabolisme cellulaire : En 1967, LAWRENCE et GINSBERG (70) démontrent que la synthèse protéique n'est pas indispensable au développement de la sensibilité à la désoxyribonucléase.

D'autre part PHILIPSON, en 1967 (71), étudie l'efficacité de la décapsidation en présence d'actinomycine D et de puromycine, inhibiteurs respectifs de la synthèse de RNA DNA-dépendante et de la synthèse protéique. Il ne constate aucune action de ces inhibiteurs métaboliques. Le processus de décapsidation ne paraît donc pas nécessiter la synthèse de RNA, ni celle de protéines cellulaires.

Si la décapsidation de l'adénovirus nécessite l'intervention d'une activité enzymatique cellulaire quelconque, cette enzyme n'est pas synthétisée après l'initiation de l'infection, mais est préexistante dans la cellule avant toute invasion virale.

d) Action de différents facteurs sur la décapsidation : MORGAN, en 1969 (72), après blocage des systèmes énergétiques cellulaires par les arsénates, note la pénétration de nombreux virions altérés dans le cytoplasme mais la libération de la nucléoprotéine n'a pas lieu. Le

processus de décapsidation nécessiterait donc de l'énergie.

La température joue également un rôle sur la décapsidation. En effet, après exposition des cellules infectées trois heures à 0°C, LAWRENCE et GINSBERG (73) ne décèlent aucune décapsidation du DNA viral. Dès que l'on incube à 37°C, le pouvoir infectieux se perd rapidement tandis qu'apparaît la sensibilité à la désoxyribonucléase. La décapsidation ne se déroulerait donc correctement qu'au-dessus de 30°C (la température de 32°C est utilisée pour la culture de certains mutants, dits thermosensibles).

Les rayons ultra-violetts agissent différemment selon les virus. En 1964, JOKLIK (74) relate qu'un poxvirus, inactivé par irradiation aux U.V., n'est pas décapsidé dans les cellules HeLa. Il postule que le traitement aux U.V. affecterait une protéine virale agissant comme inducteur de la décapsidation.

Cependant, il n'est pas évident que l'adénovirus possède une protéine inductrice similaire sensible aux U.V. En fait, la vitesse et l'étendue de la décapsidation sont identiques que le virus soit traité ou non par les U.V. Aucun composant viral, sensible aux U.V., n'est donc indispensable à la décapsidation de l'adénovirus.

4°) Entrée de la nucléoprotéine dans le noyau de la cellule.

D'après LAWRENCE et GINSBERG, en 1967 (75), la séparation complète du DNA viral et des protéines de capsid se déroule après le transfert de la particule virale au noyau.

Par des études en microscopie électronique, MORGAN et coll. (76), en 1969, montrent la progression de la nucléoprotéine d'adénovirus vers les pores de la membrane nucléaire dans lesquels le nucléofide dense est littéralement "injecté", laissant dans le cytoplasme une capsid vide.

En 1969, LONBERG-HOLM et PHILIPSON (77) calculent que la moitié du produit, partiellement décapsidé au niveau de la membrane plasmatique, entre rapidement dans le noyau où le DNA viral est dépouillé des protéines du nucléoïde.

MORGAN, en 1969 (78), puis CHARDONNET et DALES, en 1970 (79), montrent en microscopie électronique que, deux heures après l'incubation, au niveau des pores nucléaires, la plupart des particules virales possédant un centre dense ont disparu et, à leur place, apparaissent des capsides vides, quelques unes apparaissant dégradées.

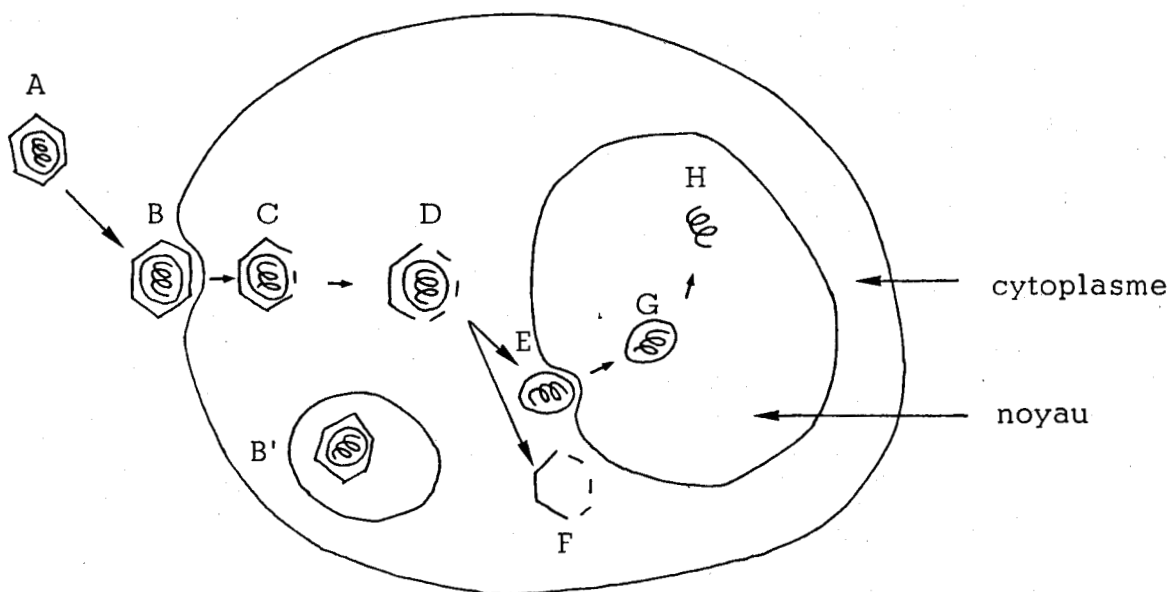
Il y a donc eu migration des particules d'adénovirus au voisinage des pores nucléaires. La capside est fortement altérée et une fine coque entoure la nucléoprotéine.

En même temps, la chromatine s'accumule dans le noyau tandis qu'à proximité des particules les membranes nucléaires et cytoplasmiques se renflent vers l'intérieur du noyau, créant ainsi une sorte de poche.

La capside virale se rompt et le nucléoïde viral se décharge directement dans la poche nucléaire pour passer ensuite dans le noyau, laissant dans le cytoplasme périnucléaire un "fantôme" de capside vide.

On ignore tout des mécanismes par lesquels l'acide nucléique viral est débarrassé des protéines de type "histone" du nucléoïde. Ce DNA sera d'abord transcrit en RNA messenger, lui-même traduit en protéines virales dites "précoces", car précédant la réplication du DNA viral. Ces protéines précoces sont nécessaires aux phases suivantes qui sont la réplication du DNA viral, puis la transcription des gènes "tardifs" (gènes des protéines capsidales).

Schéma récapitulatif des différentes étapes du processus d'infection.



- A Virus libre extracellulaire
- B Complexe virus - récepteur cellulaire (adsorption)
- B' Virus intact dans une vacuole de phagocytose
- C Virus partiellement décapsidé intracellulaire
- D Décapsidation intracytoplasmique
- E Nucleoïde viral au niveau d'un pore nucléaire
- F Capside vide
- G Nucléoprotéine à l'intérieur du noyau
- H DNA viral dans le noyau

FIGURE N° 3



1. Adsorption de l'adénovirus sur la surface cellulaire
(x 150.000)
2. Pénétration de l'adénovirus à l'intérieur de la cellule
(x 150.000)
3. Virus intact à l'intérieur des vacuoles de phagocytose
(x 75.000)
4. Passage de la nucléoprotéine de la capsid virale dans
le noyau de la cellule (x 150.000)

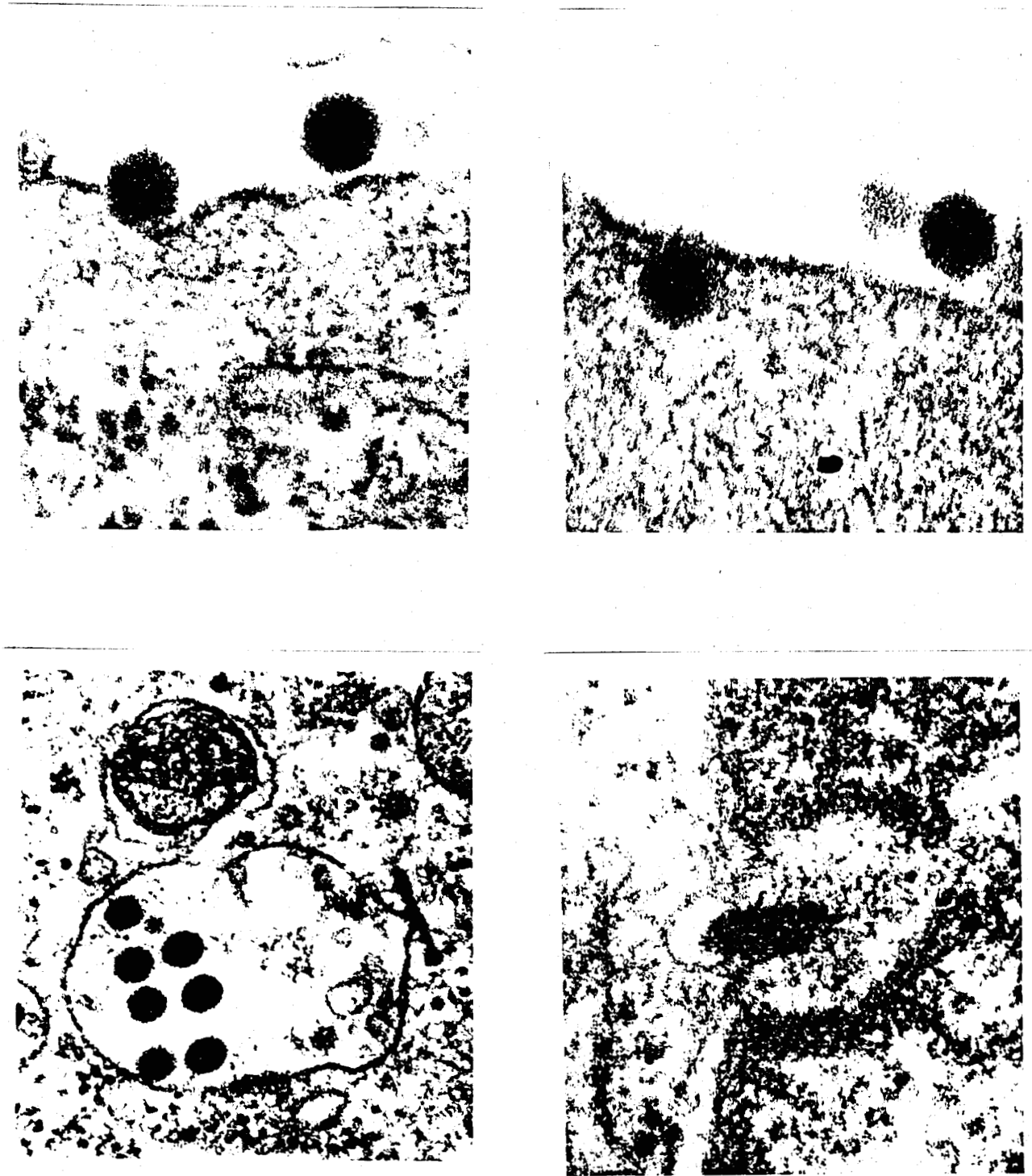


FIGURE N° 4

Photos de microscope électronique

d'après MORGAN et coll. (80)



1ère PARTIE

ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE OU IMMUNO-
ADSORBANT D'UNE GLYCOPROTEINE DE MEMBRANE DE CELLULES KB,
RECEPTEUR DE L'ADENOVIRUS TYPE 2.

INTRODUCTION

1°) Principe de la chromatographie d'affinité.

La chromatographie d'affinité est une nouvelle méthode de fractionnement de macromolécules mise au point, en 1968, par CUATRECASAS et al. (81), et basée sur les propriétés biologiques spécifiques des substances à isoler.

Sur un polymère insoluble (support) on fixe par liaison covalente un ligand, molécule complémentaire du site actif de la protéine à séparer. Si sur ce support-ligand on passe une solution complexe de protéines, seules celles ayant une affinité pour le ligand s'y fixent de façon spécifique et réversible. Les autres protéines non retenues par le gel passent dans l'effluent.

Dans un second temps la protéine accrochée au ligand est éluée brutalement par simple changement de pH ou de force ionique.

Cette technique peut être appliquée à un grand nombre de systèmes macromolécule -ligand. Elle permet d'isoler, par exemple, des enzymes, des anticorps, des antigènes, des acides nucléiques, des protéines de transport, des protéines répresseurs, des récepteurs d'hormones ou de médicaments, des complexes polyribosomiaux ou multienzymatiques. Elle peut également être utilisée dans certains cas pour concentrer des solutions diluées de protéines et pour séparer les différents composants obtenus lors d'une modification chimique spécifique d'une protéine purifiée.

En fait, ce n'est pas une véritable chromatographie, c'est un simple déplacement répondant à la loi du "tout ou rien" à moins que plusieurs protéines ne soient susceptibles de se fixer sur le ligand d'où l'utilisation de techniques très spécifiques et particulières à la macromolécule à isoler.

Cependant les avantages de cette méthode de fractionnement sont importants :

- L'isolement de la macromolécule, basé sur sa fonction biologique, est plus sélectif que les méthodes classiques.
- Le principe même de la séparation permet d'éliminer des contaminants (protéases...) et sa rapidité, d'éviter une dénaturation de la macromolécule.
- La liaison macromolécule-ligand protège les sites actifs, stabilise la structure tertiaire et conserve la conformation native des protéines.

2°) Application à l'isolement d'un récepteur viral cellulaire.

Dans le cas présent, la chromatographie d'affinité est utilisée dans le but d'isoler les récepteurs viraux des membranes de cellules KB.

D'après HUGHES et MAUTNER (82), les récepteurs cellulaires ne constituent que 0,015 % des protéines de membrane plasmique des cellules KB. Devant ce faible pourcentage, le problème est de choisir "un modèle chromatographique" nous permettant d'obtenir le meilleur rendement possible.

Lors de l'adsorption, première étape dans le processus d'infection virale, les virions s'attachent sur la surface cellulaire par des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique de la cellule-hôte. Le composant viral constituant les points de contact entre le virus et les récepteurs cellulaires est fort probablement l'antigène fibre.

Le lien entre l'adénovirus et la cellule KB étant la fibre, d'autre part la protéine à isoler étant le récepteur cellulaire, il semble logique de se servir de l'antigène fibre comme ligand et de le fixer sur un support insoluble, tout en laissant libre son site actif qui possède une affinité pour certaines protéines de membranes cellulaires.

MATERIEL ET METHODES

Le choix du support dans la chromatographie d'affinité est très important. Il doit posséder les qualités suivantes :

- Le polymère sur lequel on attache le ligand doit avoir une structure réticulaire suffisamment lâche pour permettre aux macromolécules de pénétrer et de sortir librement à travers la matrice, et faciliter la fixation de la protéine à isoler.

- Il doit être stable et posséder de nombreux groupements chimiques susceptibles d'être modifiés pour former des liaisons covalentes lors des réactions de couplage gel-ligand.

- Les interactions avec la protéine à isoler doivent être très faibles de manière à minimiser les interactions non spécifiques.

Les deux polymères les plus employés sont :

- soit le Sepharose activé au CNBr
- soit le Biogel de polyacrylamide activé au glutaraldéhyde.

I - UTILISATION DU SEPHAROSE 4 B

A - PREPARATION DU GEL

1°) Structure du Sepharose.

Introduit par HJERTEN en 1962 (83), c'est le support actuellement le plus employé dans la chromatographie d'affinité. L'agarose est constitué par des chaînes linéaires de D-galactose lié à du 3,6-anhydro L-galactose par des liaisons α 1,4. Ces disaccharides sont reliés entre eux par des liaisons β 1,3.

La structure spatiale comporte des régions hélicoïdales alternant avec des chaînes en conformation désordonnée appelée "random coil". Cette diversité de structure lui confère des propriétés particulières : une grande perméabilité associée à une grande rigidité et une faculté de retenir l'eau échangeable. Les gels d'agarose seraient composés de régions creuses dont les ouvertures sont capables de laisser passer de très grosses molécules en solution. Ces régions sont reliées entre elles par une matrice dense formée de structures en hélices (REES, 84).

Trois types de gel d'agarose sont commercialisés sous le nom de "Sepharose" (Pharmacia) : 2 B, 4 B et 6 B ; ils correspondent à des concentrations respectives en agarose de 2, 4 et 6 %.

Le Sepharose 4 B est, de loin, le plus employé ; c'est celui que nous avons choisi en premier essai. ROBINSON et al. (85) ont montré que le Sepharose 2 B se réticule trop lors de l'activation et perd donc sa grande porosité ; le Sepharose 6 B présente, lui, l'inconvénient de ne permettre qu'un débit trop lent.

2°) Réticulation et activation du Sepharose 4 B par le bromure de cyanogène.

PORATH (86) conseille de réticuler l'agarose. Bien que les groupements hydroxyles activables soient alors diminués, de grands avantages sont obtenus, en particulier une augmentation de la stabilité aux bases et à la chaleur, et une insensibilité aux bactéries et aux enzymes.

Un certain degré de réticulation est obtenu spontanément lorsque le gel est activé par le bromure de cyanogène.

AXEN et VRETBLAD (87) ont découvert que les fonctions hydroxyles des polysaccharides peuvent réagir avec les halogénures de cyanogène pour donner des groupements imino carbonates cycliques réactifs. Parallèlement il se forme des groupements carbamates inactifs (voir Fig.5) et un certain nombre de réticulations entre les chaînes polysaccharidiques.

Le bromure de cyanogène est dissous préalablement dans l'acétonitrile, solvant organique miscible à l'eau (MARCH et al., 88) ou dans le N-méthyl-2-pyrrolidone (NISHIKAWA et BAILON, 89) puis ajouté à une suspension de gel dans l'eau en ajustant de façon continue le pH à 11 durant 10 minutes, temps d'activation.

Le nombre de groupements réactifs obtenu est proportionnel à la quantité de bromure de cyanogène ajoutée, ce qui permet de coupler plus ou moins de ligand ou de bras.

Du Sepharose 4 B activé au bromure de cyanogène est disponible commercialement (Pharmacia).

3°) Fixation du bras sur le Sepharose activé.

a) Intérêt d'un bras :

1 - CUATRECASAS, dès 1968 (90), montre la nécessité d'un bras maintenant le ligand à une certaine distance du support, de manière à éviter tout encombrement stérique qui gênerait la liaison macromolécule-ligand.

D'après LOWE (91), l'adsorption est d'autant plus forte que le bras est long ; cependant, la longueur optimum du bras est de 0,8 à 1,0 nm, ce qui correspond à un enchaînement de 6 à 8 carbones ; au-delà, le bras a tendance à se replier, donc à se rapprocher du support, ce qui est contraire à l'effet recherché.

Le bras le plus utilisé est une chaîne carbonée comportant une fonction amine primaire à chacune de ses extrémités, ce qui permet de la coupler au support activé d'une part et au ligand d'autre part.

2 - Autre intérêt d'un bras : Il a été démontré par NEURATH et coll., en 1970 (92), par des blocages spécifiques de groupements latéraux d'acides aminés, que c'étaient les groupements aminés de la protéine fibre qui réagissaient avec les groupements carboxyliques des glycoprotéines de la membrane des cellules réceptrices. Il y avait donc intérêt à laisser intact ces groupements aminés et à coupler la fibre sur le

support insoluble par les radicaux carboxyliques, en utilisant une molécule "bras" intermédiaire diaminée.

En l'occurrence nous choisissons le diamino-dipropyl-amine, bras à 6 atomes de carbone et possédant un groupement NH hydrophile qui favorise dans une étape ultérieure la fixation bras-ligand. Une des amines se fixe à l'imino carbonate cyclique du Sepharose activé et forme trois dérivés N-substitués ; imino carbonate ou amino-Sepharose, carbonate et isouréide (voir Fig. 5).

b) Préparation de l'amino-Sepharose :

6 g de gel de Sepharose 4 B activé au CNBr sont mis à gonfler dans 600 ml de HCl 1 mM, à température ambiante, pendant une nuit ; puis lavé très rapidement, en un quart d'heure, sur verre fritté, avec HCl 1 mM, à la concentration de 200 ml par g de gel, ce qui a pour but d'éliminer le dextran et le lactose qui préservent l'activité du Sepharose en poudre. Le volume de gel gonflé obtenu est de 3,5 ml par g de Sepharose.

Le gel lavé, on ajoute immédiatement, en moins de 15 secondes, 35 mM de diamino-dipropyl-amine ramené à pH 10 avec HCl 6 N, en agitant avec une baguette de verre et en refroidissant dans la glace car la réaction est exothermique ; on laisse sous agitation douce une nuit à 4°C.

Ensuite, l'amino-Sepharose est lavé par 200 volumes d'eau distillée pour éliminer les amines libres. On peut le stocker dans l'eau en présence d'azide de sodium 1 ‰.

c) Test coloré au sodium 2, 4, 6 trinitro benzène sulfonate :

Il permet de vérifier l'efficacité de l'amino-Sepharose préparé.

A 0,3 ml de gel, mis dans 1 ml de borate de sodium saturé, on ajoute 3 gouttes de solution aqueuse 3 % de 2, 4, 6 trinitro benzène sulfonate de sodium. On laisse 2 heures à température ambiante.

Le gel, après lavage à l'eau distillée, doit présenter une couleur orange, témoin de la fixation du diamino-dipropyl-amine sur le Sepharose 4 B activé au CNBr.

4°) Couplage du ligand sur l'amino-Sepharose.

a) Problèmes posés par la fibre :

Dans le "modèle chromatographique" proposé nous avons choisi la fibre comme ligand puisque, lors de l'adsorption, c'est le lien entre le virus et la cellule ; mais plusieurs problèmes se posent :

1 - Pontages inter-fibres :

Durant la réaction de couplage du ligand fibre avec la matrice insoluble, effectuée à l'aide d'un dérivé de la carbodiimide, il peut se produire des pontages intermoléculaires entre groupements aminés et carboxyliques appartenant à différentes molécules de ligand.

2 - Blocage des groupements aminés de la fibre :

Comme nous l'avons déjà souligné page 31, des blocages spécifiques des groupements réactifs de certains acides aminés de protéines de membranes de cellules réceptrices et de particules d'adénovirus ont montré que les groupements aminés de la fibre réagissaient avec les acides aminés dicarboxyliques des glycoprotéines de membrane. Il y a donc avantage à préserver au maximum les groupements aminés de la fibre.

