

50376  
1978  
17

50376  
1978  
17

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

M É M O I R E

présenté à l'Université de Lille I  
pour l'obtention du titre de Docteur de 3<sup>ème</sup> Cycle  
(option BIOCHIMIE)

par **Christiane DEVAUX**

**STRUCTURE ET ASSEMBLAGE DES HEXONS  
DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 2**



Membres du Jury:

Monsieur J. MONTREUIL, Président  
Monsieur P.A. BOULANGER, Rapporteur  
Madame M.H. LOUCHEUX  
Monsieur J. KREMBEL  
Monsieur M. GIRARD

Mémoire présenté le 22 février 1978

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Virologie U 102 de l'INSERM. Que son Directeur, Monsieur le Professeur Jean SAMAILLE, en soit remercié.

Je remercie tout particulièrement,

Monsieur le Professeur Pierre BOULANGER qui a inspiré et guidé ce travail,

Monsieur le Président et les membres du Jury qui ont accepté de juger ce mémoire,

Tous mes Amis du laboratoire pour leurs conseils et leur amitié,

Monsieur J. CROQUETTE pour la réalisation pratique de ce mémoire.

# TABLE DES MATIERES

	Page
<u>INTRODUCTION</u> .....	1
<u>GENERALITES : STRUCTURE DE L'ADENOVIRUS ET DE SES SOUS-UNITES</u> .....	4
<u>LES ADENOVIRUS</u> -----	
I - MORPHOLOGIE .....	6
II - COMPOSITION POLYPEPTIDIQUE .....	8
III - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES .....	10
A. Antigénicité .....	10
B. Hémagglutination .....	10
C. Effet cytopathogène précoce .....	12
D. Identification fonctionnelle des protéines .....	12
<u>LES HEXONS</u> -----	
I - BIOSYNTHESE DE L'HEXON .....	13
II - ISOLEMENT ET ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'HEXON .....	14
A. Purification de l'hexon à l'état natif .....	14
B. Détermination du poids moléculaire .....	15
C. Cristallisation .....	15
D. Propriétés optiques .....	16
E. Etude biochimique de l'hexon .....	18
Composition en acides aminés	
Peptide N-terminal	
Peptide C-terminal	
Peptides tryptiques	
Peptides tryptiques contenant de la cystéine	
Caractérisation des sous-unités de l'hexon	

III - ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'HEXON .....	21
A. Etude des déterminants .....	21
B. Accessibilité des déterminants dans la capsid .....	22
C. Nature des déterminants .....	23
IV - ETUDE DU CAPSOMERE HEXON ET DE SES ASSOCIATIONS :	
ASSEMBLAGE DU VIRUS .....	24
A. Dégradation séquentielle du virus .....	25
B. Purification des groupes de 9 hexons .....	25
C. Dissociation des groupes de 9 .....	27
D. Réassociation des groupes de 9 .....	28
E. Morphologie des hexons et des groupes de 9 .....	28
Les hexons	
Les groupes de 9	
Organisation des hexons dans le virus	
F. Polypeptides associés aux hexons dans la capsid .....	34
V - GENETIQUE DE L'HEXON .....	35
A. Carte génétique de l'adénovirus .....	35
B. Mutants .....	38
Assemblage des polypeptides hexons en capsomères	
Transport des hexons vers le noyau	
Formation de capsides	

<u>PREMIERE PARTIE</u> : ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE CLASSE	
PARTICULIERE DE CAPSOMERES HEXONS : LES HEXONS "LENTS".	
ROLE DES HEXONS LENTS DANS LA MORPHOGENESE DU VIRUS. ....	41
INTRODUCTION .....	42
-----	
RESULTATS .....	43
-----	
I - SEPARATION DES HEXONS LENTS ET DES HEXONS NORMAUX PAR CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEUR D'IONS ....	43
II - CARACTERISATION DES DEUX POPULATIONS D'HEXONS .....	45
A. Analyse par immunoélectrophorèse .....	45
B. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dissociant .....	45
C. Composition en acides aminés .....	45
D. Détermination du point isoélectrique .....	49
III - COMPARAISON DES PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES .....	49
A. Association possible avec des polypeptides de faible poids moléculaire .....	49
B. Pouvoir antigénique des hexons normaux et des hexons lents ....	50
IV - COMPARAISON DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES DES HEXONS NORMAUX ET DES HEXONS LENTS .....	52
A. Cartes peptidiques .....	52
B. Etude du poids moléculaire de l'hexon lent .....	54
C. Etude de l'extrémité C-terminale de l'hexon lent .....	56
D. Etude de l'extrémité N-terminale de l'hexon lent .....	56
Action de l'aminopeptidase M                                     Détermination de l'acide aminé N-terminal	
V - RELATION ENTRE HEXONS LENTS ET ENCAPSIDATION .....	60
-----	
DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE .....	61
-----	