Le blocage des fonctions NH_2 de la fibre par la méthode à l'anhydride citraconique nous a permis de fixer la fibre par son extrémité carboxylique avec un rendement deux fois supérieur à celui obtenu avec un lot témoin de fibre non traité par l'anhydride citraconique (Fig. 5).

Les réactions de couplage bras-ligand effectuées, dans un second temps nous débloquons les fonctions NH_2 de la fibre par une réaction de décitraconylation, afin de lui restituer son site d'affinité pour certaines protéines de membranes cellulaires.

b) Citraconylation de l'antigène fibre :

Selon la technique décrite par BOULANGER et PUVION (93), la protéine de structure fibre de l'adénovirus est purifiée par relargage, à 55 % de saturation en sulfate d'ammonium pH 7,0 à 4°C pendant une nuit,

d'un surnageant d'ultracentrifugation préparative d'adénovirus type 2, après extraction au Fréon 113. Le précipité obtenu est séparé par centrifugation, repris et dialysé contre du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,8 pour supprimer toute trace de sulfate d'ammonium. Les contaminations sont éliminées par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 90 minutes. Le surnageant est alors chromatographié sur DEAE-Sephadex A₅₀, résine échangeuse d'ions équilibrée en tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,8 ; à cette force ionique et à ce pH, la fibre n'est pas retenue par la résine et sort dans le pic exclu que l'on concentre au SO₄(NH₄)₂ à 55 % de saturation une nuit à 4°C.

Le précipité, fibre partiellement purifiée, est séparé par ultracentrifugation à 2 000 g pendant 15 minutes, repris et dialysé contre du phosphate de potassium 10 mM pH 6,8 une nuit à 4°C. Une seconde purification est faite sur hydroxyapatite équilibrée en phosphate de potassium 10 mM pH 6,8; lors du passage du gradient s'étalant de 50 mM à 500 mM en phosphate de potassium, la fibre s'éluë en phosphate de potassium 0,22 M.

50 mg de fibre d'adénovirus, sous un volume de 5 ml sont dialysés une nuit contre du tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM ; le pH est ajusté à 8,2 - 8,4 avec de la soude 2 N.

6 fois de suite, à 20 minutes d'intervalle, on ajoute 5 µl d'anhydride citraconique. Il est possible de suivre l'évolution de la réaction par la clarification progressive du mélange réactionnel. Après 2 heures à température ambiante, sous agitation, on dialyse 24 heures contre de l'eau distillée amenée à pH 9 par addition d'une goutte d'ammoniaque concentrée (Thèse Brigitte DEBUIRE, 1973, 94).

c) Couplage de la fibre citraconylée sur l'amino-Sepharose :

30 mg de fibre citraconylée sont dialysés contre du tampon borate de sodium 0,1 M pH 8,5/NaCl 1 M pendant une nuit à 4°C puis additionnés de 1-cyclohexyl-3 (2-morpholino éthyl) carbodiimide metho-

paratoluène sulfonate, activateur de la réaction de couplage, à une concentration finale de 0,1 M. On ajoute alors le gel sous forme d' amino-Sepharose (6 g) et on laisse la réaction se dérouler 3 heures à température ambiante sous faible agitation.

La fibre citraconylée non couplée est éliminée par filtration sur verre fritté. Le gel est rincé par un volume de tampon borate de sodium 0,1 M pH 8,5/NaCl 1 M puis lavé alternativement par un volume de ce même tampon, puis un volume de tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5/NaCl 1 M cinq fois de suite. Le gel ainsi préparé peut être conservé à 4°C en tampon borate de sodium 0,1 M pH 8,5/NaCl 1 M.

La quantité de fibre fixée par gramme d' amino-Sepharose est déterminée par un dosage de protéines par la méthode de LOWRY (95) avant et après le couplage. L'efficacité de fixation est de 5 mg de fibre par g de gel.

d) Réaction de décitraconylation :

La réaction de décitraconylation permettant de débloquent les fonctions aminées de la fibre s'effectue en milieu acide (SINGHAL et ATTASSI, 96).

Le "gel-bras-fibre citraconylée" est préalablement rincé en tampon glycolle 0,2 M HCl pH 2,8/NaCl 1 M pour éliminer toute trace de tampon borate de sodium pH 8,5, puis laissé 16 heures à 4°C dans le même tampon glycolle pH 2,8.

La réaction de décitraconylation terminée, le "gel-bras-fibre décitraconylée" est équilibré en tampon borate de sodium 0,1 M pH 8,5; il est alors prêt à employer pour la chromatographie d'affinité.

Remarque : On effectue sur le surnageant, après la réaction de décitraconylation, un dosage de protéines qui s'avère être négatif, ce qui permet de vérifier que la fibre ne s'est pas décrochée du gel et que seul le radical citraconyl a été enlevé lors de cette réaction.

Préparation de la " fibre-amino-Sepharose "

- a) Activation du Sepharose 4 B par le bromure de cyanogène.
- b) Couplage du bras "diamino-dipropyl-amine" sur le Sepharose activé ($R = (CH_2)_3 - NH - (CH_2)_3$).
- c) Réaction de N-citraconylation de la fibre d'adénovirus type 2.
- d) Couplage de la fibre N-citraconylée sur l' amino-Sepharose et réaction de décitraconylation en milieu acide (1).
Les fibres couplées à l' amino-Sepharose par leur groupement citraconyl sont libérées lors du traitement acide (2).

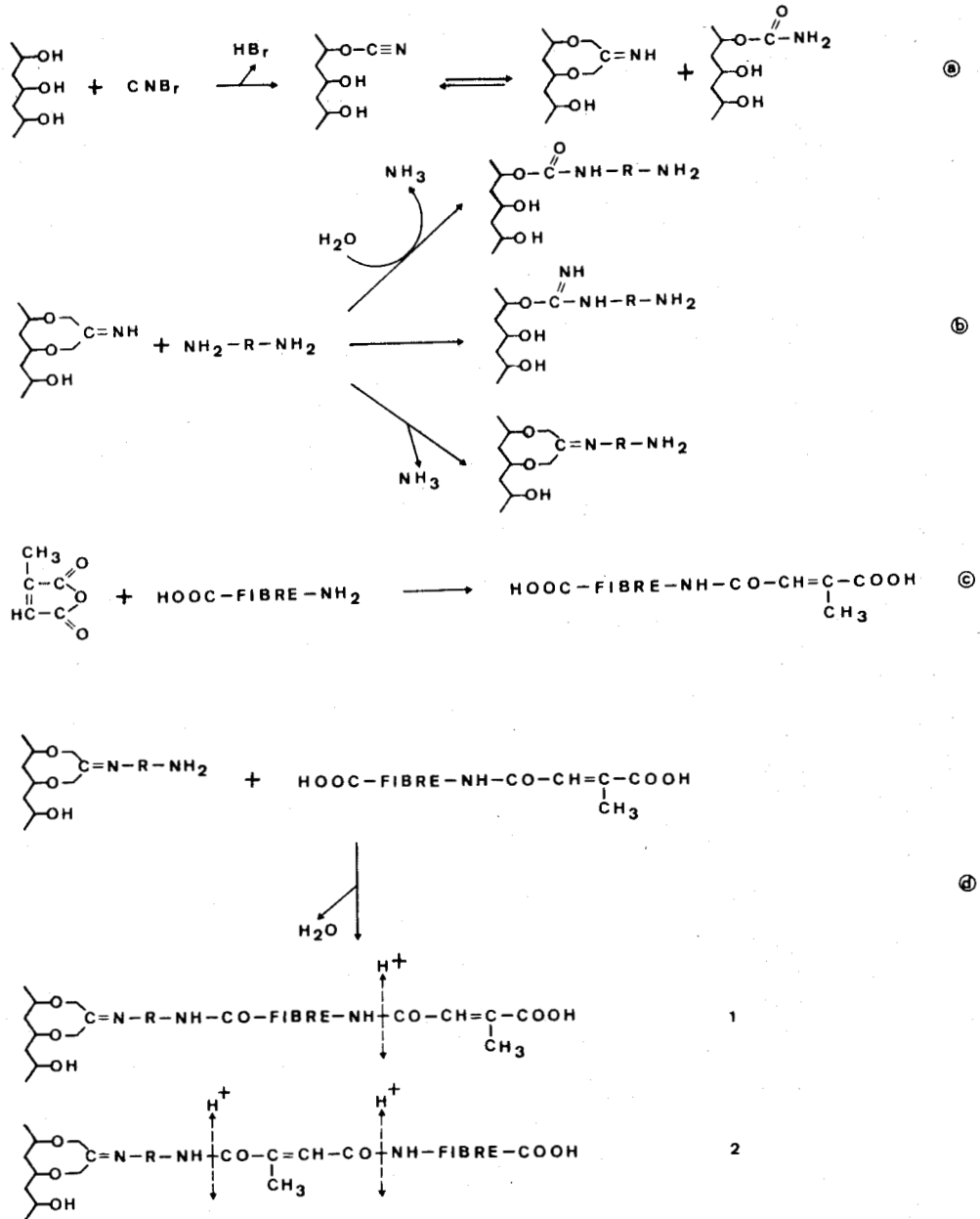


FIGURE N° 5

Préparation de la "fibre-amino-Sepharose"



B - CONTROLE DE L'EFFICACITE DU GEL D'AFFINITE

Si la fixation sur l' amino-Sepharose de la fibre citraconylée s'est effectuée dans le bon sens, après la réaction de décitraconylation l'extrémité aminée de la fibre doit retenir les anticorps d'un immunosérum antifibre.

1°) Passage sur le gel d'un immunosérum antifibre.

Sur 4 ml de fibre-amino-Sepharose, on adsorbe 1 ml d'un immunosérum de lapin antifibre d'adénovirus type 2, dialysé 24 heures à 4°C contre du tampon borate de sodium 0,1 M pH 8,5/NaCl 1 M puis dilué au 1/4 par addition de 3 ml du même tampon. L'adsorption se déroule à 4°C, sous faible agitation, pendant une nuit.

Le surnageant est recueilli après centrifugation à 7000 tours/minute pendant 15 minutes et le gel rincé par 2 fois 5 ml de tampon borate de sodium 0,1 M pH 8,5/NaCl 1 M.

L'élution est effectuée par 5 ml de tampon glycolle-HCl 0,2 M pH 4,5/NaCl 1 M pendant une heure à 4°C, sous agitation.

Le surnageant et l'éluat sont dialysés une nuit contre du P.B.S. puis concentré à 0,5 ml sur minidiaflo (membrane PM 10).

2°) Test d'immuno-précipitation en présence de fibre.

Dans deux séries de 4 tubes à hémolyse, soit 50 µl d'éluat, soit 50 µl de surnageant concentrés sont incubés en présence de 250 µl de fibre marquée à la méthionine ³⁵S.

Dans une troisième série, l'éluat ou le surnageant sont remplacés par 50 µl d'un immunosérum natif antifibre et sert de témoin d'immuno-précipitation spécifique.

Dans une quatrième série, la fibre est incubée en présence de 50 µl d'un immunosérum lapin anti-globulines de rat et sert de témoin d'immuno-précipitation non spécifique.

L'incubation se déroule à 37°C pendant 3 heures. Le complexe "antigène^{*}-anticorps" formé est filtré sur fibre de verre, rincé 5 fois par 5 ml de P.B.S. à 4°C et la radioactivité comptée dans 5 ml de liquide de scintillation à base de toluène.

C - ISOLEMENT D'UN RECEPTEUR PROTEIQUE DE MEMBRANE

1°) Extraction des protéines de membrane.

D'après BUTTERS et HUGHES, en 1974 (97), les protéines de membrane sont solubilisées par des détergents tels que le désoxycholate de sodium (D.O.C.) ou le Triton X₁₀₀.

Le culot de membranes plasmatiques, préparé selon la technique décrite page 99 , est resuspendu dans 2,5 ml de P.B.S., amené à une concentration finale de 0,5 % en désoxycholate de sodium par addition de 125 µl de D.O.C. 10 %, homogénéisé dans un appareil de Dounce par 3 aller-retours du piston de type B puis laissé 30 minutes à 0°C.

Les protéines de membrane, solubilisées par le détergent, se retrouvent dans le surnageant après centrifugation à 4°C pendant 20 minutes à 6000 g. Le D.O.C. est éliminé par dialyse à 4°C pendant 48 heures contre du tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,05 M.

Sur deux aliquotes nous effectuons d'une part un dosage de protéines par la méthode de LOWRY (98), d'autre part une mesure de la radioactivité ³H et ³⁵S dans 5 ml d'un liquide de scintillation, le mélange de BRAY (99).

2°) Chromatographie d'affinité.

Le gel de "Sepharose-bras-fibre décitraconylée "préalablement préparé est coulé dans une colonne de 20 cm de hauteur et de 1,5 cm de diamètre. Le débit de la colonne est de 2 ml/heure, (la boîte de vitesse de la pompe péristaltique LKB employée est du rapport 3/125 le calibre

des tuyaux étant de 1,10 mm). La chromatographie se déroule sous réfrigération à 4°C en recueillant des fractions de 1,5 ml.

Sur le sommet du gel, on dépose les protéines de membrane extraites par le D.O.C. 0,5 % et dialysées ensuite contre du tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,05 M afin d'éviter les adsorptions non spécifiques. La colonne est rincée en tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,15 M.

Une première élution est effectuée en tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,6 M, puis une deuxième élution est menée avec le même tampon mais de force ionique plus élevée, NaCl 1 M.

Sur chaque fraction recueillie nous suivons d'une part la résistivité et d'autre part nous mesurons la radioactivité ^3H et ^{35}S dans 5 ml de mélange de Bray à l'aide d'un spectrophotomètre à scintillation liquide (Intertechnique).

D - TESTS D'ACTIVITE DE LA PROTEINE ISOLEE

1°) Réaction d'immuno-précipitation de l'antigène fibre.

Dans une première série de tubes à hémolyse, nous déposons 100 μl d'éluat 0,6 M NaCl, obtenu à partir d'un extrait de membranes non marquées, puis 250 μl de fibre marquée à la méthionine ^{35}S . L'incubation se déroule 1 heure à 20°C. 200 μl d'un immunosérum monospécifique sont ensuite additionnés et nous laissons incuber de nouveau 2 heures à 37°C.

Dans une deuxième série de tubes à hémolyse nous remplaçons l'éluat par 100 μl de P.B.S., ce qui nous permet de connaître le pourcentage d'immuno-précipitation spécifique.

Dans une troisième série l'immunosérum antifibre est remplacé par un immunosérum de lapin antiglobulines de rat, qui nous permet de calculer l'immuno-précipitation non spécifique.

Après la seconde incubation en présence de l'immunosérum, les trois séries de tubes à hémolyse sont filtrés sur fibre de verre. Les filtres sont rincés 3 fois par 5 ml de P.B.S. et la radioactivité comptée dans 5 ml d'un liquide scintillant à base de toluène.

2°) Cinétique d'adsorption virale sur les cellules KB.

L'adsorption de l'adénovirus type 2 est étudiée sur les cellules KB en absence et en présence de différentes quantités de protéines retenues sur le gel "fibre-amino-Sepharose" puis éluées en NaCl 0,15 M ou en NaCl 0,6 M.

Dans 3 séries de tubes à hémolyse contenant différentes quantités d'éluat 0,15 M ou 0,6 M en NaCl (25 µg, 50 µg, 75 µg), on ajoute 10 µl d'adénovirus marqué par un mélange d'acides aminés ¹⁴C, soit 7500 cpm. Le volume est ajusté à 1 ml par addition de P.B.S.

Une série de tubes ne contient pas de "récepteur" et sert de témoin d'adsorption maximale du virus sur les cellules KB.

Une dernière série de tubes contient, à la place de l'éluat, 50 µg de protéines de membrane extraites au D.O.C. 0,5 %.

L'incubation "virus-protéines" se déroule à 4°C, pendant 2 heures.

4×10^7 cellules KB reprises dans 1 ml de P.B.S. sont ensuite ajoutées dans chacun des tubes. L'adsorption du virus sur les cellules KB a lieu à 37°C, sous agitation.

A différents temps 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes, on prélève un tube de chaque série. Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 2000 tours/minute et le surnageant de chaque tube réparti dans 4 fioles de comptage à raison de 500 µl par fiole. La radioactivité est comptée dans 8 ml de liquide de Bray, au compteur à scintillation.

3°) Analyse en gel de polyacrylamide dissociant.

Les pics exclu et élués du gel d'affinité sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dissociant, en plaque, selon la technique décrite page 103, après dilution au-demi dans un volume égal de tampon de dépôt de LAEMMLI (100).

Dans différents godets formés dans le gel d'espacement sont déposés :

- soit 20 μ l d'adénovirus type 2 témoin dont les polypeptides servent de marqueurs.
- soit 50 μ l de la fraction non adsorbée sur le gel, en NaCl 0,05 M.
- soit 50 μ l de la fraction éluée en NaCl 0,15 M.
- soit 50 μ l de la fraction éluée en NaCl 0,6 M.
- soit 40 μ l d'extrait de membranes D.O.C. 0,5 % de départ.

Après migration électrophorétique, le gel est mis en autoradiographie selon la méthode par fluorographie de BONNER et LASKEY (101).

II - / ESSAIS SUR LE BIOGEL DE POLYACRYLAMIDE P₃₀₀ /

A - MODELE CHROMATOGRAPHIQUE

Sur un gel de polyacrylamide P₃₀₀ activé au glutaraldéhyde on fixe des immunoglobulines anti-base du penton préparées chez le lapin. On met ensuite en contact avec du penton d'adénovirus type 2, les immunoglobulines fixées sur le gel retiennent préférentiellement l'extrémité base du penton, la fibre reste dirigée vers l'extérieur comme l'indique la figure 6.

Si l'on fait passer sur le gel ainsi préparé un extrait de membranes de cellules KB, seules les protéines possédant une affinité pour la fibre s'adsorbent sur le gel, on les élue par simple abaissement de pH.

B - PREPARATION DU GEL

1°) Structure du Biogel de polyacrylamide.

INMAN et DINTZIS (102) ont introduit les premiers dérivés de polyacrylamide utilisables en chromatographie d'affinité. Les gels de

polyacrylamide synthétiques sont disponibles commercialement chez Bio Rad ; ils se présentent sous forme de billes ayant une taille et une porosité déterminées.

Les stabilités physique et chimique sont supérieures à celles de l'agarose, ils supportent des pH compris entre 2 et 11 et peuvent être traités par un grand nombre de solvants organiques. Ils possèdent, en outre, un très grand nombre de groupements modifiables, carboxamide, qui sont responsables du caractère hydrophile et de la faible adsorption non spécifique des macromolécules sur ce support.

C'est le Biogel P₃₀₀ que nous utilisons, la taille des grains varie de 100 à 200 mesh et la limite d'exclusion, calculée pour des protéines globulaires, est de 400.000 daltons.

2°) Activation du Biogel de polyacrylamide par le glutaraldéhyde.

WESTON et AVRAMEAS (103) ont mis au point une technique d'activation des immunoadsorbants par le glutaraldéhyde, modifiée par la suite par TERNINCK et AVRAMEAS (104).

5 grammes de Biogel de polyacrylamide P₃₀₀ sont mis à gonfler dans 500 ml d'eau distillée, à température ambiante pendant une nuit, puis lavés sur verre fritté par trois volumes d'eau distillée. Le volume de gel gonflé obtenu est de 25 ml par g de Biogel P₃₀₀. Le gel gonflé et lavé peut être conservé dans l'eau distillée à 4°C, en présence d'azide de sodium 0,1 ‰.

A 100 ml de gel hydraté, on ajoute 500 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 6 % dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7, faite à partir de la solution de glutaraldéhyde commerciale de 25 % (Merck). La suspension est incubée sous faible agitation dans une étuve à 37°C durant une nuit.

Le gel activé est ensuite lavé sur verre fritté par 20 fois 500 ml d'eau distillée. Il est recommandé de ne pas stocker le gel sous cette forme plus d'une semaine à 4°C.

3°) Fixation des immunoglobulines anti-base du penton.

a) Préparation des immunoglobulines :

On injecte à un lapin, par voie intradermique, de la base du penton d'adénovirus type 2, quatre fois de suite, à dix jours d'intervalle; la base du penton ayant été purifiée préalablement sur gel de polyacrylamide en milieu urée.

Lorsque les immunoglobulines anti-base du penton sont synthétisées, 20 ml du sang du lapin sont prélevés dans des tubes à hémolyse préalablement rincés avec du sérum physiologique. Après rétraction du caillot à 37°C pendant trois heures, le sérum est recueilli par centrifugation à 3000 tours/minute, 10 minutes.

Les immunoglobulines sont purifiées par précipitation en sulfate d'ammonium à 33 % de saturation, une nuit, à 4°C. Après centrifugation à 5000 tours/minute pendant 15 minutes, le précipité d'immunoglobulines est repris dans 5 ml de P.B.S. et dialysé 24 heures à 4°C contre du P.B.S. pour éliminer toute trace de sulfate d'ammonium.

Un dosage de Lowry, après dialyse, nous permet de connaître la concentration en immunoglobulines ; elle est de 25 mg/ml soit 200 mg dans un volume final de 8 ml.

b) Fixation des immunoglobulines anti-base du penton sur le Biogel P₃₀₀ activé.

A 10 ml de Biogel P₃₀₀ activé au glutaraldéhyde, on ajoute 1,2 ml, soit 30 mg d'immunoglobulines anti-base du penton, dilué dans 10 ml de P.B.S. On laisse adsorber durant un week-end, à 4°C, sous faible agitation.

Le surnageant est recueilli par centrifugation à 5000 tours/minute pendant 10 minutes. Plusieurs lavages sont ensuite effectués par 10 ml de P.B.S. jusqu'au retour à 0 de la densité optique lue à 280 nm.

Un dosage de Lowry effectué sur le surnageant d'adsorption et les lavages nous permet de connaître la quantité d'immunoglobulines anti-base du penton fixée sur le Biogel ; elle est de 25 mg pour 10 ml de P₃₀₀ activé.

c) Blocage à la lysine des groupements aldéhydiques libres.

Il est possible que des groupements aldéhydiques du glutaraldéhyde restent actifs, n'ayant pas réagi avec les immunoglobulines. Lors de l'étape suivante, pour éviter que le penton ne se fixe sur l'un de ces groupements aldéhydiques et non sur les immunoglobulines de lapin, on les inactive en effectuant un blocage par la lysine.

Après fixation des immunoglobulines antibase du penton, à 10 ml de Biogel P₃₀₀, on ajoute 10 ml de lysine 0,1 M pH 7,4. On laisse à température ambiante, pendant 18 heures.

Le gel est ensuite lavé par 2 volumes de P.B.S., puis 2 fois 50 ml de tampon glyco-colle 0,2 M amené à pH 2,8 par du HCl 1 N, 1 fois 20 ml de tampon phosphate bipotassique 0,2 M et enfin par 2 volumes de P.B.S.

4°) Couplage du penton sur les immunoglobulines anti-base du penton.

- Le penton est purifié comme la fibre, selon la technique décrite précédemment, à partir d'un surnageant d'ultracentrifugation préparative d'adénovirus type 2, précipité au sulfate d'ammonium à 55 % de saturation, puis chromatographié sur colonne de DEAE-Sephadex, résine échangeuse d'ions, équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 6,8.

Alors que l'antigène fibre passe dans le pic exclu, le penton est retenu sur la résine et s'élué à la concentration de 0,1 M en chlorure de sodium, lors du passage d'un gradient en NaCl dont les concentrations varient de 0,05 M à 0,5 M.

- A 10 ml de "Biogel P₃₀₀-immunoglobulines anti-base du penton", on ajoute 20 mg de penton purifié sur colonne de DEAE-Sephadex. On laisse adsorber à 4°C, pendant une nuit. Le surnageant est recueilli après 10 minutes de centrifugation à 5000 tours/minute et le gel lavé par 2 fois 10 ml de P.B.S.

Un dosage de Lowry effectué sur le surnageant et les lavages nous permet de calculer la quantité de penton fixée sur les immuno-

Modèle chromatographique du penton-immunoadsorbant

- a) Couplage des anticorps anti-base du penton (Ig B P) de l'adénovirus type 2 sur des billes de Biogel de polyacrylamide P₃₀₀ (PAA).
- b) Fixation du penton (P) sur le Biogel - anticorps anti-base du penton (B P = base du penton ; F = fibre).
- c) Chromatographie d'affinité sur l'immunoadsorbant d'un extrait de protéines de membrane de cellules KB (Mb).
- d) Elution (E) d'un récepteur cellulaire (RC) en milieu acide.

Modèle chromatographique du penton-immunoadsorbant

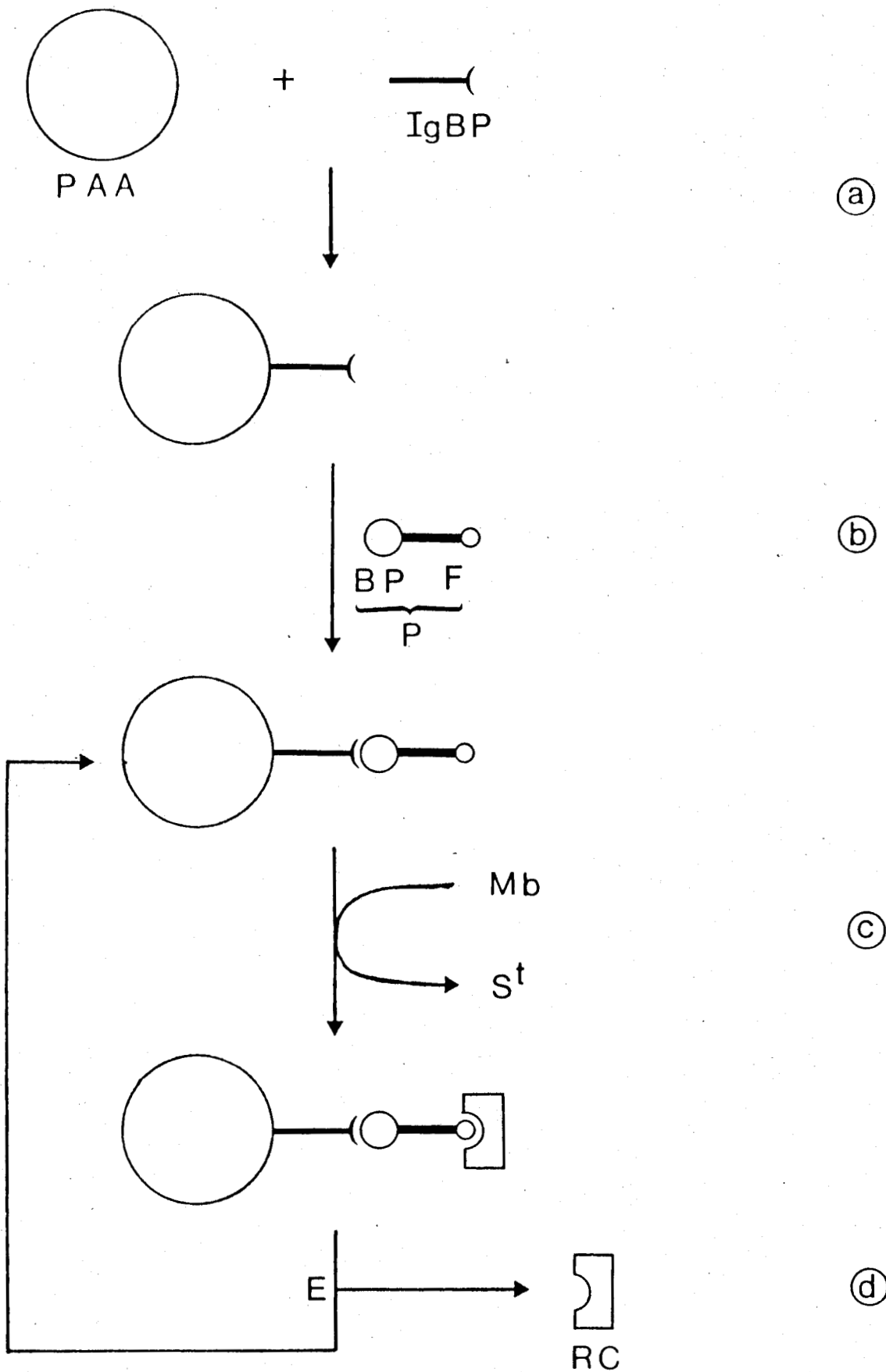


FIGURE N° 6



globulines ; elle est de 5 mg pour 10 ml de Biogel couplé aux immunoglobulines.

5°) Fixation-Pontage du "Biogel-Immunoglobulines anti base du penton - penton".

Après adsorption du penton, il est nécessaire de maintenir les structures établies, en fixant le gel obtenu par dispersion sous agitation dans 250 ml de glutaraldéhyde 2,5 % en tampon Hépès 0,1 M pH 7,4, pendant une heure à 4°C.

Les groupements aldéhydiques restés libres sont bloqués par addition de 25 ml de lysine 1 M pH 7,4, ce qui amène la concentration finale en lysine à 0,1 M. On laisse incuber à température ambiante pendant 18 heures puis le gel est rincé par 4 volumes de P.B.S.

C - CONTROLE DE L'EFFICACITE DE L'IMMUNOADSORBANT

Si l'immunoabsorbant a bien fixé les fibres en position adéquate, c'est-à-dire leurs extrémités distales libres et accessibles, ce gel doit en principe fixer les anticorps d'un immunosérum anti-fibre.

1°) Immunoabsorption sur le gel d'un immunosérum anti-fibre.

Sur 2 ml de "Biogel-immunoglobulines anti-base du penton-penton", on adsorbe 0,5 ml, soit 27 mg d'immunosérum anti-fibre type 2 dilué au 1/4 dans 1,5 ml de P.B.S. L'adsorption se déroule à 4°C, sous faible agitation, pendant une nuit.

Le surnageant est recueilli après centrifugation à 7000 tours/minute pendant 15 minutes et le gel lavé par 4 volumes de P.B.S. La quantité d'immunoglobulines anti-fibre fixée sur le gel est de 1,5 mg ; on la détermine par différence après dosage de protéines sur le surnageant et les deux premiers rinçages. L'éluion est effectuée par 2 ml de tampon glycolle-HCl 0,2 M pH 2,8/NaCl 1 M, pendant une heure, à 4°C, sous agitation. L'éluat est dialysé une nuit contre du P.B.S.

2°) Test d'immunoprécipitation en présence de fibre.

Dans une première série de tubes à hémolyse, 10 μg d'éluat sont incubés en présence de 20 μg de fibre marquée à la leucine ^3H , soit 20.000 cpm.

Une deuxième série, où l'éluat est remplacé par 10 μg d'immunsérum anti-fibre, sert de témoin d'immunoprécipitation spécifique.

Dans une dernière série, témoin des immunoprécipitations non spécifiques, la fibre est incubée en présence de 10 μg d'immunsérum de lapin anti-globulines de rat.

Dans chaque tube, on ajoute 100 μg de sérumalbumine bovine comme entraîneur. Le volume final est ajusté à 500 μl par addition de P.B.S. L'incubation se déroule à 37°C pendant 3 heures.

Le complexe "antigène*-anticorps" formé est filtré sur fibre de verre, rincé par 5 fois 5 ml de P.B.S. à 4°C, puis compté dans 5 ml de liquide de scintillation à base de toluène.

D - ISOLEMENT D'UNE PROTEINE DE MEMBRANE

1°) Extraction des protéines de membrane de cellules KB.

Les membranes de cellules KB, doublement marquées aux acides aminés ^{14}C et à la glucosamine ^3H , sont séparées sur gradient discontinu de sucrose, selon la technique décrite page 99 .

Différents procédés d'extraction de protéines de membrane, par les détergents ont été essayés.

- Lors de l'extraction au Fréon 113, les lipides sont éliminés dans la phase inférieure organique. Cette méthode est rapide mais très drastique et certaines protéines peuvent être dénaturées ou rester piégées dans le précipité présent à l'interphase.

- Avec le Triton X₁₀₀ 0,25 %, l'extraction est satisfaisante les protéines ne sont pas dégradées. Cependant, bien qu'ayant l'avantage d'être un détergent non ionique, le Triton a l'inconvénient de se dialyser très difficilement.

- L'extraction au désoxycholate de sodium 0,5 % est la méthode la plus douce, c'est celle que nous retiendrons.

De plus nous utilisons la fraction dialysable du D.O.C., il s'élimine donc facilement, par la suite, par simple dialyse contre du P.B.S. à 4°C pendant 48 heures.

2°) Immunoabsorption sur le gel d'un extrait de protéines de membrane.

L'extrait de protéines de membrane de cellules KB, obtenu par traitement au D.O.C. 0,5 %, sous un volume de 10 ml après dialyse contre du tampon borate de sodium 0,1 M pH 8,5/NaCl 1 M est adsorbé sur 10 ml de "Biogel-immunoglobulines anti-base du penton - penton" préalablement préparé, pendant une nuit à 4°C sous agitation. Le surnageant est recueilli par centrifugation à 6000 g, pendant 15 minutes et le Biogel rincé quatre fois en P.B.S.

L'éluat du Biogel est effectuée par 10 ml de tampon glycolle-HCl 0,2 M pH 2,8/NaCl 1 M, pendant 30 minutes, à 4°C, sous agitation. L'éluat est recueilli après centrifugation à 6000 g pendant 15 minutes, dialysé une nuit à 4°C contre de l'eau bidistillée, lyophilisé, puis repris dans 1 ml de P.B.S.

Le Biogel est ramené à pH 7,4 par de nombreux rinçages en P.B.S.

Sur une aliquote de chaque fraction (surnageant, lavages, éluat) on détermine le dosage de protéines et la radioactivité.

E - TESTS D'ACTIVITE DU "RECEPTEUR" ISOLE

1°) Adsorption virale sur les cellules KB.

a) En fonction de la quantité de "récepteur".

L'adsorption de l'adénovirus est étudiée sur les cellules KB en absence ou en présence de différentes quantités de "récepteur" isolé sur le Biogel P₃₀₀.

Dans des séries de tubes à hémolyse contenant différentes quantités de "récepteur" (1 μg , 2 μg , 4 μg , 5 μg , 7,5 μg , 10 μg , et 20 μg), on ajoute 10 μl d'adénovirus type 2 marqué à la thymidine ^{14}C , soit 4000 cpm. Le volume est ajusté à 1 ml par addition de P.B.S. Le taux de protéines est déterminé selon la méthode de Lowry. Une série de tubes ne contient pas de "récepteur" et sert de témoin de l'adsorption maximale du virus sur les cellules KB.

L'adénovirus est laissé en contact avec le "récepteur" pendant 2 heures à 4°C.

4×10^7 cellules KB reprises dans 1 ml de P.B.S. sont ensuite ajoutées dans chaque tube et le volume ajusté à 3 ml par addition d'1 ml de P.B.S. L'adsorption du virus sur les cellules KB se déroule à 20°C pendant 3 heures sous agitation.

Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 600 g et le surnageant de chaque tube réparti dans 6 fioles de comptage à raison de 500 μl par fiole. On compte, dans 10 ml de liquide de Bray, la radioactivité contenue dans le surnageant et correspondant au virus non adsorbé sur les cellules KB.

Pour contrôle, le culot de cellules KB, après un lavage en P.B.S., est repris dans 500 μl de P.B.S. additionné d'1 ml de Hyamine 10 X et laissé 24 heures à 37°C. L'homogénat de cellules obtenu est réparti dans 5 fioles de comptage à raison de 300 μl par fiole. La radioactivité est comptée dans 10 ml de liquide de Bray et correspond au virus adsorbé sur les membranes de cellules KB.

On considère que la radioactivité propre à la protéine isolée est trop faible (0,03 % pour 1 μg de "récepteur", 0,5 % pour 20 μg) pour interférer avec la radioactivité correspondant au virus.

b) En fonction du temps d'adsorption sur les cellules.

On fait une cinétique d'adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB en absence ou en présence de différentes concentrations de "récepteur".

Dans 3 séries de tubes à hémolyse contenant différentes quantités de "récepteur" (0 μg , 35 μg , 70 μg , 150 μg soit 0 μl , 50 μl , 100 μl , 150 μl), on ajoute 10 μl d'adénovirus type 2 marqué par un mélange d'acides aminés ^{14}C à raison de 7500 cpm/10 μl /56 μg . Le volume est ajusté à 1 ml par addition de P.B.S. La préincubation "virus-récepteur" se déroule pendant une heure à 20°C.

Dans un second temps, on ajoute dans chaque tube 4×10^7 cellules KB lavées dans du P.B.S. pour éliminer toute trace de milieu et reprises dans 1 ml de P.B.S. On laisse l'adsorption se dérouler sous agitation à 37°C.

A différents temps 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes, on prélève un tube de chaque série. Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 2000 tours/minute et le surnageant de chaque tube réparti dans 4 fioles de comptage à raison de 500 μl par fiole. La radioactivité est comptée dans 8 ml de liquide de Bray au compteur à scintillation.

Une série de tubes ne contient pas de "récepteur" et sert de témoin de l'adsorption virale sur les cellules KB.

Le témoin temps 0 correspond à 10 μl de virus dans 2 ml de P.B.S., sans addition de "récepteur", ni de cellules KB, réparti dans 4 fioles de comptage.

Dans une dernière série de tubes, le "récepteur" est remplacé par 50 μl , soit 67,5 μg d'extrait initial de protéines de membrane obtenu par traitement au D.O.C. 0,5 %. Ce témoin nous permet de comparer l'activité de l'extrait D.O.C. brut avant toute purification du "récepteur" par passage sur le gel immunoabsorbant, avec l'activité de ce "récepteur" élué du gel.

c) Après action d'un enzyme protéolytique sur le récepteur.

Le récepteur est préincubé une nuit à 37°C en présence de trypsine dont l'activité est ensuite inhibée à l'aide de diisopropyl-fluorophosphate. On compare alors le taux d'adsorption virale sur les cellules KB du virus seul, du virus préincubé avec le "récepteur", et enfin du virus préincubé avec un "récepteur" traité préalablement par la trypsine.

Dans une série de tubes à hémolyse, 25 μ l de récepteur, soit 17,5 μ g, sont traités par 50 μ l d'une solution de trypsine à 2 mg/ml de tampon Tris 0,1 M pH 8, soit 100 μ g d'enzyme. Le volume est ajusté à 1 ml par addition de 925 μ l de tampon Tris 0,1 M pH 8. L'incubation se déroule une nuit à 37°C à la suite de laquelle on ajoute 10 μ l d'une solution de diisopropylfluorophosphate à 1 % dans l'éthanol à 25 % pour arrêter la réaction.

Après inhibition de l'activité enzymatique, 10 μ l d'adénovirus type 2 marqué par un mélange d'acides aminés 14 C (7500 cpm/10 μ l) sont ajoutés au milieu réactionnel. L'incubation a lieu à 20°C pendant une heure.

Le témoin virus seul est obtenu en ajoutant à 1 ml de P.B.S. 10 μ l d'adénovirus marqué 14 C. L'incubation a lieu à 20°C pendant une heure.

Pour le témoin "virus-récepteur", à 25 μ l de "récepteur", soit 17,5 μ g, on ajoute 10 μ l d'adénovirus marqué 14 C. Le volume est ajusté à 1 ml par addition de 975 μ l de P.B.S. L'incubation se déroule de la même façon que précédemment.

Dans chaque série de tubes, témoins ou non, sont ajoutées 2×10^7 cellules KB reprises dans 1 ml de P.B.S. et l'adsorption du virus sur les cellules se déroule durant 90 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1500 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant contenant le virus non adsorbé est réparti dans 4 fioles de scintillation pour chaque tube, à raison de 500 μ l par fiole. Le comptage de la radioactivité est effectué au compteur à scintillation dans 8 ml de liquide de Bray.

2°) Adsorption virale sur les hématies de rat.

On fait une cinétique d'adsorption de l'adénovirus sur des érythrocytes de rat ou R.B.C. (Rat Blood Cell), en absence ou en présence de "récepteur".

Les érythrocytes sont obtenus en ponctionnant le sinus caverneux du rat à l'angle interne de l'oeil. Après centrifugation douce à 1000 tours/minute pendant 5 minutes pour éliminer le sérum, le culot

d'hématies est lavé par 20 ml de P.B.S. contenant 20 μ l d'héparine. 0,5 ml de culot de R.B.C. sont ensuite repris dans 3 ml de P.B.S. pour obtenir une dilution finale de 15 %.

Dans 3 séries de tubes à hémolyse contenant 10 μ l d'adénovirus type 2 marqué par un mélange d'acides aminés 14 C à raison de 7500 cpm/10 μ l, sont ajoutés :

- dans la première série 50 μ l, soit 35 μ g de "récepteur"
- dans la deuxième série 20 μ l, soit 30 μ g d'extrait brut de membranes de cellules KB
- dans la troisième série 1 ml de P.B.S., cette série servant de témoin de l'adsorption virale sur les hématies de rat.

Le volume est ajusté à 1 ml par addition de P.B.S. L'incubation "virus-protéines" se déroule pendant 1 heure à 20°C.

Dans un second temps 0,1 ml d'un culot d'hématies de rat à 15 % sont ajoutés dans chaque tube, ce qui amène la dilution finale en R.B.C. à 1,45 %. L'adsorption se déroule à 37°C sous agitation douce.

A différents temps, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes, on prélève un tube de chaque série. Les hématies de rat sont centrifugées à 1000 tours/minute pendant 5 minutes et le surnageant contenant le virus non adsorbé est précipité par l'acide trichloracétique (T.C.A.) à 10 % pendant 30 minutes à 0°C puis filtré sur filtre de fibre de verre. Le précipité est rincé par 5 fois 5 ml de T.C.A. 5 % et une fois 5 ml d'éthanol 95°. Les filtres sont ensuite séchés et la radioactivité comptée dans 5 ml de liquide scintillant à base de toluène.

3°) Etude du "récepteur" par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

La protéine obtenue après élution du gel immunoadsorbant en tampon glycoColle 0,2 M pH 2,8, et appelée "récepteur" d'après son activité, est analysée en gel de polyacrylamide en plaque, en milieu dissociant (lauryl sulfate de sodium) selon la technique décrite page 103.

Les échantillons à analyser sont dilués au-demi par addition d'un volume égal de tampon de dépôt de LAEMMLI (105), chauffés à 100°C pendant 3 minutes, puis déposés dans des godets formés dans le gel d'espacement :

- soit 50 μ l de la fraction non adsorbée sur le gel immuno-adsorbant
- soit 50 μ l de la fraction retenue sur le "Biogel-anti-base du penton-penton" et éluee en tampon glycolle - HCl 0,2M pH 2,8 / NaCl 1 M.

Après migration électrophorétique, le gel est mis en autoradiographie selon la méthode par fluorographie de BONNER et LASKEY (106).

RESULTATS

I - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR SEPHAROSE 4 B - FIBRE D'ADENOVIRUS

A - CONTROLE DE L'EFFICACITE DU GEL

Après fixation de la fibre citraconylée sur l'amino-Sepharose et réaction de décitraconylation, il est nécessaire, avant l'emploi, de vérifier que la fibre est orientée dans le bon sens, l'extrémité NH_2 dirigée vers l'extérieur, le gel doit alors être capable de retenir les anticorps d'un immunosérum monospécifique anti-fibre.

1°) Adsorption sur le gel d'un immunosérum anti-fibre.

Sur 4 ml de "fibre-amino-Sepharose", on adsorbe 1 ml d'immunosérum spécifique anti-fibre type 2, soit 55 mg de protéines totales, dilué au 1/4 dans du P.B.S. L'adsorption se déroule à 4°C pendant une nuit. Les protéines non adsorbées sont éliminées par centrifugation, le gel rincé plusieurs fois par du P.B.S., puis élué par 5 ml de tampon glyco-colle-HCl 0,2 M pH 4,5/NaCl 1 M pendant une heure à 4°C.

2°) Test d'immuno-précipitation.

Des tests d'immuno-précipitation sont effectués en présence de 250 μl de fibre d'adénovirus type 2 marquée à la méthionine ^{35}S (soit 30.000 cpm) sur 50 μl d'éluat dialysé contre du P.B.S. puis concentré, sur 50 μl de surnageant concentré, sur 50 μl d'immunosérum total de départ anti-fibre et sur 50 μl d'un immunosérum témoin de lapin antiglobulines de rat.