DEUXIEME PARTIE :

STRUCTURE CONFORMATIONNELLE DES CAPSOMERES HEXONS ASSEMBLES DANS LA CAPSIDE VIRALE. ETUDE DES GROUPES DE NEUF HEXONS .....	65
INTRODUCTION .....	66
-----	
RESULTATS .....	67
-----	
I - ISOLEMENT DES GROUPES DE 9 HEXONS .....	67
A. Analyse du gradient de glycérol .....	67
B. Purification sur échangeur d'ions .....	69
II - COMPARAISON DES SPECTRES DICHROIQUES DES HEXONS LIBRES ET DES HEXONS ASSEMBLES .....	69
A. Ultra-violet lointain .....	69
B. Ultra-violet proche .....	70
III - ETUDE DES POLYPEPTIDES IX ASSOCIES AUX HEXONS DANS LES GROUPES DE 9 .....	72
A. Présence de polypeptides IX associés aux hexons dans les groupes de 9 .....	72
B. Quantification des polypeptides IX dans les groupes de 9 et dans le virus .....	74
C. Etude des polypeptides IX dans les groupes de 9 après action de la trypsine .....	76
Structure polypeptidique Comportement immunologique	
DISCUSSION DE LA DEUXIEME PARTIE .....	80
-----	

TROISIEME PARTIE :

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE ASSOCIEE A L'HEXON .....	85
<u>INTRODUCTION</u> .....	86
<u>RESULTATS</u> .....	88
I - ANALYSE DES EXTRAITS CELLULAIRES INFECTES MARQUES AU DFP RADIOACTIF .....	88
A. Préparation des extraits marqués .....	88
B. Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide dissociant .....	88
C. Analyse immunologique des extraits marqués .....	89
II - LOCALISATION DES PROTEINES MARQUEES PAR LE DFP .....	91
A. Etude des jeunes virions et des protéines solubles par fractionnement des extraits cellulaires sur gradient de sucrose 25 - 40 % .....	91
B. Etude des virus matures .....	92
III - DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE SEDIMENTATION DE LA PROTEINE MARQUEE AU DFP AU STADE TARDIF .....	94
A. Gel de polyacrylamide non dissociant .....	94
B. Gradient de sucrose 5 - 20 % .....	94
IV - TEST D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU CAPSOMERE HEXON .....	95
V - ISOLEMENT DE LA PROTEINE 120.000 MARQUEE PAR LE DFP .....	98
A. Electrophorèse préparative et élution .....	98
B. Contrôle électrophorétique de l'éluat .....	98
<u>DISCUSSION DE LA TROISIEME PARTIE</u> .....	100
<u>CONCLUSION GENERALE</u> .....	104

	Page
<u>LEXIQUE</u> .....	108
<u>TECHNIQUES PREPARATIVES</u> .....	110
I - CULTURES DE CELLULES .....	110
A. Cellules KB en suspension	110
B. Cellules Hela en monocouche	110
II - PREPARATION DU VIRUS .....	110
A. Infection	110
B. Extraction	111
C. Préparation de virus marqués à la valine <sup>14</sup> C	111
III - PURIFICATION DES PROTEINES SOLUBLES DE L'ADENOVIRUS ...	112
A. Préparation des hexons normaux et lents	112
B. Préparation des hexons normaux et lents marqués à l' <sup>125</sup> Iode	113
C. Purification supplémentaire des hexons sur hydroxyapatite	113
IV - ISOLEMENT DES GROUPES DE 9 HEXONS .....	114
V - PREPARATION DES PROTEINES MARQUEES AU DFP .....	115
A. Infection	115
B. Marquage	115
C. Fractionnement sur gradient de sucrose 25-40 %	116
D. Electrophorèse préparative et élution	116
<u>TECHNIQUES ANALYTIQUES</u> .....	117
I - METHODES DE DOSAGE .....	117
A. Dosage des protéines	117
B. Détermination de la radioactivité des échantillons	117

	<u>Page</u>
II - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE .....	117
III - ELECTROPHORESES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE .....	118
A. Etude des protéines natives en milieu non dissociant	118
B. Etude des polypeptides en milieu dissociant	118
C. Coloration des gels	119
D. Autoradiographies des gels	119
IV - ISOELECTROFOCALISATION .....	120
V - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES .....	120
A. Antisérums	120
B. Immunodiffusion (Technique d'Ouchterlony)	121
C. Immunoélectrophorèse	121
D. Immunoélectrophorèse en double dimension (Technique de Laurell)	121
E. Immunoprécipitation avec la protéine A de Staphylococcus Aureus	122
VI - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES .....	123
A. Composition en acides aminés	123
B. Hydrolyses enzymatiques spécifiques	124
C. Cartes peptidiques : électrochromatographies	124
D. Détermination de l'acide aminé N-terminal par dansylation	124
VII - TECHNIQUES OPTIQUES : MESURE DES SPECTRES DICHROIQUES	126
A. Principe du dichroïsme circulaire	126
B. Appareil et conditions expérimentales	126
C. Expression des résultats	126
D. Interprétation du spectre	127
<u>B I B L I O G R A P H I E</u> .....	129