Après incubation pendant 3 heures à 37°C, le précipité $\text{Ag}^* - \text{Ac}$ formé est filtré et rincé sur fibre de verre, la radioactivité ^{35}S retenue sur le filtre est comptée dans 5 ml d'un liquide de scintillation à base de toluène.

La radioactivité représente le complexe "fibré* anticorps anti-fibre" formé lors de la réaction d'immuno-précipitation.

- Pour l'immunsérum total anti-fibre : 24 000 cpm soit 80 % de la radioactivité de départ.
- Pour l'éluat : 21 000 cpm soit 70 %.
- Pour le surnageant : 15 000 cpm soit 50 %.
- Pour l'immunsérum de lapin antiglobulines de rat : 3500 cpm soit 12 % représentant les immuno-précipitations non spécifiques.

L'éluat contient donc des anticorps anti-fibre car il donne à peu près le même pourcentage d'immuno-précipitation en présence de fibre qu'un immunsérum total anti-fibre. Dans le gel "fibre-amino-Sepharose", la fibre est bien orientée puisqu'elle est capable de retenir des anticorps monospécifiques anti-fibre d'adénovirus type 2.

B - EXTRACTION DES PROTEINES DE MEMBRANE PAR LE DESOXYCHOLATE DE SODIUM

Les cellules KB doublement marquées fucose ^3H et acides aminés ^{14}C sont homogénéisés dans du R.S.B. et fractionnés dans un premier temps sur gradient discontinu de sucrose. La fraction membranes-mitochondries, recueillie à l'interphase des concentrations en sucrose de 30 % et 50 %, est fractionnée par ultracentrifugation sur un deuxième gradient discontinu de sucrose. Les membranes cytoplasmiques, prélevées à l'interphase des concentrations en sucrose de 45 % et 55 % sont centrifugées et le culot repris dans 10 ml de P.B.S./désoxycholate de sodium 0,5 %.

La solubilisation des protéines de membrane par le détergent se déroule à 0°C pendant 30 minutes. Les protéines extraites par le D.O.C. se retrouvent dans le surnageant après centrifugation. Le D.O.C. est ensuite éliminé par dialyse contre du tampon borate de sodium 0,1 M pH 8,5/NaCl 0,5 M ; le volume final des protéines extraites est de 12 ml.

Un dosage de Lowry nous permet de calculer la quantité de protéines extraites par le D.O.C. en partant de 4 litres de cellules KB. Nous trouvons une concentration de 1,4 mg/ml soit un total de 16,5 mg de protéines.

La double radioactivité comptée sur une aliquote de 100 μ l dans 5 ml de liquide de Bray est de 40.000 cpm 14 C et de 17.500 cpm 3 H soit un total de $4,8 \cdot 10^6$ cpm 14 C et de $2,1 \cdot 10^6$ cpm 3 H dans 12 ml d'extrait D.O.C. 0,5 %. (cpm = coups par minute).

C - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

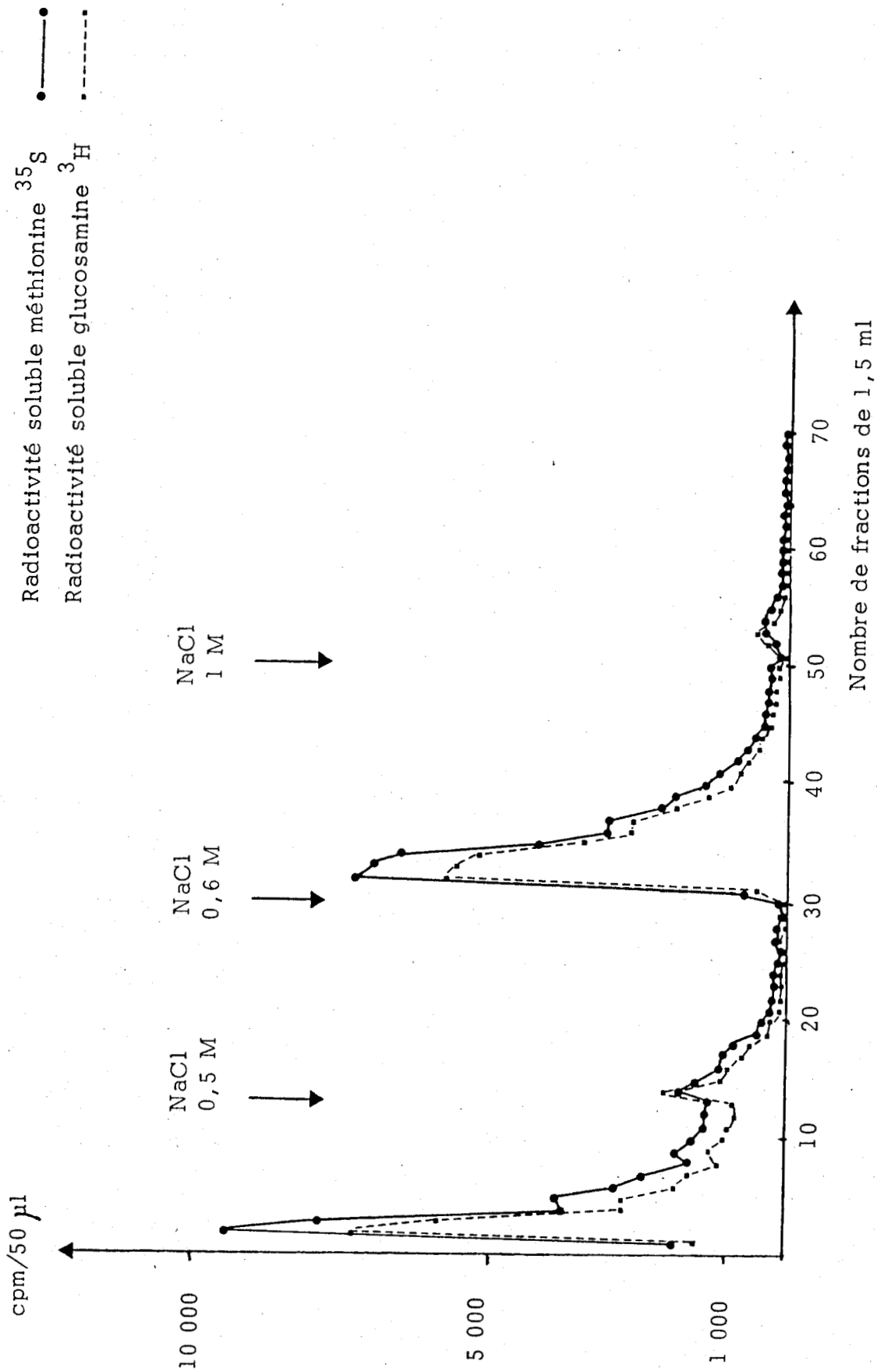
Sur une colonne de gel de "Sepharose-bras-fibre décitraconylée", préalablement préparé, nous déposons 2,5 ml d'un extrait D.O.C. 0,5 % de protéines de membrane, doublement marquées à la glucosamine 3 H et à la méthionine 35 S, et dialysées contre du tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,05 M. Le rinçage de la colonne est effectué par 20 ml de tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,15 M. La double radioactivité est comptée sur une aliquote de 50 μ l de chaque fraction de 1,5 ml, dans 5 ml de liquide de Bray. Un volume de 20 ml de tampon de rinçage est suffisant pour faire décroître la radioactivité jusqu'à 30 cpm de la ligne de base après sortie du pic exclu.

L'élution de la colonne est effectuée dans un premier temps par 20 ml de tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,6 M puis dans un second temps par 20 ml de tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 1 M. La résistivité et la radioactivité sont testées sur chaque fraction et le résultat représenté sur la figure 7.

Pour les doubles marquages, les fenêtres du compteur sont réglées de façon à avoir moins de 0,1 % de passage de la radioactivité 3 H dans le canal 14 C (35 S).

Un pic exclu, hétérogène, contenant des protéines doublement marquées à la glucosamine 3 H et à la méthionine 35 S, sort entre les fractions 2 et 12. Ces protéines ne sont pas retenues sur le gel et n'ont aucune affinité pour le ligand, donc pour la fibre.

FIGURE N° 7



Profil de la chromatographie d'affinité sur une colonne de "fibre-amino-Sepharose" d'un extrait de protéines de membrane de cellules KB.



Un deuxième pic, contenant des protéines doublement marquées, apparaît entre les fractions 13 et 20, lors du rinçage en tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,15 M.

Entre les fractions 30 et 45 sort le pic élué en tampon Tris 0,01 M pH 8/NaCl 0,6 M. Il correspond à des protéines doublement marquées à la glucosamine ^3H et à la méthionine ^{35}S . Ces glycoprotéines ont une affinité pour la fibre sur laquelle elles se fixent de façon spécifique et réversible et sont éluées par un changement de force ionique qui rompent les liaisons les retenant au ligand.

D - TESTS D'ACTIVITE DE LA PROTEINE ISOLEE

1°) Réaction d'immuno-précipitation en présence d'antigène fibre.

Des réactions d'immuno-précipitation sont effectuées en présence de 250 μl d'antigène fibre d'adénovirus type 2 marquée à la méthionine ^{35}S (soit 30.000 cpm), sur 100 μl d'éluat NaCl 0,6 M dialysé contre du P.B.S. Dans une série témoin l'éluat est remplacé par du P.B.S.

Après une préincubation pendant 1 heure à 20°C, 200 μl d'immunsérum monospécifique anti-fibre type 2 préparé chez le lapin sont ajoutés dans chaque tube et une nouvelle incubation a lieu à 37°C pendant 2 heures.

Dans une troisième série l'immunsérum anti-fibre est remplacé par un immunsérum de lapin antiglobulines de rat.

Le complexe "protéine-fibre*", formé lors de la première incubation, est précipité par l'immunsérum spécifique de la fibre lors de la deuxième incubation puis filtré sur filtre de fibre de verre et la radioactivité, retenue sur le filtre, comptée dans 5 ml d'un liquide de scintillation à base de toluène.

- Pour l'éluat NaCl 0,6 M 12.300 cpm sont précipités, soit 41 % de la radioactivité de départ.
- Pour l'immunsérum de lapin anti-fibre nous obtenons 27.900 cpm soit 83 % de la radioactivité de départ, représentant les immuno-précipitations spécifiques.

- Pour l'immunsérum de lapin antiglobulines de rat, 5700 cpm sont précipités soit 19 % de la radioactivité de départ, représentant les immuno-précipitations non spécifiques.

L'immuno-précipitation spécifique liée à la fibre est de 41 % - 19 % = 22 % pour l'éluat en NaCl 0,6 M.

2°) Cinétique d'adsorption virale sur les cellules KB.

Dans 5 séries de tubes à hémolyse, 10 μ l d'adénovirus type 2 marqué par un mélange d'acides aminés 14 C sont incubés sous un volume de 1 ml, pendant 2 heures à 4°C, en absence ou en présence de 25 μ g, 50 μ g ou 75 μ g d'éluat 0,6 M ou de 50 μ g de protéines de membrane extraites au D.O.C. 0,5 %.

4×10^7 cellules KB sont ajoutées dans chaque tube et l'adsorption du virus sur les cellules se déroule à 37°C pendant 15, 30, 45, 60, 90 ou 120 minutes. A ces différents temps un tube de chaque série est prélevé, centrifugé et la radioactivité du surnageant, réparti dans 4 fioles, est comptée dans 8 ml de liquide de Bray.

Les résultats sont reportés dans la figure 8.

L'adsorption de l'adénovirus, sans "récepteur", sur les cellules KB est rapide ; en 30 minutes, à 37°C, 75 à 80 % du virus est adsorbé sur les cellules, soit seulement 20 à 25 % d'inhibition d'adsorption.

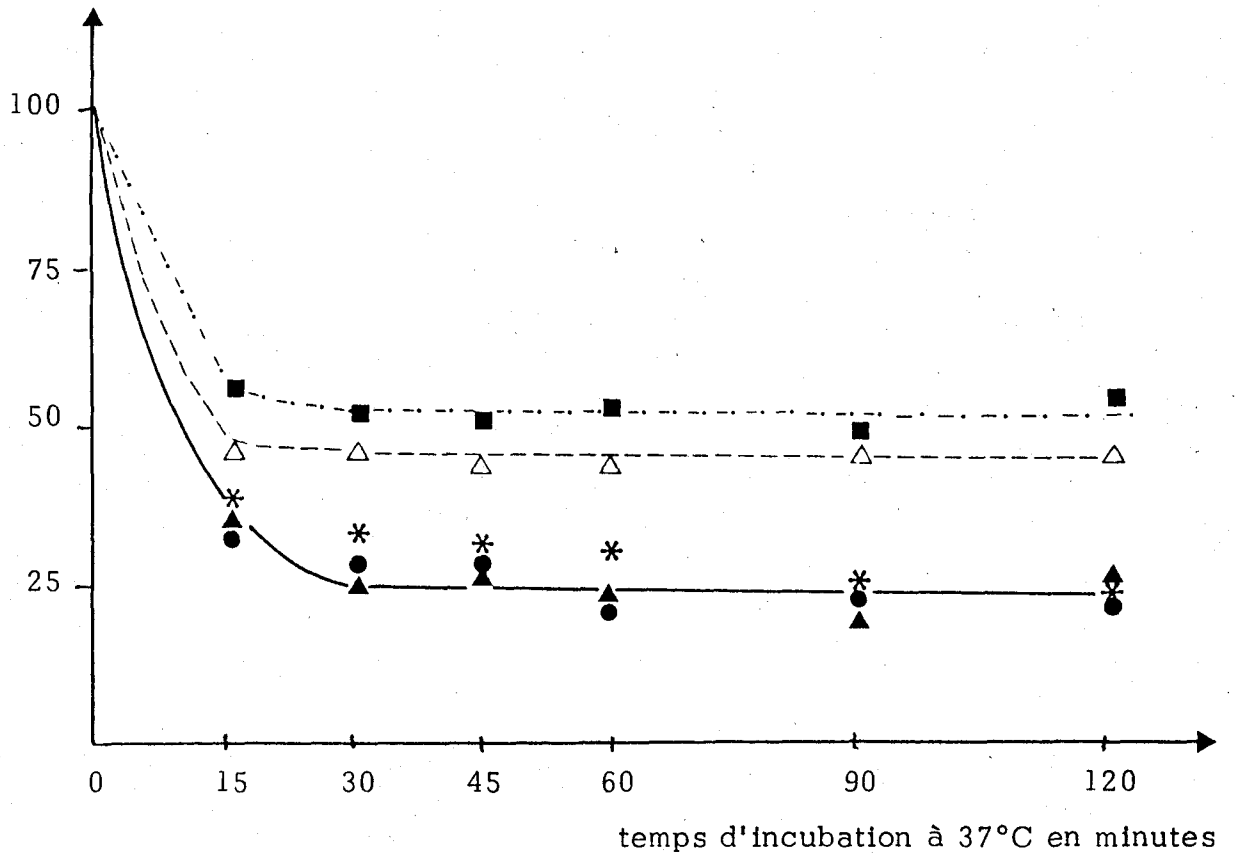
En présence de 25 μ g de "récepteur" ou de 50 μ g de protéines de membrane extraites au D.O.C., l'adsorption du virus sur les cellules ne varie pas.

Mais en présence de 50 μ g ou de 75 μ g de "récepteur", l'adsorption est inhibée. Cette inhibition d'adsorption est de 45 % et de 55 % respectivement en présence de 50 μ g et 75 μ g de "récepteur".

La chromatographie d'affinité sur "fibre-amino-Sepharose" de protéines de membrane extraites au D.O.C. 0,5 % a permis d'isoler une protéine inhibant l'adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB donc ayant une affinité pour ce virus.

FIGURE N° 8

% virus non adsorbé



Cinétiques d'adsorption virale sur les cellules KB en présence
de récepteur isolé sur "fibre-amino-Sepharose"

Les cinétiques d'adsorption de l'adénovirus type 2, marqué ¹⁴C, sur les cellules KB sont étudiées en absence (●—●) ou en présence de quantités croissantes de récepteur cellulaire obtenu par chromatographie d'affinité sur "fibre-amino-Sepharose" d'un extrait de protéines de membrane de cellules KB.

- * — * Virus préincubé avec 25 µg de récepteur cellulaire.
- △ — — — △ Virus préincubé avec 50 µg de récepteur cellulaire.
- · · · · ■ Virus préincubé avec 75 µg de récepteur cellulaire.
- ▲ — — — ▲ Cinétique d'adsorption obtenue en présence de 50 µg d'extrait brut de protéines de membrane.



3°) Analyse en gel de polyacrylamide dissociant.

Les différentes fractions de la chromatographie d'affinité sur "fibre-amino-Sepharose" sont analysées sur gel de polyacrylamide en plaque, en milieu S.D.S. Les résultats sont représentés dans la figure 16 (pistes a à e). Les masses moléculaires des différents polypeptides sont calculées selon leur position par rapport aux polypeptides marqueurs de l'adénovirus type 2 (piste a).

La fraction non adsorbée sur le gel d'affinité et éluée en NaCl 0,05 M est très hétérogène et comprend de nombreux polypeptides de poids moléculaires variables (piste b).

Les fractions retenues sur le gel et éluée avec le tampon de rinçage NaCl 0,15 M (piste c) ou avec le tampon d'élution NaCl 0,6 M (piste d) ne présentent pas de différences au point de vue composition polypeptidique bien que les rapports stochiométriques ne soient pas les mêmes. La composition en polypeptides de ces deux fractions est très complexe, les poids moléculaires varient de 100.000 à 25.000, cependant on peut distinguer six classes majeures de polypeptides dont les masses moléculaires respectives sont de 78.000, 74.000, 55.000, 42.000, 40.000 et 34.000.

II - ISOLEMENT SUR LE BIOGEL DE POLYACRYLAMIDE P₃₀₀
IMMUNOADSORBANT

A - TEMOIN D'ADSORPTION SUR LE GEL D'UN IMMUNSERUM
ANTI-FIBRE

25 mg d'immunoglobulines anti-base du penton ont été fixées sur 10 ml de gel de polyacrylamide. Dans un second temps, 5 mg d'antigène penton sont couplés sur les immunoglobulines par leur extrémité base du penton, laissant libre l'extrémité fibre du penton.

Il est nécessaire, avant l'emploi, de tester le gel ainsi préparé. Si le modèle chromatographique est bien réalisé, la fibre, étant dirigée vers l'extérieur, doit être capable de retenir les anticorps d'un immunosérum anti-fibre.

1°) Adsorption sur le gel d'un immunosérum anti-fibre.

Sur 2 ml de "gel-immunoglobulines anti-base de penton-penton", on adsorbe 0,5 ml d'immunosérum spécifique anti-fibre type 2 dilué au 1/4 dans du P.B.S., soit 27 mg de protéines totales.

L'adsorption se déroule à 4°C pendant une nuit. Après élimination, par centrifugation, des protéines non adsorbées et plusieurs lavages du gel en P.B.S., nous éluons par 2 ml de tampon glycolle 0,2 M pH 2,8/NaCl, pendant 1 heure à 4°C.

2°) Tests d'immuno-précipitation.

Des tests d'immuno-précipitation en présence de fibre sont effectués.

100 µl, soit 20 µg, de fibre d'adénovirus type 2 marquée à la leucine ³H, à raison de 20.000 cpm/100 µl, sont incubés 3 heures à 37°C en présence :

- soit de 10 µg de protéines de l'immunosérum de départ anti-fibre type 2,
- soit de 10 µg de protéines de l'éluat dialysé contre du P.B.S.,
- soit de 10 µg de protéines d'un immunosérum témoin de lapin antiglobulines de rat.

L'incubation est réalisée pendant 2 heures à 37°C. Le précipité antigène* - anticorps formé est filtré et lavé sur filtre de fibre de verre et la radioactivité ³H comptée dans 5 ml de liquide de scintillation à base de toluène.

La radioactivité retenue sur le filtre correspond à la fibre marquée liée à l'anticorps anti-fibre, ce qui peut nous donner une idée de la quantité de complexe Ag - Ac formé lors de la réaction d'immuno-précipitation. La moyenne de plusieurs expériences nous donne :

- Pour l'immunosérum total anti-fibre: 16.000 cpm soit 80 % de la radioactivité de départ.

- Pour l'éluat: 17.500 cpm soit 87,5 % de la radioactivité de départ.
- Pour l'immunsérum de lapin antiglobulines de rat: 2000 cpm soit 10 % représentant les immuno-précipitations non spécifiques.

Le pourcentage d'immuno-précipitation obtenu pour l'éluat est supérieur à celui obtenu avec l'immunsérum anti-fibre de départ ce qui voudrait dire que les anticorps anti-fibre de l'immunsérum se sont concentrés lors du passage sur le gel en se couplant spécifiquement sur la fibre.

La technique de préparation du gel immuno-adsorbant a donc eu pour résultat d'orienter la fibre, vers l'extérieur, lui permettant de retenir des protéines cellulaires ayant une affinité pour elle.

B - ADSORPTION SUR LE GEL D'UN EXTRAIT DE PROTEINES DE MEMBRANE

1°) Extraction des protéines de membrane.

L'adsorption se faisant en milieu isotonique P.B.S., l'extrait brut de protéines de membrane, obtenu par action du désoxycholate de sodium, est d'abord dialysé contre ce même tampon.

2°) Immuno-adsorption sur le gel d'un extrait de protéines de membrane.

Sous un volume de 10 ml de P.B.S., 15 mg de protéines de membrane de cellules KB doublement marquées aux acides aminés ^{14}C et à la glucosamine ^3H , solubilisées par le D.O.C. 0,5 %, sont adsorbés sur 10 ml de "Biogel P₃₀₀-immunoglobulines anti-base du penton-penton", pendant une nuit à 4°C, sous agitation.

Après élimination du surnageant par centrifugation et plusieurs lavages en P.B.S., le Biogel est élué par 10 ml de tampon glyco-colle 0,2 M pH 2,8/NaCl 1 M, pendant 30 minutes à 4°C, sous agitation. L'éluat est recueilli par centrifugation; dialysé contre de l'eau

distillée et lyophilisé. La poudre obtenue après lyophilisation est reprise dans 1 ml de P.B.S.

Le taux de protéines obtenues est de 100 μg et la radioactivité totale très faible (1100 cpm/1 ml) donc négligeable par rapport à la radioactivité apportée par le virus lors des tests ultérieurs.

C - TESTS D'ACTIVITE SUR LE RECEPTEUR

1°) Adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB.

a) En fonction de la quantité de récepteur :

Dans plusieurs séries de tubes à hémolyse, 10 μl d'adénovirus type 2 marqué à la thymidine ^{14}C à raison de 4 000 cpm/10 μl /14 μg , sont incubés en présence de 0 μg , 1 μg , 2 μg , 4 μg , 5 μg , 7,5 μg , 10 μg ou 20 μg de "récepteur". L'incubation se fait sous un volume de 1 ml, à 4°C pendant 2 heures.

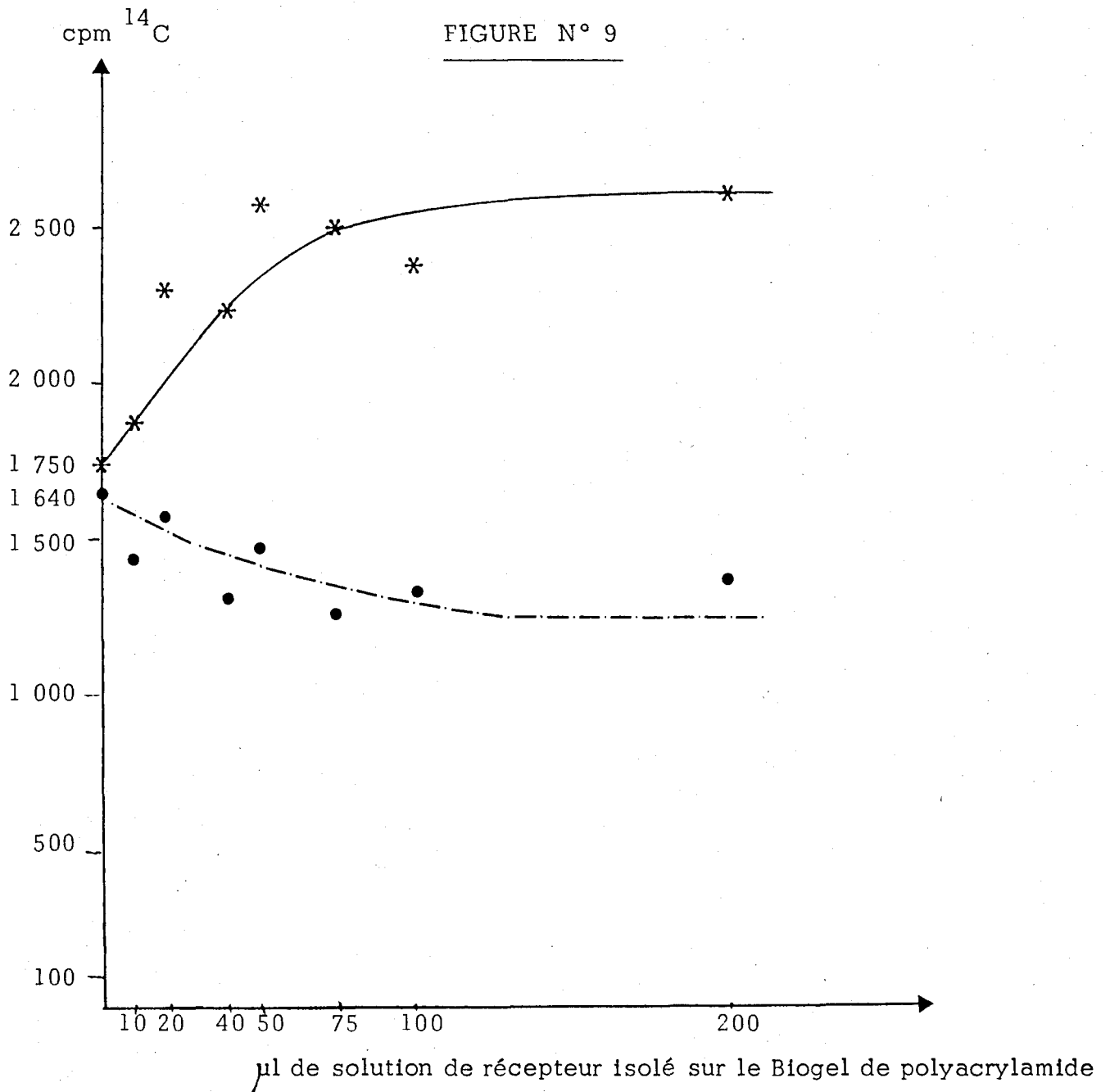
4 x 10⁷ cellules KB reprises dans 2 ml de P.B.S. sont ensuite ajoutées dans chaque tube et on laisse l'adsorption du virus sur les cellules se dérouler pendant 3 heures, à 37°C, sous agitation.

Le surnageant contenant les particules virales non adsorbées sur les cellules KB est recueilli par centrifugation et réparti dans 6 fioles à scintillation. La radioactivité est déterminée par dissolution de l'échantillon dans 10 ml de liquide de Bray.

Pour contrôle, le culot de cellules contenant le virus adsorbé sur les membranes est dissous dans 500 μl de P.B.S. et 1 ml de Hyamine 10 X, pendant 24 heures à 37°C. L'homogénat est réparti dans 5 fioles et la radioactivité comptée dans 10 ml de liquide de Bray.

Le résultat est représenté par la figure 9.

La quantité de virus non adsorbé sur les cellules croft en fonction de la concentration en "récepteur". Le plateau est atteint pour des valeurs situées entre 50 μl et 75 μl soit de 5 μg à 7,5 μg de récepteur.



Activité sur l'adsorption virale du récepteur cellulaire isolé du
Biogel immunoabsorbant

L'adsorption de l'adénovirus type 2, marqué ¹⁴C, sur les cellules KB est étudiée en présence de quantités croissantes de récepteur cellulaire isolé sur Biogel immunoabsorbant.

- * ——— * Radioactivité retrouvée dans le surnageant après adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB et correspondant au virus non adsorbé.
- - - - - • Radioactivité retrouvée dans le culot cellulaire et correspondant au virus adsorbé sur les cellules.



La courbe représentant le virus adsorbé sur les membranes de cellules KB est complémentaire de la première et décroît pour atteindre un minimum entre 50 μ l et 75 μ l de solution de "récepteur".

Le "récepteur membranaire" préincubé avec le virus, bloque les fibres et empêche l'attachement ultérieur de l'adénovirus sur les cellules KB. On assiste à un phénomène d'inhibition d'adsorption du virus sur les cellules KB en présence de "récepteur".

b) Cinétique d'adsorption sur les cellules :

Une cinétique de l'adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB est effectuée en présence de différentes quantités de "récepteur".

Dans quatre séries de tubes à hémolyse, 10 μ l d'adénovirus type 2 marqué par un mélange d'acides aminés 14 C sont incubés en présence de 0 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l d'une solution de "récepteur" à 100 μ g/ml sous un volume de 1 ml de P.B.S., pendant 30 minutes à 4°C.

Dans une série témoin, 10 μ l de virus sont incubés dans les mêmes conditions, en présence de 50 μ l soit 67,5 μ g d'extrait brut de protéines de membrane.

Dans un second temps, on ajoute dans chaque tube 4×10^7 cellules KB reprises dans 1 ml de P.B.S. L'adsorption du virus sur les cellules a lieu à 37°C sous agitation ; elle est arrêtée à différents temps, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes, en prélevant un tube de chaque série que l'on centrifuge. Le surnageant contenant le virus non adsorbé est réparti dans 4 fioles et la radioactivité comptée dans 8 ml de liquide de Bray.

Les résultats sont reportés dans la figure 10.

D'après les courbes, l'adsorption du virus sur les cellules est rapide ; 78 % de la radioactivité est adsorbée en 30 minutes à 37°C, ce qui représente une constante d'adsorption de $12,8 \times 10^{-3}$ /ml/minute.

D'autre part, l'adsorption est inhibée en présence de "récepteur", le pourcentage d'inhibition atteint un maximum de 90 % pour 150 μ l, soit 15 μ g de "récepteur", d'où une constante d'adsorption de 6,4, 3,1 et $1,1 \times 10^{-3}$ /ml/minute pour des quantités respectives de protéines

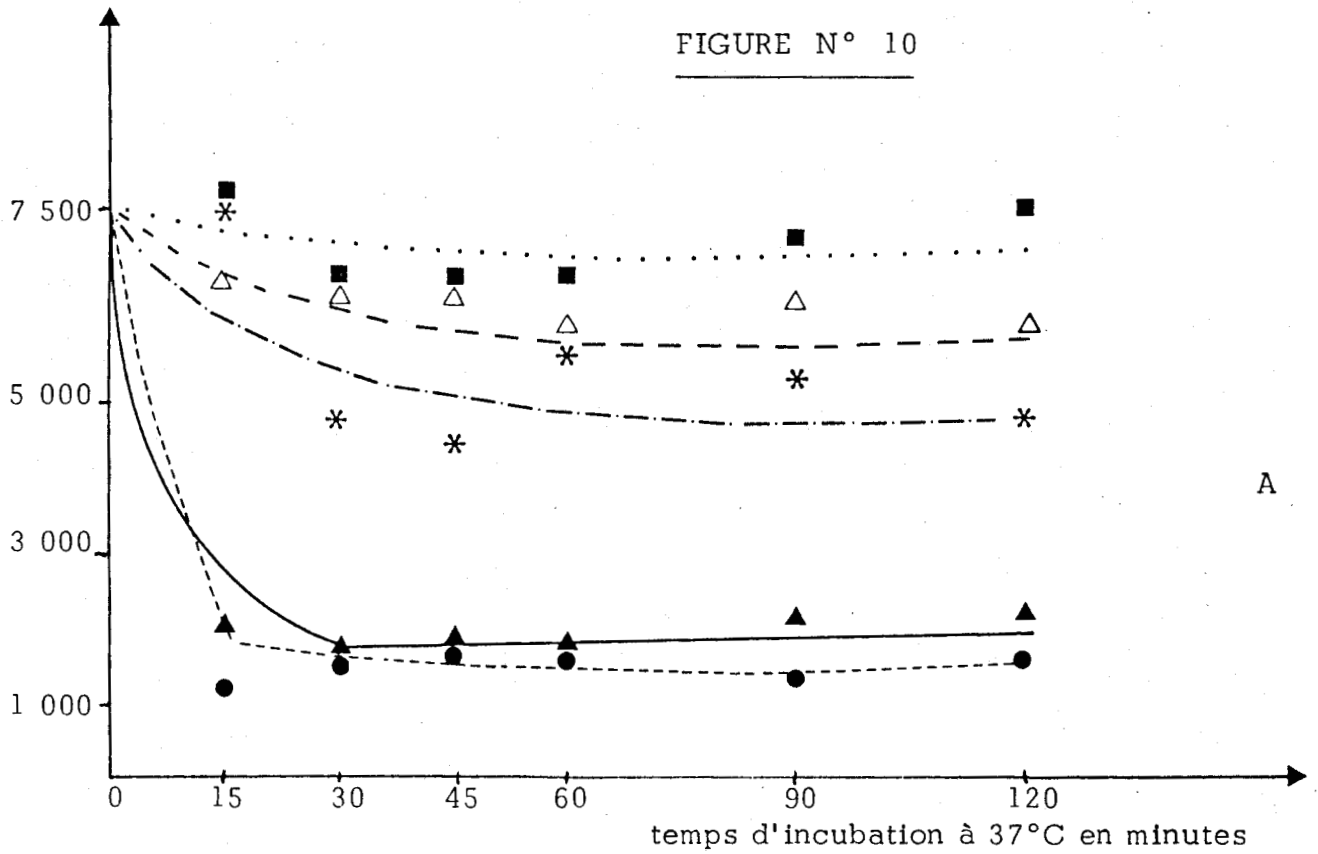
Cinétiques d'adsorption virale sur les cellules KB en présence de
récepteur isolé sur immunoadsorbant

Les cinétiques d'adsorption de l'adénovirus type 2, marqué ^{14}C , sur les cellules KB sont étudiées en absence (●-----●) ou en présence de quantités croissantes de récepteur cellulaire obtenu par chromatographie d'affinité sur immunoadsorbant d'un extrait de protéines de membrane de cellules KB.

- *—* Virus préincubé avec 5 μg de récepteur cellulaire.
- △---△ Virus préincubé avec 10 μg de récepteur cellulaire.
- Virus préincubé avec 15 μg de récepteur cellulaire.
- ▲——▲ Cinétique d'adsorption obtenue en présence de 50 μg d'extrait brut de protéines de membrane.

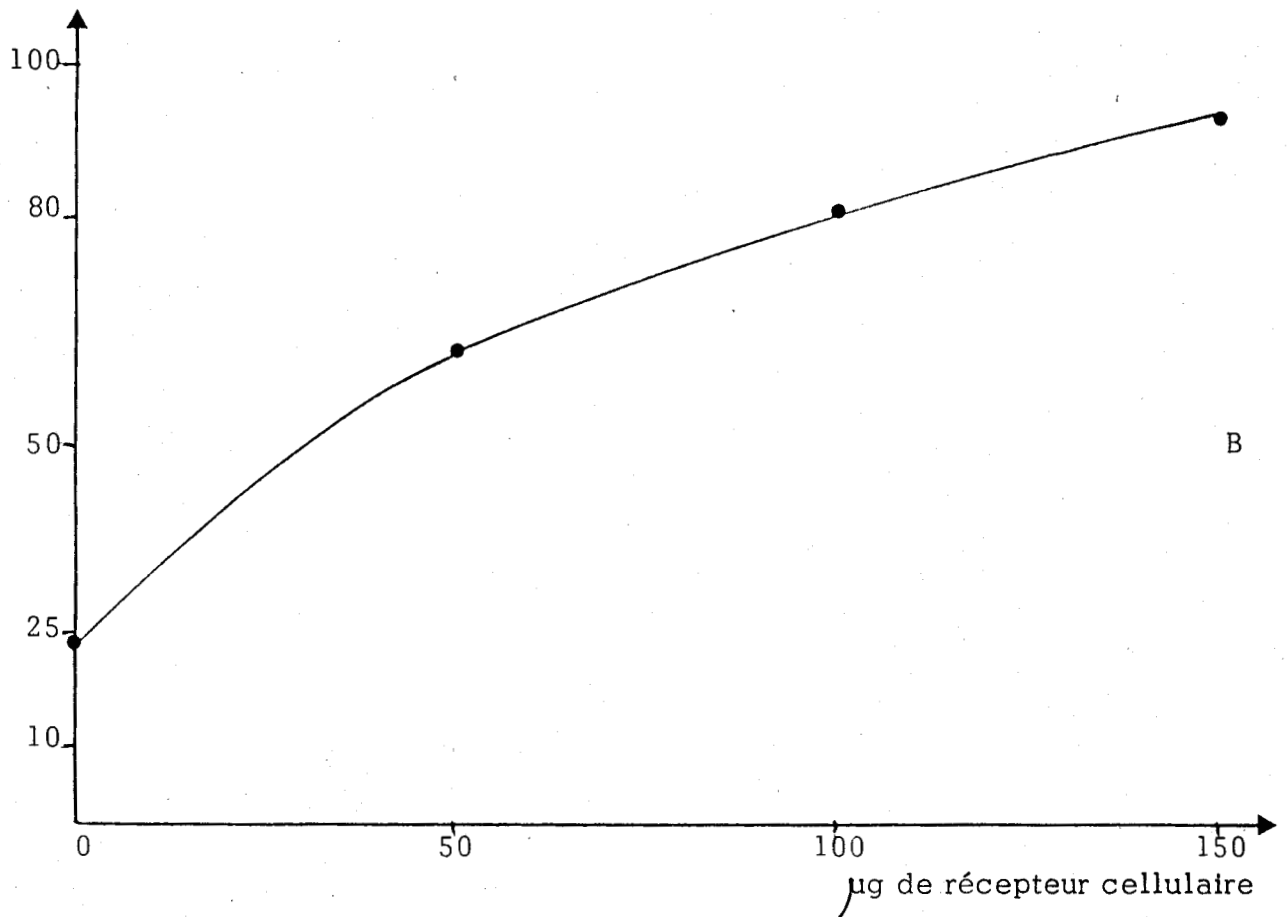
cpm ^{14}C virus non adsorbé

FIGURE N° 10



A

% d'inhibition d'adsorption



B

A - Cinétiques d'adsorption virale sur les cellules KB en présence de récepteur isolé sur immunoabsorbant



B - Inhibition de l'adsorption virale en fonction de la concentration en récepteur

éluées de 5 μg , 10 μg et 15 μg .

La cinétique d'adsorption, effectuée après incubation du virus en présence de 67,5 μg d'extrait brut de protéines de membrane ne présente pas de différence avec celle du témoin virus sans "récepteur". Le passage de cet extrait sur le Biogel a permis d'isoler une protéine inhibant l'adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB.

c) Nature protéique du "récepteur": Adsorption virale après action de protéase sur le "récepteur":

25 μl de solution de "récepteur", soit 17,5 μg de protéines, sous un volume de 1 ml, sont traités par un enzyme protéolytique, la trypsine, pendant une nuit à 37°C; un inhibiteur spécifique de l'enzyme (le diisopropylfluorophosphate) permet d'arrêter la réaction enzymatique.

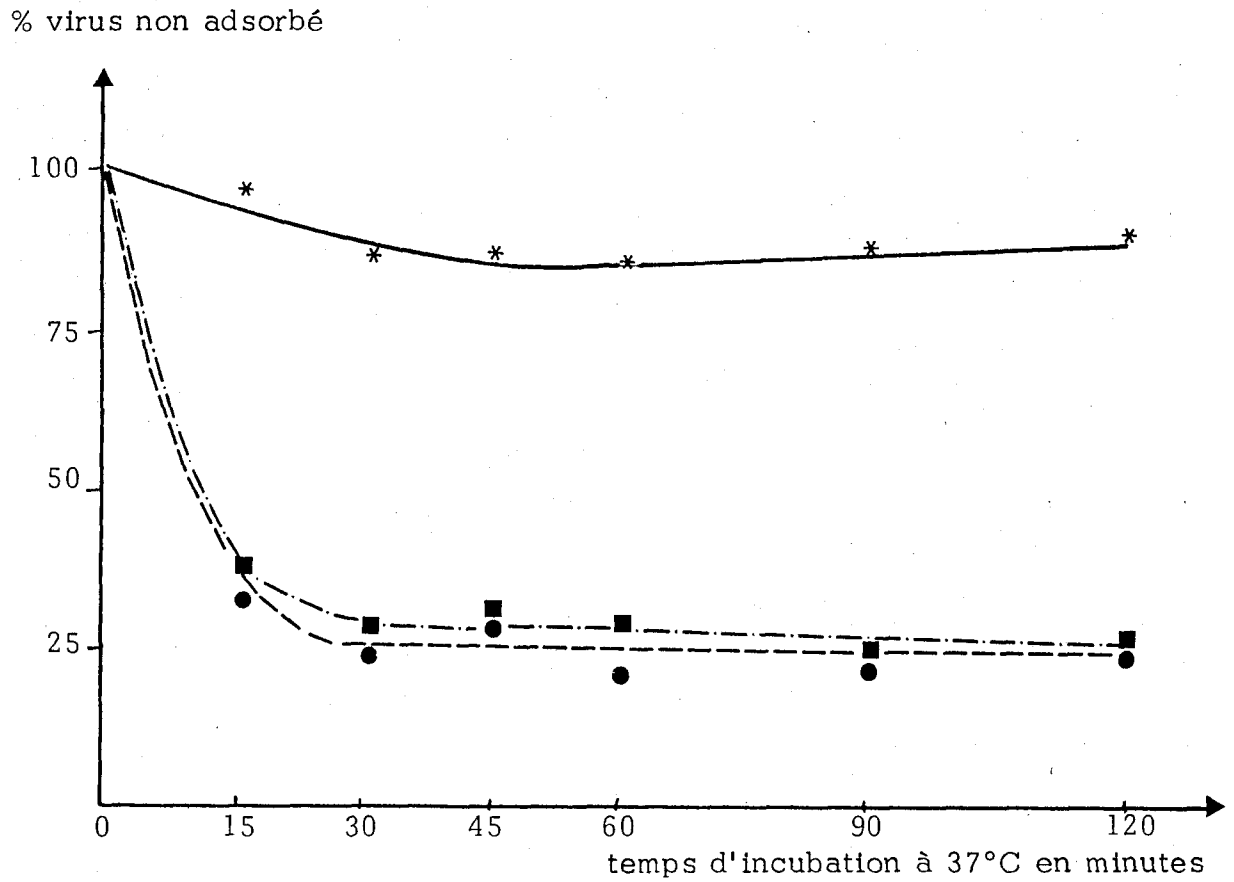
10 μl de solution d'adénovirus type 2 marqué par un mélange d'acides aminés ^{14}C à raison de 7500 cpm/10 μl sont alors ajoutés dans chaque tube. L'incubation "virus-récepteur traité" a lieu à 20°C pendant une heure.

2×10^7 cellules KB reprises dans 1 ml de P.B.S. sont ajoutés à chaque tube et l'adsorption du virus sur les cellules se déroule à 37°C pendant 90 minutes. Le surnageant obtenu après centrifugation, contenant le virus non adsorbé, est réparti dans 4 fioles et la radioactivité comptée dans 8 ml de liquide de Bray.

Le résultat est représenté dans la figure 11.

Après action d'un enzyme protéolytique, la trypsine, l'inhibition d'adsorption obtenue en présence de "récepteur" non traité est levée. Le virus s'adsorbe au même taux que le virus témoin. La trypsine semble agir, "in vitro", sur le "récepteur" isolé des cellules KB de l'adénovirus type 2, alors qu'elle n'inactive pas, "in vivo", les récepteurs d'adénovirus type 2 des cellules HeLa (107).

FIGURE N° 11



Cinétique d'adsorption virale après action de la trypsine sur le récepteur

Les cinétiques d'adsorption de l'adénovirus type 2, marqué ^{14}C , sur les cellules KB sont étudiées en absence (●—●) ou en présence de 15 µg de récepteur cellulaire (*—*).

■—■ Cinétique d'adsorption obtenue après traitement de 17,5 µg de récepteur cellulaire par un enzyme protéolytique, la trypsine.



2°) Adsorption de l'adénovirus sur les hématies de rat.

Dans 3 séries de tubes à hémolyse, 10 μ l d'adénovirus type 2 marqué par un mélange d'acides aminés 14 C sont préincubés en présence de 35 μ g de "récepteur", en absence de "récepteur" ou en présence de 30 μ g de protéines de membrane extraites au D.O.C. L'incubation a lieu sous un volume de 1 ml de P.B.S. pendant 1 heure à 20°C.

Dans un second temps, dans chaque tube, on ajoute 100 μ l d'un culot d'hématies de rat et on laisse l'adsorption se dérouler à 37°C pendant 15, 30, 45, 60, 90 ou 120 minutes. A ces différents temps un tube de chaque série est prélevé, centrifugé et la radioactivité du surnageant, après précipitation à l'acide trichloracétique 10 % est comptée dans 5 ml de liquide de scintillation à base de toluène.

Les résultats sont représentés dans la figure 12.

L'adsorption de l'adénovirus sur les hématies de rat est rapide, en 15 minutes 80 % de la radioactivité est adsorbée.

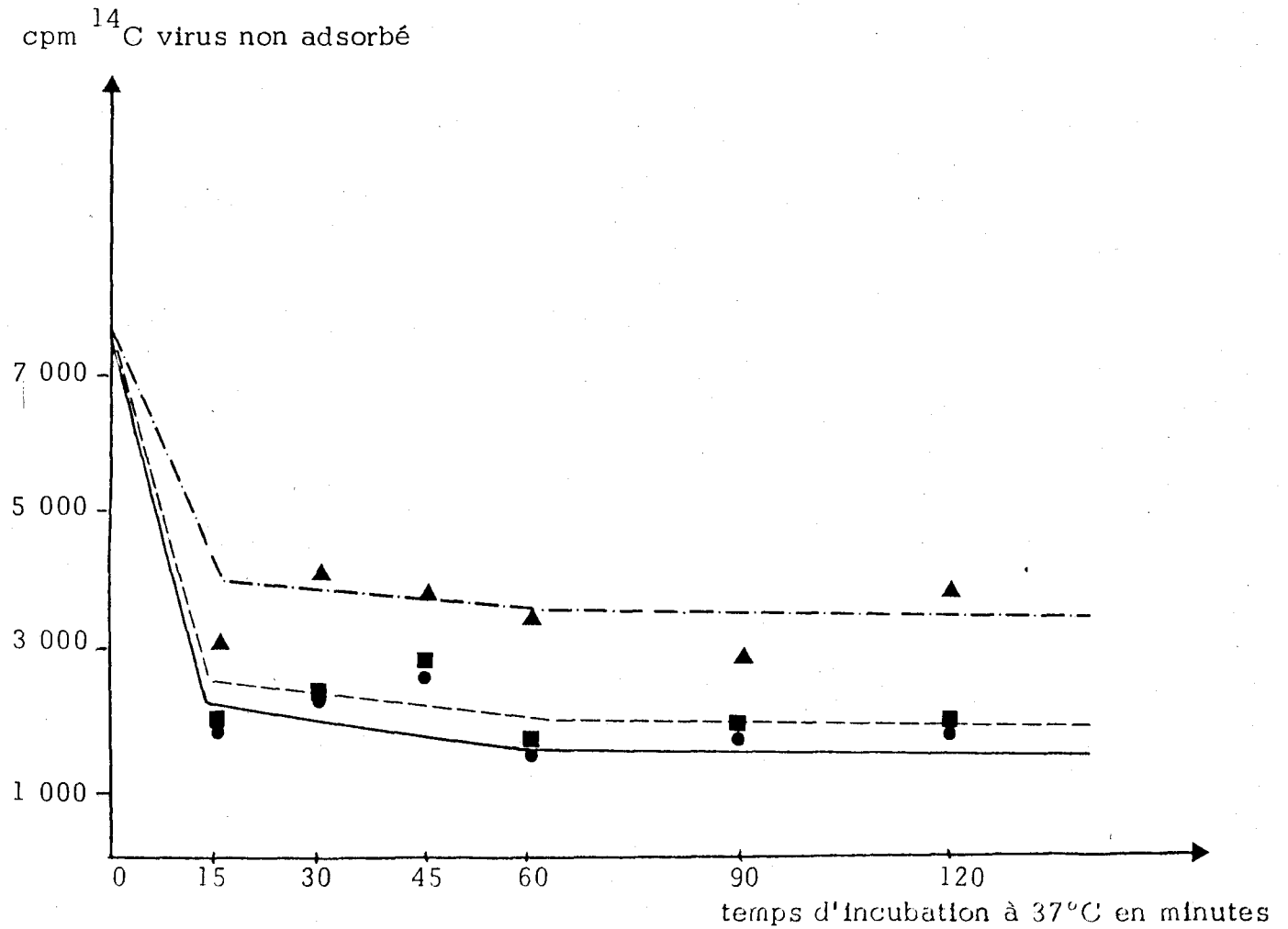
En présence d'extrait brut de protéines de membrane l'inhibition de l'adsorption par rapport au virus témoin n'est que de 5 %. Par contre, en présence de 35 μ g de "récepteur" l'inhibition d'adsorption de l'adénovirus sur les hématies est de 28 % par rapport au témoin virus sans "récepteur".

Le "récepteur" isolé sur Biogel immunoadsorbant inhibe donc l'adsorption de l'adénovirus sur les hématies de rat. Cependant, cette inhibition est inférieure à celle obtenue avec les cellules KB qui semble un meilleur système cellulaire.

3°) Analyse sur gel de polyacrylamide dissociant.

La fraction non retenue sur le Biogel immunoadsorbant et celle éluée en tampon glycocholé 0,2 M pH 2,8 sont analysées sur gel de polyacrylamide en plaque en milieu S.D.S. Les résultats sont représentés dans la figure 16 (pistes f et g). Les masses moléculaires sont calculées selon leur position par rapport aux polypeptides marqueurs de l'adénovirus type 2 (piste a).

FIGURE N° 12



Cinétique d'adsorption virale sur des hématies de rat en présence
de récepteur cellulaire isolé sur immunoadsorbant

Les cinétiques d'adsorption de l'adénovirus type 2, marqué ^{14}C , sur les hématies de rat sont étudiées en absence (● — ●) et en présence (▲ - - - ▲) de 35 µg de récepteur cellulaire.

■ - - - ■ Cinétique d'adsorption obtenue en présence de 30 µg d'extrait brut de protéines de membrane.



La fraction non retenue sur le gel (piste f) est très hétérogène. Cependant la fraction retenue sur le "gel de polyacrylamide-immunoglobulines anti-base du penton-penton" puis éluee en tampon glycolle 0,2 M pH 2,8 (piste e) révèle quatre polypeptides majeurs de masse moléculaire de 100.000, 78.000, 42.000 et 34.000.

DISCUSSION

La technique de chromatographie d'affinité utilisant le Sepharose 4 B comme support insoluble nous a permis d'isoler un complexe glycoprotéique possédant une certaine affinité pour la fibre. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants. La quantité de "récepteur" éluée est très faible. Du point de vue qualitatif, la spécificité du "récepteur" vis-à-vis de l'antigène fibre, évaluée par la technique d'immuno-précipitation n'est que de 20 % ; l'inhibition d'adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB en présence de "récepteur" n'est que de 35 % par rapport à un témoin virus sans "récepteur". De plus, les polypeptides obtenus en gel de polyacrylamide dissociant sont nombreux, on ne distingue que six classes majeures de masse moléculaire 78.000, 74.000, 55.000, 42.000, 40.000 et 34.000.

Le modèle chromatographique utilisé n'est donc pas idéal. D'une part, la citraconylation de la fibre apporte une fonction carboxylique en N terminal, une certaine population de fibres peut donc se fixer sur l'amino-Sepharose par le radical citraconyl, ce qui est contraire au but recherché. Ces fibres seront éliminées lors de la réaction de décitraconylation.

La majorité des molécules de fibres se fixent donc sur l'amino-Sepharose par une fonction carboxylique autre que celle du groupement citraconique : C terminal ou amino-acide dicarboxylique ; l'extrémité N terminale de la fibre est alors dirigée dans le bon sens, vers l'extérieur. Cependant, les possibilités de liaisons sur le support sont nombreuses, comme nous pouvons le voir sur la figure 13 :

- soit la fibre se fixe sur l'amino-Sepharose par la sphérule, le site d'affinité pour le "récepteur cellulaire" est alors bloqué et la probabilité d'isoler le "récepteur" est nulle (a).
- soit la fibre se fixe sur l'amino-Sepharose par les chaînes latérales situées le long de la molécule, il se crée alors un certain empêchement stérique, la sphérule devenant plus ou moins accessible au "récepteur". La probabilité d'isoler le "récepteur", dans ce cas, est plus ou moins

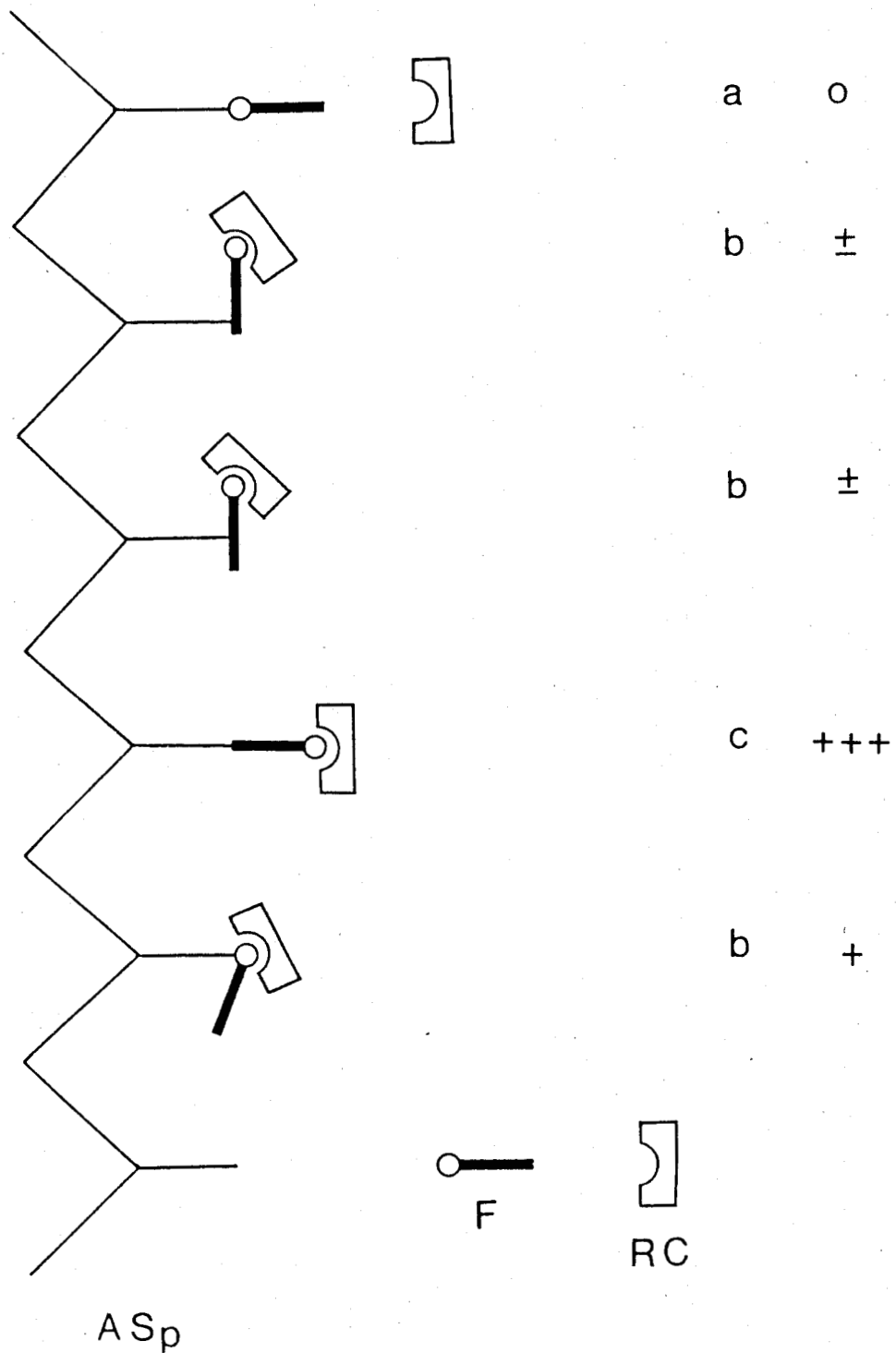


FIGURE N° 13

Accessibilité "Récepteur (RC) - fibre (F)" en fonction du point d'attache
de la fibre sur l' amino-Sepharose (ASp)



élevée selon l'empêchement stérique (b).

- soit la fibre se fixe sur le support, la sphérule dirigée vers l'extérieur ; nous sommes dans les conditions optimales d'accessibilité au "récepteur", c'est le cas le plus favorable. La probabilité d'isoler le "récepteur" est alors très grande (c).

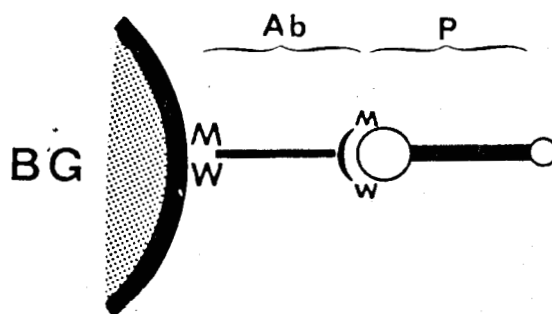
Statistiquement, les fibres doivent se trouver fixées au support insoluble par n'importe quelle fonction carboxylique (b) et une faible population de fibres seulement est fixée selon le cas le plus favorable (c).

Le problème est donc d'orienter la fibre selon ce cas idéal, la sphérule dirigée vers l'extérieur. C'est ce que nous proposons dans le deuxième modèle chromatographique utilisant le gel de polyacrylamide P₃₀₀ comme polymère insoluble et où le ligand n'est plus la fibre, mais le penton, accroché sur le support par son extrémité "base du penton", par l'intermédiaire d'un anticorps anti-base du penton, laissant ainsi libre l'extrémité "fibre" (figure 14).

Le "récepteur" isolé dans ce cas permet une inhibition d'adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB de plus de 70 % par rapport à un témoin virus sans "récepteur". Son affinité pour l'adénovirus semble donc plus importante qu'avec le récepteur isolé sur le gel "fibre-amino-Sepharose".

D'autre part, la spécificité de liaison du "récepteur" sur le "Biogel-anti-base du penton-penton" semble meilleure que sur le gel d'affinité; en effet, l'analyse sur gel de polyacrylamide dissociant permet de ne distinguer que quatre polypeptides majeurs de masse moléculaire de 100.000, 78.000, 42.000 et 34.000.

FIGURE N° 14



Modèle chromatographique du "Biogel-anti-base du penton-penton"

Des anticorps anti-base du penton (AB) de l'adénovirus type 2 sont couplés à des billes de Biogel de polyacrylamide P_{300} (BG) à l'aide de glutaraldéhyde (M et W).

Le penton de l'adénovirus est adsorbé sur le Biogel-anti-base du penton et le complexe immunoabsorbant fixé ensuite en présence de glutaraldéhyde (m et w).



Dans cette première partie, nous avons mis au point deux systèmes d'affinité permettant d'isoler à partir de membranes de cellules KB, des protéines se liant de façon spécifique à la fibre ou au penton de l'adénovirus.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons essayé d'isoler le "récepteur" lié sous la forme d'un complexe à des particules virales isolées. Pour cela, nous utilisons un agent de pontage formant des liaisons imido-ester. Ces liaisons sont clivables dans un second temps, ce qui nous permet d'analyser le complexe sur gel de polyacrylamide dissociant et d'en comparer le résultat avec celui obtenu dans les deux premières méthodes utilisées (Sepharose ou Biogel).

2ème PARTIE

IDENTIFICATION ET ISOLEMENT DU SITE RECEPTEUR D'ADENOVIRUS
PAR ATTACHEMENT COVALENT DES VIRIONS A LA MEMBRANE CELLULAIRE.

INTRODUCTION

TRAUT et coll., en 1973 (108), mettent au point une technique de pontage entre différentes protéines voisines situées sur la sous-unité 30 S des ribosomes d'Eschérichia coli, de façon à préciser la topographie des protéines ribosomales.

Nous avons utilisé cette méthode dans le but de fixer de façon covalente des particules virales sur les 'récepteurs' membranaires des cellules KB. Le méthyl 4-mercapto butyrimidate, en milieu réducteur, provoque une amidination des groupements ϵ -NH₂ des lysines des protéines cellulaires et virales. Le passage en milieu oxydant permet la formation de ponts disulfure. Après extraction par des détergents non ioniques, le complexe "virus-membrane" est isolé en gradient de sucrose puis analysé, après rupture des ponts disulfure en milieu réducteur, sur gel de polyacrylamide en plaque en milieu dissociant.

MATERIEL ET METHODES

A - PREPARATION DU COMPLEXE VIRUS-RECEPTEUR MEMBRANAIRE

1°) Marquage des cellules.

500 ml de cellules KB en suspension, soit 2×10^8 cellules, sont marquées à l'aide de 1,5 mCi de méthionine ^{35}S (activité spécifique : 460 Ci/mMol) selon la technique décrite page 98.

2°) Saturation des "sites récepteurs" par des particules virales.

Après 24 heures de marquage, les cellules KB sont recueillies par centrifugation à 1500 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C et reprises dans 16 ml de tampon HMS. On ajoute 4 ml d'une suspension de particules d'adénovirus titrant 10^{13} pfu/ml (pfu = unité formant plaque) et correspondant à 10^{14} particules physiques, soit 5×10^5 particules physiques par cellule.

L'adsorption du virus sur les cellules se déroule à 0°C, pendant 2 heures, sous agitation.

3°) Amidination des protéines virales et cellulaires.

Les virions non adsorbés sont éliminés par centrifugation à 1500 tours/minute, pendant 10 minutes, à 4°C et les cellules reprises dans 10 ml de tampon HMS contenant du mercapto-éthanol (5 mM) et du méthyl 4-mercapto butyrimidate à la concentration finale de 5 mg/ml, selon la technique mise au point par TRAUT et coll., en 1973 (109).

La réaction d'amidination s'effectue à 0°C pendant 30 minutes.

4°) Formation des ponts disulfure.

Les cellules sont centrifugées à 1500 tours/minute, pendant 10 minutes, à 4°C, pour éliminer le mercapto-éthanol et le méthyl 4-mercapto butyrimidate en excès. Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de tampon HMS contenant de l'eau oxygénée (100 mM), l'oxydation se déroulant à 0°C, pendant 90 minutes.

5°) Extraction du complexe "adénovirus-récepteur membranaire."

Les cellules sont recueillies par centrifugation à 1500 tours/minute, pendant 10 minutes, à 4°C et resuspendues dans 1 ml de tampon HMS contenant du Triton X₁₀₀ 0,25 % ; l'extraction du complexe s'effectue à 0°C pendant 1 heure. Les cellules sont alors centrifugées à 5000 tours/minute, pendant 15 minutes, à 4°C.

Un témoin, correspondant aux cellules saines, est effectué dans les mêmes conditions, excepté la première étape, celle de l'adsorption virale, qui est alors supprimée.

B - ISOLEMENT DU COMPLEXE VIRUS-RECEPTEUR SUR GRADIENT DE SUCROSE

Le surnageant de la dernière centrifugation, contenant les complexes "adénovirus-récepteurs membranaires" pontés, est déposé au sommet d'un gradient continu de sucrose 25 % - 40 % (poids/volume) préparé en tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8/NaCl 0,2 M/EDTA 0,01 M.

Les gradients sont centrifugés à 25000 tours/minute, pendant 80 minutes, à 4°C, dans le rotor SW 41 de l'ultra-centrifugeuse Spinco.

Les gradients sont recueillis par fractions de 300 µl et la radioactivité déterminée sur une aliquote de 50 µl.

Les fractions correspondant à la sédimentation d'un témoin adénovirus marqueur sont rassemblées, dialysées pendant 48 heures contre de l'eau distillée, puis lyophilisées.

C - ANALYSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DISSOCIANT

Les ponts disulfure sont rompus, en milieu réducteur, par chauffage à 100°C pendant 2 minutes des complexes "adénovirus-récepteur" repris, après lyophilisation, dans 50 µl de tampon Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8/mercapto éthanol 5 % / S.D.S. 2 % / urée 3 M.

Les protéines du récepteur sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque, en milieu S.D.S. selon la technique décrite page 103.

RESULTATS

A - EXTRACTION DU COMPLEXE VIRUS-RECEPTEUR MEMBRANAIRE

Les protéines de l'adénovirus et celles de la membrane plasmatique de la cellule KB sont pontées à l'aide du méthyl 4-mercaptopbutyrimidate, le complexe ainsi formé est extrait par un détergent non ionique, le Triton X₁₀₀.

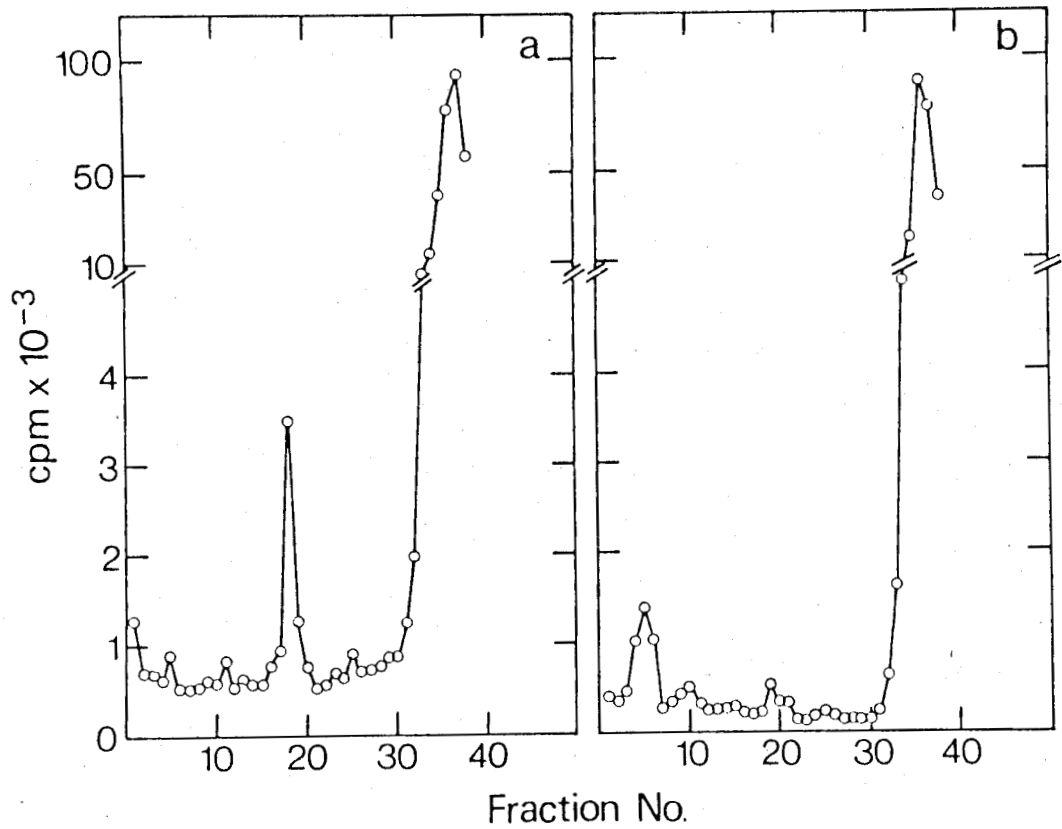
La radioactivité totale des cellules marquées à la méthionine ³⁵S est de 9×10^8 cpm et celle des protéines extraites par le détergent est de 7×10^6 cpm ; 0,75 % des protéines cellulaires sont donc solubilisées par le Triton X₁₀₀.

B - ISOLEMENT DU COMPLEXE EN GRADIENT DE SUCROSE

Les protéines extraites par le Triton sont déposées au sommet d'un gradient continu de sucrose 25 % - 40 %. Après ultracentrifugation, les gradients sont recueillis par fraction de 300 μ l dont on détermine la radioactivité sur une aliquote de 50 μ l. Les résultats sont représentés sur la figure 15.

Après réaction de pontage des protéines virales et cellulaires, le complexe "virus-récepteur", extrait par le Triton X₁₀₀, sédimente jusqu'à la moitié du gradient de sucrose (courbe a). Le pic de radioactivité correspondant au complexe se situe entre les fractions 17 et 20, à la même position que des particules d'adénovirus type 2, marquées par un mélange d'acides aminés ¹⁴C et sédimentant dans les mêmes conditions. Les fractions correspondant au complexe "virus-récepteur" sont rassemblées, dialysées, puis lyophilisées. La radioactivité est de 17 500 cpm, ce qui représente 0,002 % du marquage des protéines cellulaires totales et 0,2 % des protéines de membrane extraites par le Triton X₁₀₀.

FIGURE N° 15



Isolement des complexes "adénovirus-récepteur" en gradient de sucrose

Des cellules KB marquées à la méthionine ³⁵S saturées à 0°C avec des particules d'adénovirus (courbe a), et des cellules KB servant de contrôle (courbe b), sont pontées par du méthyl 4-mercapto butyrimidate et soumises à une extraction au Triton X₁₀₀. Les extraits Triton sont analysés en gradient de sucrose. Les fractions 17 à 20 correspondent à la position d'un adénovirus marqueur.



Pour le témoin correspondant aux cellules saines (courbe b), la plupart des protéines de membrane extraites par le Triton reste au sommet du gradient.

C - ANALYSE DU COMPLEXE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU DISSOCIANT

La composition polypeptidique des protéines de membrane complexées à l'adénovirus, puis isolées en gradient de sucrose, est déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque, en présence de S.D.S., après rupture des ponts disulfure en milieu réducteur.

La figure 16 (piste i) nous montre que les protéines cellulaires isolées à partir du complexe "virus-récepteur" sont constituées de trois sous-unités polypeptidiques majeures de masse moléculaire 78 000, 60 000 et 42 000 et de trois polypeptides mineurs de masse moléculaire 115 000, 88 000 et 34 000.

Pour le témoin correspondant aux cellules saines (piste j), une seule sous-unité polypeptidique, de masse moléculaire 115 000 est révélée; elle appartient probablement à un matériel cellulaire sédimentant comme des particules virales.

Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide des récepteurs cellulaires

A) Chromatographie d'affinité sur "fibre-amino-Sepharose" d'un extrait de membrane de cellules KB marquées à la méthionine ³⁵S.

- a - Position des marqueurs polypeptidiques de l'adénovirus
II : 120 000, III : 85 000, III_a : 68 000, IV : 65 000,
V : 48 500, VI : 24 000, VII : 18 500, IX : 12 500.
- b - Fraction non adsorbée sur la fibre-amino-Sepharose et
éluee en NaCl 0,05 M.
- c - Fraction éluee en NaCl 0,15 M.
- d - Fraction éluee en NaCl 0,6 M.
- e - Extrait brut de protéines de membrane.

B) Adsorption sur "penton-anti-base du penton-immunoabsorbant".

- f - Fraction non retenue sur le Biogel.
- g - Fraction retenue et éluee en milieu acide.

C) Pontage des particules d'adénovirus sur les protéines de surface des cellules KB.

- h - Position des marqueurs polypeptidiques de l'adénovirus.
- i - Fractions 17 à 20 du gradient a de la figure 15, rassem-
blées, dialysées et lyophilisées.
- j - Fractions 17 à 20 du gradient b de la figure 15.

a - g et h, - j correspondent à des migrations séparées dans deux systèmes de gel différents : soit 17,5 % en acrylamide, rapport acrylamide : bisacrylamide 150 : 1 (a - g) ; soit 12 % en acrylamide, rapport acrylamide : bisacrylamide 37,5 : 1 (h - j).

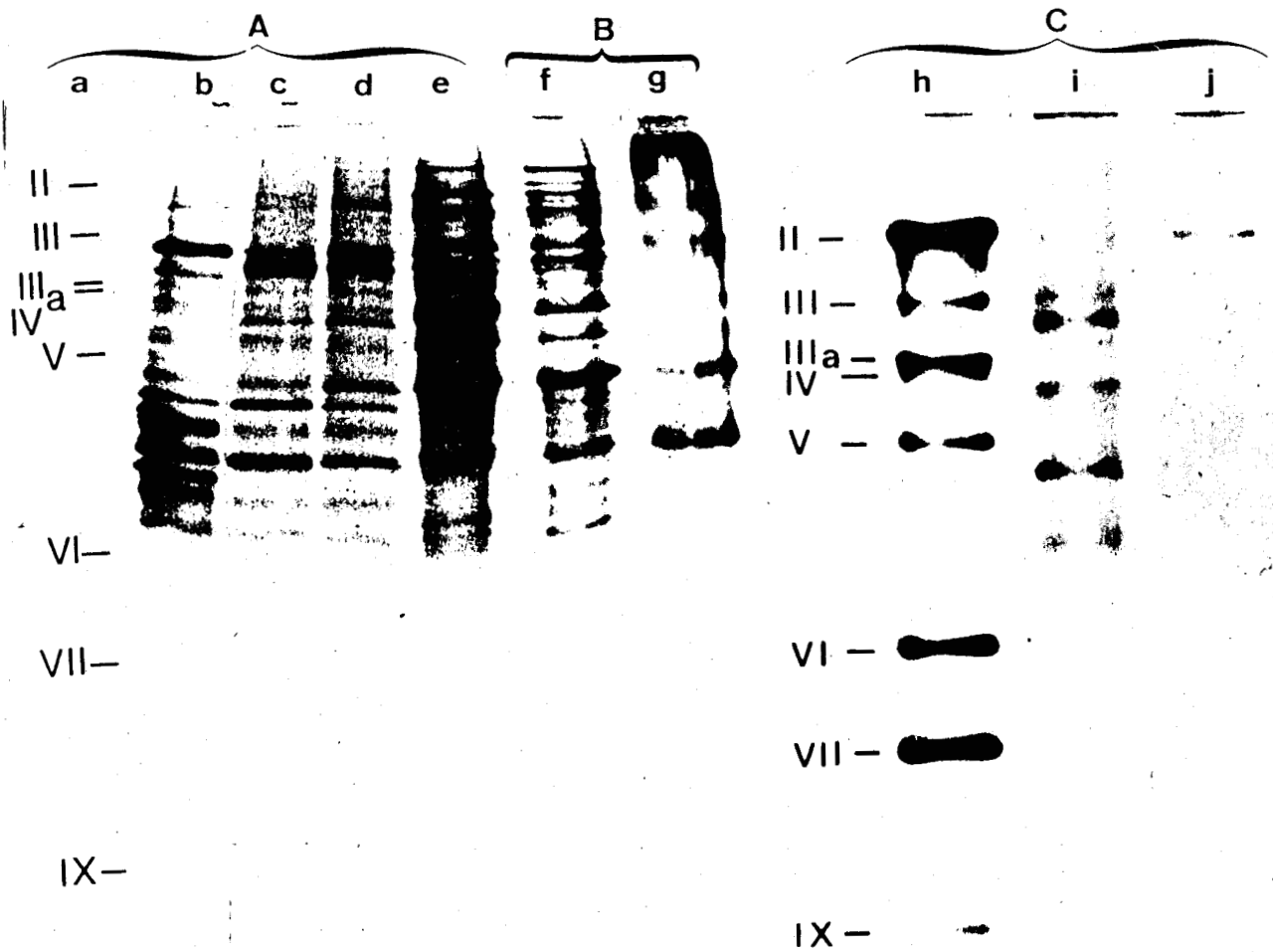


FIGURE N° 16



Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide
des récepteurs cellulaires

DISCUSSION

D'après PHILIPSON et coll., en 1968 (110), il existe 10^4 "sites récepteurs" spécifiques de l'adénovirus type 2 à la surface d'une cellule KB. En adsorbant 2×10^5 particules virales par cellule, on a une saturation des "sites récepteurs" situés sur la membrane de la cellule hôte.

Selon LONBERG-HOLM et PHILIPSON, en 1974 (111), l'adsorption se déroulant à 0°C , aucune particule virale ne peut pénétrer à l'intérieur de la cellule ; les virions restent donc sur la membrane externe cytoplasmique de la cellule KB.

L'amidination des protéines virales et cellulaires par le méthyl 4-mercapto butyrimidate permet, lors d'une oxydation douce, de ponter les protéines du "site récepteur" à celles de la capsid virale.

Les complexes "virus-récepteur" sont extraits par des détergents non ioniques puis isolés par sédimentation en gradient de sucrose. Les protéines pontées à l'adénovirus constituent 0,002 % des protéines cellulaires totales et 0,2 % des protéines de membrane extraites par le Triton X₁₀₀.

L'analyse du complexe en gel de polyacrylamide en milieu dissociant, après rupture des ponts disulfure par réduction, nous révèle que 5 sous-unités protéiques de masse moléculaire 88 000, 78 000, 60 000, 42 000 et 34 000 semblent être présentes dans le "site récepteur" de l'adénovirus situé à la surface de la cellule KB.

DISCUSSION

BUTTERS et HUGHES (112, 113) à l'aide de détergents non ioniques, tels que le désoxycholate de sodium ou le Triton X₁₀₀, ont extraits des membranes plasmiques de cellules KB, 4 classes majeures de glycoprotéines de masse moléculaire 92 000, 72 000, 62 000 et 34 000; dans ces mêmes conditions, on peut obtenir les récepteurs spécifiques responsables de l'adsorption de l'adénovirus.

1°) Dans le but de retenir les protéines de membrane de cellules KB impliquées dans l'attachement de l'adénovirus, nous avons comparé deux systèmes de gel d'affinité :

- La chromatographie d'affinité sur "fibre-amino-Sepharose" est la technique la plus simple car la cellule-hôte synthétise en excès l'antigène soluble fibre dont la purification est relativement facile.

Cependant le pourcentage élevé de radioactivité glucosamine ³H (9 % à 10 %) et méthionine ³⁵S (16 % à 17 %) adsorbée sur le gel "fibre-amino-Sepharose", est incompatible avec le taux très faible de protéines réceptrices calculé par HUGHES et MAUTNER, en 1973 (114) ; en effet, selon ces auteurs, les composants responsables de l'attachement de l'adénovirus à la surface de la cellule KB représenteraient 0,015 % des protéines totales de membrane plasmique.

D'autre part, le matériel obtenu par cette méthode semble peu spécifique vu l'hétérogénéité des espèces protéiques retenues sur le gel ; l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant révèle une composition polypeptidique trop complexe pour être celle du "récepteur".

Toutefois, la chromatographie d'affinité d'un extrait de membranes plasmiques sur "fibre-amino-Sepharose" enrichit le matériel retenu en facteurs ayant une activité d'inhibition de l'adsorption de

l'adénovirus sur les cellules KB et dont la composition en polypeptides révèle six classes majeures de masse moléculaire 78 000, 74 000, 55 000, 42 000, 40 000 et 34 000.

Le manque de spécificité de ce système d'affinité peut être dû à la présence des nombreux groupements aminés créés au cours de l'activation du Sepharose par le bromure de cyanogène et à une orientation défavorable des molécules de fibre.

- Le système immunoabsorbant, où les molécules de penton sont fixées à des particules de gel de polyacrylamide par l'intermédiaire d'immunoglobulines anti-base du penton, a l'avantage d'orienter les molécules de fibre telles qu'elles le sont dans une particule d'adénovirus.

Le pourcentage de radioactivité glucosamine-³H (1 % à 1,25 %) et méthionine-³⁵S (0,5 % à 1 %) retenue sur l'immunoabsorbant est moins élevé que celui obtenu avec le gel "fibre-amino-Sepharose".

L'activité spécifique d'inhibition d'adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB est supérieure avec le matériel élué par chromatographie sur le gel de "polyacrylamide-immunoglobulines anti-base du penton-penton" qu'avec celui élué du gel "fibre-amino-Sepharose".

De plus, l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant révèle que 4 classes majeures de polypeptides sont retenues sur l'immunoabsorbant, de masse moléculaire 100 000, 78 000, 42 000 et 34 000. Ce qui est en accord avec les résultats de MEAGER, BUTTERS et HUGHES, en 1976 (115) ; ces auteurs ont isolé d'un extrait fréon de cellules KB partiellement purifié puis chromatographié sur une colonne d'affinité fibre-Sepharose, un composant glycoprotéique majeur de masse moléculaire 75 000.

2°) Pour déterminer les espèces polypeptidiques faisant partie intégrante du "site récepteur" spécifique de l'adénovirus, des particules virales sont pontées sur des cellules KB et le complexe "virus- récepteur", extrait par un détergent non ionique, est isolé par centrifugation en gradient de sucrose.

La composition du "site récepteur" analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant, après rupture des ponts disulfure, révèle trois sous-unités polypeptidiques majeures de masse moléculaire 78 000, 60 000 et 42 000 ainsi que deux espèces mineures de masse moléculaire 88 000 et 34 000.

Les sous-unités de masse moléculaire 78 000, 42 000 et 34 000 sont communes aux trois systèmes étudiés. Bien que du phénylméthyl-sulfonyl fluoride soit ajouté dans les tampons, il n'est pas exclu que les polypeptides 42 000 et 34 000 soient des fragments protéolytiques d'une glycoprotéine de masse moléculaire plus élevée telle que la 78 K. La 42 K peut correspondre à la sous-unité de l'actine présente dans les membranes cellulaires et qui serait soit liée aux glycoprotéines du "site récepteur" soit retenue de façon non spécifique sur la colonne d'affinité ou sur l'immunoabsorbant.

Dans le modèle d'attachement du virus à la membrane cellulaire proposé par LONBERG-HOLM et PHILIPSON, en 1974 (116), le virus, par sa fibre, interagit réversiblement dans un premier temps avec une ou plusieurs sous-unités protéiques du "site récepteur". Dans ce cas, la sous-unité de masse moléculaire 78 000, retenue sur le gel d'affinité et sur l'immunoabsorbant et trouvée également dans les complexes virus-cellules, pourrait être le composant responsable de la première interaction avec la fibre.

D'autres sous-unités du "récepteur", capables de diffuser à travers la membrane cellulaire, s'additionneraient, dans un second temps, avec le complexe initial instable "virus- récepteur", pour former des liaisons multivalentes plus stables.

Les résultats obtenus lors des réactions de pontage de l'adénovirus sur son "récepteur", ne permet pas d'estimer si les autres sous-unités sont présentes au moment de l'adsorption ou si elles apparaissent après la première étape de liaison entre la fibre de l'adénovirus et la glycoprotéine 78 K. Cependant, les résultats obtenus avec la chromatographie d'affinité et l'immunoabsorbant, suggèrent que la 42 K et la 34 K participent à cette première étape. Les sous-unités 88 K et 60 K

pourraient être des espèces protéiques voisines du "site récepteur" et pontées par le diimidioester.

Si la 42 K correspond bien à la sous-unité de l'actine, les tubules d'actine cytoplasmiques pourraient être en étroite relation avec les "sites récepteurs" de l'adénovirus et être impliquées dans le transport de l'adénovirus à travers le cytoplasme comme l'ont suggéré récemment DALES et CHARDONNET, en 1973 (117).

CONCLUSION

A partir de membranes plasmatiques purifiées de cellules KB ou à partir de cellules entières, à l'aide de détergent non ionique tel que le Triton X₁₀₀, nous avons pu solubiliser les "sites récepteurs" de l'adénovirus type 2. Les protéines de ce site sont marquées à la fois par la méthionine ³⁵S et par la glucosamine ³H, et leur activité est détruite par la trypsine. Ce "site récepteur" semble être constitué de trois sous-unités protéiques majeures de masse moléculaire 78 000, 42 000 et 34 000.

Les mêmes résultats sont obtenus avec des extraits de membranes plasmatiques purifiés à l'aide de deux techniques totalement différentes, la chromatographie d'affinité et le gel immunoabsorbant, ou à partir de cellules entières dont on extrait le "site récepteur" sous forme de complexe "virus-récepteur membranaire".

Ces protéines ont une affinité pour la fibre ou le penton de l'adénovirus type 2 et inhibent l'adsorption de l'adénovirus sur les cellules KB comme sur les érythrocytes de rat. Elles participent donc à la structure du "site récepteur" membranaire de l'adénovirus.

Dans le but de purifier plus avant le "site récepteur" nous envisageons de coupler les deux techniques d'affinité, chromatographie sur "fibre-amino-Sepharose" suivie d'une immunoabsorption sur "Biogel de polyacrylamide-immunoglobulines anti-base du penton-penton".

D'autre part, différentes lignées cellulaires, permissives ou non permissives pour l'adénovirus (mutants cellulaires thermosensibles), seront étudiées quant à l'affinité de leurs protéines de membrane pour la fibre.

Nous nous proposons également d'étudier, en microscopie électronique, les modifications apportées au niveau des protéines de membrane lors de l'infection à haute multiplicité des cellules KB par l'adénovirus type 2, afin de proposer un modèle possible pour la structure et la fonction du "récepteur" de l'adénovirus situé sur la membrane plasmatische des cellules KB.

APPENDICE TECHNIQUE

I - SOLUTIONS /

1°) Tampon phosphate isotonique P.B.S.

Solution A	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	$\text{PO}_4 \text{H Na}_2, 12 \text{H}_2\text{O}$	2,9 g
	$\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$	0,2 g

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

Solution B	MgCl_2	0,1 g
------------	-----------------	-------

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

Solution C	CaCl_2	0,1 g
------------	-----------------	-------

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

Mélanger les trois solutions A, B, C.

Ajuster le pH à 7,4 avec HCl 1 N.

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

2°) R.S.B.

NaCl	0,01 M
Tris	0,01 M pH 7,4
MgCl_2	0,0015 M

3°) Tampon H. M. S.

Hépès : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthane
sulfonique 0,05 M pH 7,5

MgCl ₂	0,05 M
Sucrose	0,25 M

4°) Milieus scintillants.

a) Milieu à base de toluène :

P. P. O. (2,5 paradiphényl oxazole)	5 g
P. O. P. O. P. (1,4-di(2-5)-phényl oxazolyl)benzène	0,3 g
Toluène	1000 ml

b) Liquide de Bray :

Naphtalène	60 g
P. P. O.	4 g
P. O. P. O. P.	0,2 g
Ethylène glycol	20 g
Ethanol	100 ml
Dioxane	q. s. p. 1000 ml

II - CULTURE DE CELLULES

1°) Multiplication des cellules.

Les cellules KB en suspension sont maintenues, en phase exponentielle de croissance, à 37°C, dans un flacon à barreau magnétique ayant une vitesse de rotation de 300 tours/minute et contenant du milieu de Eagle modifié par JOKLIK (Grand Island Biological Co) et additionné de 5 % de sérum de cheval inactivé préalablement 30 minutes à 56°C.

2°) Marquage des membranes.

Le marquage des cellules plasmatiques sur leur partie protéique est effectué sur un litre de cellules KB à l'aide de $0,25 \mu\text{Ci}$ d'un mélange d'acides aminés ^{14}C par ml de milieu de culture (activité spécifique 40 Ci/atome de carbone) ou à l'aide de $2,5 \mu\text{Ci}$ de méthionine ^{35}S par ml de milieu de culture (activité spécifique 498 Ci/mMole).

Durant les trois premières heures de marquage, les cellules sont concentrées deux fois puis diluées par addition d'un volume égal de milieu de culture frais contenant 5 % de sérum de cheval et laissées sous agitation à 37°C pendant 20 heures.

De la même façon, un deuxième litre de cellules KB est marqué sur la partie glycanique par $4 \mu\text{Ci}$ de glucosamine ^3H par ml de milieu de culture (activité spécifique 12 Ci/mMole).

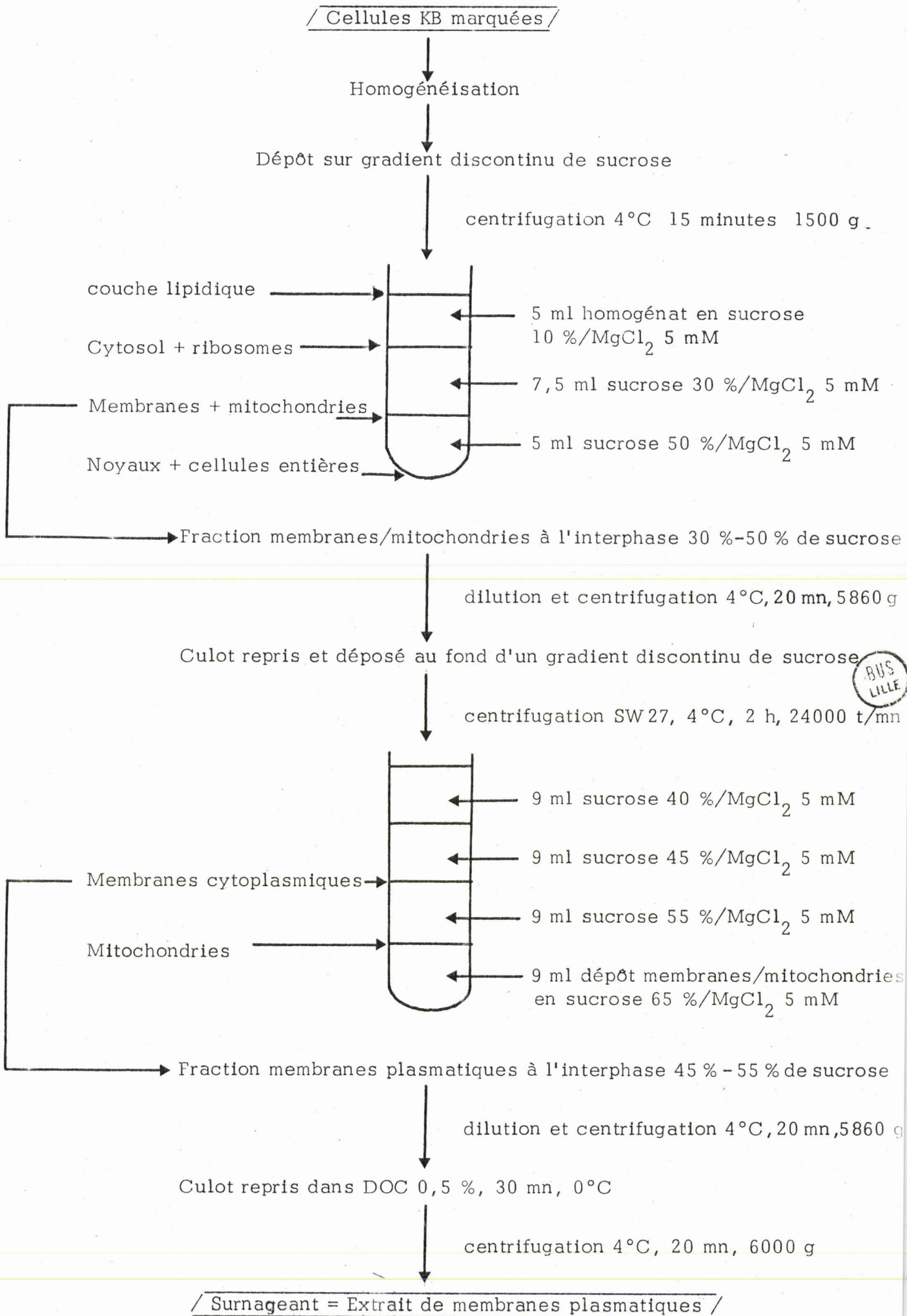
III - PREPARATION DES MEMBRANES /

Les membranes plasmatiques de cellules KB sont préparées selon la méthode de WARREN modifiée (118).

Après 24 heures de marquage les deux litres de cellules KB sont recueillies par centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 500 g et lavées une fois dans du P.B.S. (Phosphate Buffered Saline = solution isotonique tamponnée en phosphate).

Les cellules sont resuspendues dans 7 ml de R.S.B. (Reticulocyte Standard Buffer) et laissées 8 minutes à 0°C .

L'éclatement des cellules est réalisé dans un homogénéisateur de Dounce par 20 aller-retours du piston de type B. L'homogénat est ramené à une concentration de 10 % en sucrose par addition de 1 ml de sucrose 80 % / MgCl_2 5 mM puis réparti, à raison de 5 ml par gradient, au sommet de deux gradients discontinus de sucrose préparés comme l'indique la figure 17. La centrifugation est effectuée, à 4°C , pendant 15 minutes à 1500 g.



BUS
LILLE

Les membranes, alors grossièrement séparées, sont disposées sous la forme d'une bande, située à la limite des concentrations 30 % et 50 % en sucrose, que l'on recueille à l'aide d'une pipette Pasteur et dilue 3 fois avec du $MgCl_2$ 5 mM.

Les membranes sont sédimentées par centrifugation à 5860 g pendant 20 minutes à 4°C et le culot repris dans 18 ml de sucrose 65 %/ $MgCl_2$ 5 mM est homogénéisé dans un appareil de Dounce par 3 aller-retours du piston de type B. L'homogénat est réparti au fond de deux tubes de nitrate de cellulose, à raison de 9 ml par tube, en passant avec précaution, à l'aide d'une seringue de 10 ml, à travers les couches d'un gradient discontinu de sucrose préformé comme l'indique la figure 17. Les gradients sont centrifugés à 4°C pendant deux heures à 24 000 tours/minute dans le rotor SW 27 de l'ultra-centrifugeuse Spinco.

La bande située entre les concentrations 45 % et 55 % en sucrose correspond aux membranes plasmatiques purifiées; elle est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur, diluée dans du $MgCl_2$ 5 mM, puis centrifugée pendant 20 minutes à 5860 g.

Le culot de membranes plasmatiques est repris dans 10 ml de P.B.S. et les protéines extraites par du désoxycholate de sodium 0,5 % selon la technique décrite page 38.

IV - PREPARATION DE L'ADENOVIRUS /

1°) Culture de cellules.

Nous avons utilisé des cellules KB maintenues en phase exponentielle de croissance, en suspension à 37°C dans un flacon à agitateur magnétique tournant à une vitesse de rotation de 300 tours/minute (dit "flacon à culture en suspension") et contenant du milieu minimum de Eagle modifié par JOKLIK (Grand Island Biological Co) et additionné de 5 % de sérum de cheval inactivé préalablement 30 minutes à 56°C.

2°) Inoculation du virus.

Les cellules sont concentrées à 10^7 cellules/ml dans un flacon à culture en suspension contenant du milieu de Eagle modifié par JOKLIK, additionné de 1 % de sérum de veau foetal.

L'inoculation des cellules par l'adénovirus se fait à raison de 20 particules infectieuses par cellule.

Après une heure d'adsorption à 37°C , la concentration cellulaire est ramenée à 2×10^5 cellules/ml en ajoutant du milieu de culture frais contenant 5 % de sérum de cheval. Les cellules sont laissées en incubation à 37°C pendant 32 heures, durée du cycle de multiplication viral sur cellules maintenues en culture en suspension.

3°) Marquage du virus au ^{14}C .

Le marquage du virus est effectué 8 heures après l'adsorption, soit sur le DNA viral à l'aide de $0,1 \mu\text{Ci}$ de thymidine ^{14}C par ml de milieu de culture (activité spécifique : 50 mCi/mMole), soit sur les protéines virales à l'aide de $0,1 \mu\text{Ci}$ d'un mélange d'acides aminés ^{14}C par ml de milieu de culture (activité spécifique : 140 mCi/mMole).

4°) Extraction de l'adénovirus.

A la fin du cycle de multiplication, les cellules sont centrifugées à 4°C , 10 minutes à 600 g, elles sont lavées 3 fois dans du P.B.S. et remises en suspension dans 10 ml de tampon Tris 0,01 M pH 8,1/EDTA 1 mM (EDTA : sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique ; Tris : amino-2-hydroxy méthyl-2-propanediol-1,3).

Les cellules sont ensuite soumises à une série de trois congélations-décongélations successives, passages de -70°C à $+37^\circ\text{C}$.

Les particules virales sont alors extraites par homogénéisation en présence de 10 ml de Fréon 113 (trifluoroéthane) (119) dans un homogénéisateur Ultra Turrax, suivie d'une centrifugation à 4°C , 25 minutes à 700 g.

La phase aqueuse, supérieure, est seule retenue, mais l'interphase, ainsi que la phase organique, peuvent être réextraites par 10 ml de tampon Tris 0,01 M pH 8,1/EDTA 1 mM.

5°) Concentration du virus.

Les phases aqueuses sont réunies et déposées soigneusement sur un "coussin" fait d'une solution de chlorure de caesium (CsCl) de densité 1,43.

Après une heure de centrifugation à 4°C, à 20 000 tours/minute dans le rotor SW 25-2 d'une centrifugeuse Spinco, la bande opalescente virale qui s'est formée au-dessus du coussin de CsCl est recueillie. La densité de la suspension virale est ajustée alors à 1,34 par addition de CsCl, solide, le volume final étant de 5 ml.

Cette solution est ensuite centrifugée à 4°C, 20 heures, à 30 000 tours/minute dans le rotor Spinco SW 65. La bande virale qui apparaît au milieu du gradient de densité est recueillie goutte à goutte en ponctionnant le fond du tube avec une aiguille.

6°) Conservation du virus.

La préparation virale est dialysée 2 heures à 4°C contre du tampon Tris 0,01 M pH 8,1 avec 4 renouvellements du tampon de dialyse.

Le virus est ensuite conservé à - 20°C dans du glycérol 50 %, ce qui empêche sa congélation et son éventuelle inactivation par suite de cette décongélation.

V - / PREPARATION DE L'IMMUNSERUM ANTIFIBRE /

L'immunsérum antifibre est préparé chez le lapin par injection, par voie intradermique, de fibre purifiée, quatre fois de suite, à dix jours d'intervalle.

Lorsque les immunoglobulines sont synthétisées, 20 ml du sang du lapin sont prélevés dans des tubes à hémolyse préalablement rincés avec du sérum physiologique.

Après rétraction du caillot à 37°C pendant trois heures, le sérum est recueilli par centrifugation à 3000 tours/minute, 10 minutes.

La spécificité du sérum prélevé est testée ensuite par réaction d'Ouchterlony en présence d'un mélange d'antigènes viraux type 2.

VI - / ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DISSOCIANT /

1°) Préparation des échantillons.

Une aliquote de chaque fraction à analyser est diluée au demi dans un volume égal de tampon de dépôt Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 contenant 10 % mercapto-éthanol, 4 % S.D.S., 6 M urée, bleu de bromophénol 0,001 %.

Les échantillons ainsi préparés sont chauffés pendant 3 minutes à 100°C pour dissocier complètement les protéines et déposés, sous un volume de 20 à 50 μ l, sur des gels de polyacrylamide en plaque (système Biorad).

2°) Gel de résolution.

30 ml de gel à 17,5 % en acrylamide sont préparés à partir d'une solution stock à 30 % en acrylamide (poids/volume) et 2 % en N-N'bis-méthylène-acrylamide.

Les concentrations finales dans le gel de séparation sont Tris-HCl 0,375 M pH 8,9/S.D.S. 0,1 %. Les gels sont polymérisés chimiquement par addition de 0,05 % (volume/volume) de TEMED (tétraméthylène diamine) et de 0,1 % en persulfate d'ammonium fraîchement préparé.

3°) Gel d'espacement.

Le gel de résolution est surmonté d'un gel d'espacement de 1 cm de hauteur et permettant une meilleure concentration des protéines. Ce gel est de 3 % en acrylamide (rapport acrylamide : bis-acrylamide 10 : 2,5) et contient 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 et 0,1 % de S.D.S. Il est polymérisé chimiquement de la même façon que le gel de séparation.

4°) Electrophorèse.

Selon la technique décrite par LAEMMLI (120), le tampon d'électrophorèse est un tampon Tris-HCl 0,025 M pH 8,3/glycolle 0,192 M/S.D.S. 0,1 %.

L'électrophorèse est effectuée sous un voltage continu de 30 volts (courant constant), pendant 16 heures, jusqu'à ce que le marqueur bleu de bromophénol soit parvenu à l'extrémité inférieure du gel.

5°) Autoradiographie.

Après migration électrophorétique, le gel est analysé par autoradiographie ou fluorographie selon la méthode décrite par BONNER et LASKEY (121).

Le gel est déshydraté par trois bains successifs de DMSO (diméthyl sulfoxyde) de 30 minutes, puis traité pendant 3 heures par une solution de P.P.O. à 20 % dans le DMSO. Le gel est ensuite réhydraté pendant une heure dans de l'eau distillée (le bain d'eau renouvelé plusieurs fois), puis séché à chaud sous vide (système Biorad) pendant 90 minutes.

Les films utilisés pour l'exposition sont des films Kodak RP Royal X-Omat. Le film est révélé 10 minutes dans un bain de révélateur LX 24 dilué au 1/5, rincé à l'eau distillée, puis fixé 10 minutes dans un bain de fixateur AL4 dilué 5 fois et enfin rincé une nuit sous courant d'eau.

BIBLIOGRAPHIE

	Réf.	page
ANDERSON, C.W., BAUM, S.G. et GESTELAND, R.F.	17	8
J. Virol. <u>12</u> , (1973), 241 - 252.	19	10
AXEN, R. et VRETBLAD, P.		
Acta Chem. Scand. <u>25</u> , (1971), 2711 - 2716.	87	30
BONNER, W.M. et LASKEY, R.A.	101	41
Eur. J. Biochem. <u>46</u> , (1974) 83 - 88.	106	53
	121	104
BOULANGER, P.A. et HENNACHE, B.		
FEBS Letters <u>35</u> , (1973), 15 - 18.	66	20
BOULANGER, P.A. et PUVION, F.	8	8
Eur. J. Biochem. <u>39</u> , (1973), 37 - 42.	93	33
BOULANGER, P.A. et WAROCQUIER, R.		
Experimental and Molecular Pathology <u>17</u> , (1972)		
326 - 333.	69	20
BOULANGER, P.A., HOUDRET, N., SCHARFMAN, A. et LEMAY, P.		
J. Gen. Virol. <u>16</u> , (1972), 429 - 434.	36	15
BRAY, G.A.		
Analytical Biochemistry <u>1</u> , (1960), 279 - 285.	99	38
BROWN, D.T. et BURLINGHAM, B.T.		
J. Virol. <u>12</u> , (1973), 386 - 396.	48	18
BUTTERS, T.D. et HUGHES, R.C.	26	13
Biochem. J. <u>140</u> , (1974), 469 - 478.	97	38
	112	89

	Réf.	page
BUTTERS, T.D. et HUGHES, R.C. Biochem. J. <u>150</u> , (1975), 59 - 69.	113	89
CHARDONNET, Y. et DALES, S. Virology <u>40</u> , (1970), 462 - 477.	45 50 79	18 18 23
CHARDONNET, Y. et DALES, S. Virology <u>40</u> , (1970), 478 - 485.	46 51	18 18
CROWTHER, R.A. et FRANKLIN, R. M. J. Mol. Biol. <u>68</u> , (1972), 181 - 184.	10	8
CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. et ANFENSEN, C.B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. <u>61</u> , (1968), 636 - 643.	81 90	27 31
DALES, S. J. Cell. Biol. <u>13</u> , (1962), 303 - 322.	41 60	17 19
DALES, S. et CHARDONNET, Y. Virology <u>56</u> , (1973), 465 - 483.	117	92
DEBUIRE, B. Thèse de doctorat en pharmacie, (1973).	94	34
EVERITT, E., SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U. et PHILIPSON, L. Virology <u>52</u> , (1973), 130 - 147.	16	8
FREEMAN, A.E., BLACK, P.H., VANDERPOOL, E.A., HENRY, P.H., AUSTIN, J.B. et HUEBNER, R.J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. <u>58</u> , (1967), 1205 - 1212.	5	5

	Réf.	page
GREEN, M. Annual Review of Biochem. <u>39</u> , (1970), 701 - 756.	4	5
GREEN, M. et PINA, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. <u>51</u> , (1964), 1251 - 1259.	119	101
HJERTEN, S. Arch. Biochem. Biophys. <u>99</u> , (1962), 466 - 475.	83	29
HORNE, R.W., BRENNER, S., WATERSON, A.P. et WILDLY, P. J. Mol. Biol. <u>1</u> , (1959), 84 - 86.	6	6
HUANG, A.S. et BALTIMORE, D. J. Mol. Biol. <u>47</u> , (1970), 275 - 291.	59	19
HUEBNER, R.J., ROWE, W.P. et LANE, W.T. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. <u>48</u> , (1962), 2051 - 2058.	3	5
HUGHES, R.C. et MAUTNER, V. In Membrane-Mediated Information (Kent, P. Ed) <u>1</u> , (1973), 104 - 125, Medical and Technical Publishing Co., Lancaster.	23 25 29 82 114	12 13 13 28 89
INMAN, J.K. et DINTZIS, H. M. Biochemistry <u>8</u> , (1969) 4074 - 4082.	102	41
JOKLIK, W.K. J. Mol. Biol. <u>8</u> , (1964), 277 - 288.	74	22
JOKLIK, W.K. In Progress in Medical Virology <u>7</u> , (1965), 44 - 96 Ed. J.L. Melnick, Karger, Basel.	61	20

	Réf.	page
JÖRNVALL, H., PETTERSSON, U. et PHILIPSON, L. Europ. J. Biochem. <u>48</u> , (1964 b), 179 - 192.	12	8
LAEMMLI, U.K. Nature Lond. <u>227</u> , (1970), 680 - 695.	100 105 120	40 53 104
LAWRENCE, W.C. et GINSBERG, H.S. J. Virol. <u>1</u> , (1967), 851 - 867.	40 54 65 70 73 75	17 19 20 21 22 22
LONBERG-HOLM, K. et PHILIPSON, L. J. Virol. <u>4</u> , (1969), 323 - 338.	20 49 52 55 62 67 77	11 18 18 19 20 20 23
LONBERG-HOLM, K. et PHILIPSON, L. (1974) Monographs in Virology <u>9</u> , J.L. Melnick et S. Karger, Eds.	111 116	87 91
LOWE, C.R., HARVEY, M.J., CRAVEN, D.B. et DEAN, P.D.G. Biochem. J. <u>133</u> , (1973), 499 - 506.	91	31
LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RÄNDALL, R.J. J. Biol. Chem. <u>193</u> , (1951), 265 - 275.	95 98	35 38

	Réf.	page
MAIZEL, J. Jr., WHITE, D.O. et SCHARFF, M.D.	9	8
Virology <u>36</u> , (1968 a), 115 - 125.	13	8
MAIZEL, J. Jr., WHITE, D.O. et SCHARFF, M.D.		
Virology <u>36</u> , (1968 b), 126 - 136.	14	8
MARCH, S.C., PARIK, I. et CUATRECASAS, P.		
Anal. Biochem. <u>60</u> , (1974), 149 - 152.	88	31
MEAGER, A., BUTTERS, T.D., MAUTNER, V. et HUGHES, R.C.		
Eur. J. Biochem. <u>61</u> , (1976), 345 - 353.	115	90
MORGAN, C., ROSENKRANZ, H.S. et MEDNIS, B.		
J. Virol. <u>4</u> , (1969), 777 - 796.	44	17
	53	18
	58	19
	63	20
	68	20
	72	21
	76	22
	78	23
	80	25
MORI, R., SCHIEBLE, J.H. et ACKERMANN, W.W.		
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. <u>109</u> , (1962), 685 - 690.	28	13
NEURATH, A.R., HARTZELL, R.W. et RUBIN, B.A.	31	14
Nature Lond. <u>221</u> , (1969), 1069 - 1071.	34	14

	Réf.	page
NEURATH, A.R., HARTZELL, R.W. et RUBIN, B.A.	33	14
Virology <u>42</u> , (1970), 789 - 793.	39	16
	92	31
NISHIKAWA, A.H. et BAILON, P.		
Anal. Biochem. <u>64</u> , (1975), 268 - 275.	89	31
OGIER, G., FEROLDI, C. et CHARDONNET, Y.		
C.R. Acad. Sci. Paris, <u>274</u> , (1972), 3476 - 3479.	64	20
PEREIRA, H.G. et SKEHEL, J.J.		
J. Gen. Virol. <u>12</u> , (1971), 13 - 24.	15	8
PHILIPSON, L.	38	15
J. Virol. <u>1</u> , (1967), 868 - 875.	43	17
	56	19
	71	21
PHILIPSON, L.	30	13
In Progress in Medical Virology <u>5</u> , (1968), 43 - 78	35	14
Ed. J.L. Melnick, Karger, Basel.	42	17
PHILIPSON, L.		
EMBO Workshop on Biology of Adenovirus, (1976).	18	9
PHILIPSON, L. et PETTERSSON, U.		
Progr. Exp. Tumor Virus Res. <u>18</u> , (1973), 1 - 55.	11	8
PHILIPSON, L., LONBERG-HOLM, K. et PETTERSSON, U.	21	11
J. Virol. <u>2</u> , (1968), 1064 - 1075.	22	12
	107	68
	110	87

	Réf.	page
PORATH, J. Methods in Enzymology <u>34</u> , (1974), 13 - 30.	86	30
REES, D.A. Chem. Ind. <u>16</u> , (1972), 630 - 633.	84	30
ROBINSON, P.J., DUNNILL, P. et LILLY, M.D. Biochim. Biophys. Acta <u>285</u> , (1972), 28 - 35.	85	30
ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L. K., PARROT, R.H. et WARD, I.G. Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. <u>84</u> , (1953), 570 - 573.	1	5
RUSSELL, W.C., Mc INTOSH , K. et SKEHEL, J.J. J. Gen. Virol. <u>11</u> , (1971), 35 - 46.	24	12
SHEN, L. et GINSBURG, V. Wistar Institute Press Philadelphia (1968), 67 - 71	32	14
SHORTRIDGE, K.F. et BIDDLE, F. Arch. Ges. Virusforsch. <u>25</u> , (1968), 148 - 159.	27	13
SINGHAL, R. P. et ATASSI, M.Z. Biochemistry <u>10</u> , (1971), 1756 - 1762.	96	35
SUSSENBACH, J.S. Virology <u>33</u> , (1967), 567 - 574.	47 57	18 19
TERNYNCK, J. et AVRAMEAS, S. FEBS Letters <u>23</u> , (1972), 24 - 28.	104	42
TRAUT, R.R., BOLLEN, A., SUN, T.T., HERSHEY, J.W.B., SUNDBERG, J. et PIERCE, L.R. Biochemistry <u>12</u> , (1973), 3266 - 3273.	108 109	79 80

	Réf.	page
TRENTIN, J.J., YALE, Y. et TAYLOR, G. Science <u>137</u> , (1962), 835 - 841.	2	5
VALENTINE, R.C. et ALLISON, A.C. Biochim. Biophys. Acta <u>34</u> , (1959), 10 - 23	37	15
VALENTINE, R.C. et PEREIRA, H.G. J. Mol. Biol. <u>13</u> , (1965), 13 - 20	7	7
WARREN, L., GLICK, M.C. et NASS, M.K. J. Cell Physiol. <u>68</u> , (1966), 269 - 287.	118	98
WESTON, P.D. et AVRAMEAS, S. Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>45</u> , (1971), 1574 - 1580.	103	42