INTRODUCTION

---

Les virus sont constitués d'un seul type d'acide nucléique (DNA ou RNA) protégé par une coque protéique : la capside. Pour se multiplier ils ont besoin de certains systèmes enzymatiques cellulaires. Les cellules infectées par les virus vont fabriquer les différents constituants viraux en utilisant le programme génétique contenu dans l'acide nucléique viral et les assembler en particule virale. Le génome viral est en général de petite taille et ne contient qu'un nombre restreint d'informations. C'est pourquoi les capsides virales sont constituées d'unités protéiques identiques : les capsomères.

Chez les Adénovirus 240 sous-unités protéiques identiques appelées capsomères "hexons" interagissent entre elles pour former une capside icosaédrique et 12 autres sous-unités appelées "pentons" constituent les sommets de la particule virale. Bien que très étudiés, les hexons, capsomères majeurs de la capside, sont encore mal connus du point de vue structural et le mécanisme de leur assemblage reste à élucider. En particulier les interactions existant entre les capsomères hexons, le rôle structural et morphogénétique des protéines de faible poids moléculaire associées aux hexons et les phénomènes de régulations sont encore inconnus.

Nous avons dans notre laboratoire essayé de mettre en évidence les particularités structurales et fonctionnelles des hexons qui leur permettent d'avoir un rôle dynamique dans l'assemblage.

Dans la première partie de ce travail, nous avons caractérisé immunologiquement et biochimiquement une classe spéciale d'hexons (les "hexons lents") isolés lors de la purification des protéines de capsidie et nous avons étudié leur implication possible dans la morphogénèse des adénovirus.

Ensuite l'assemblage des hexons a été envisagé à deux niveaux :

1. au niveau des capsomères, nous avons étudié les interactions qui se forment lorsque les hexons sont assemblés en capsidie virale, ainsi que la localisation d'une protéine de faible poids moléculaire associée aux hexons dans les faces de l'icosaèdre (Deuxième partie) .
  2. au niveau des sous-unités polypeptidiques, nous avons recherché la présence d'un "site actif" à sérine jouant un rôle lors du repliement des chaînes polypeptidiques et de leur assemblage en capsomère (Troisième partie) .
-

Une partie de ces travaux a fait l'objet des publications suivantes :

Boulanger, P., Devaux, C. et P. Lemay

Isolation and characterization of a slow-migrating class of  
Adenovirus type 2 hexons.

Virology 84, Février 1978

Boulanger, P.A., Devaux, C. et M.H. Loucheux

Comparative optical properties of free and assembled hexon  
capsomeres of human adenovirus type 2

FEBS Letters, 85, 1978 P. 52-56

GENERALITES

STRUCTURE DE L'ADENOVIRUS ET DE SES SOUS-UNITES

## LES ADENOVIRUS



Isolés pour la première fois en 1953 par ROWE et coll. (1) dans des cultures de cellules d'amygdales humaines, les adénovirus sont responsables d'affections respiratoires et digestives, de conjonctivites, et peuvent persister longtemps à l'état latent dans les amygdales, les végétations adénoïdes et les ganglions lymphatiques.

Actuellement 33 sérotypes humains ont été isolés et caractérisés, ainsi que 23 sérotypes simiens, 6 bovins, 1 ovin, 2 canins, 4 porcins, 2 murins et 8 ou 9 aviaires.

Les sérotypes humains sont classés suivant leur pouvoir oncogène, c'est-à-dire leur capacité à induire des tumeurs chez les hamsters nouveau-nés (TRENTIN et coll., 1962 - 2 ; HUEBNER et coll., 1962 - 3) :

- 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'injection.
- les adénovirus du groupe C (sérotypes 1, 2, 5, 6) ne sont pas oncogènes mais sont capables in vitro de transformer des cellules embryonnaires de rat (FREEMAN et coll., 1967 - 4).

## I - MORPHOLOGIE DES ADENOVIRUS

---

Deux types de symétrie existent chez les virus : la symétrie hélicoïdale pour les virus en bâtonnet (par exemple le virus de la mosaïque du tabac) et la symétrie cubique pour les virus sphériques. Tous les virus à symétrie cubique actuellement connus ont les éléments de symétrie de l'icosaèdre.

Les études de microscopie électronique de HORNE et coll. en 1959 (5) et VALENTINE et PEREIRA en 1965 (6) montrent que les adénovirus ont une symétrie icosaédrique et qu'ils sont dépourvus d'enveloppe (Fig. 1).

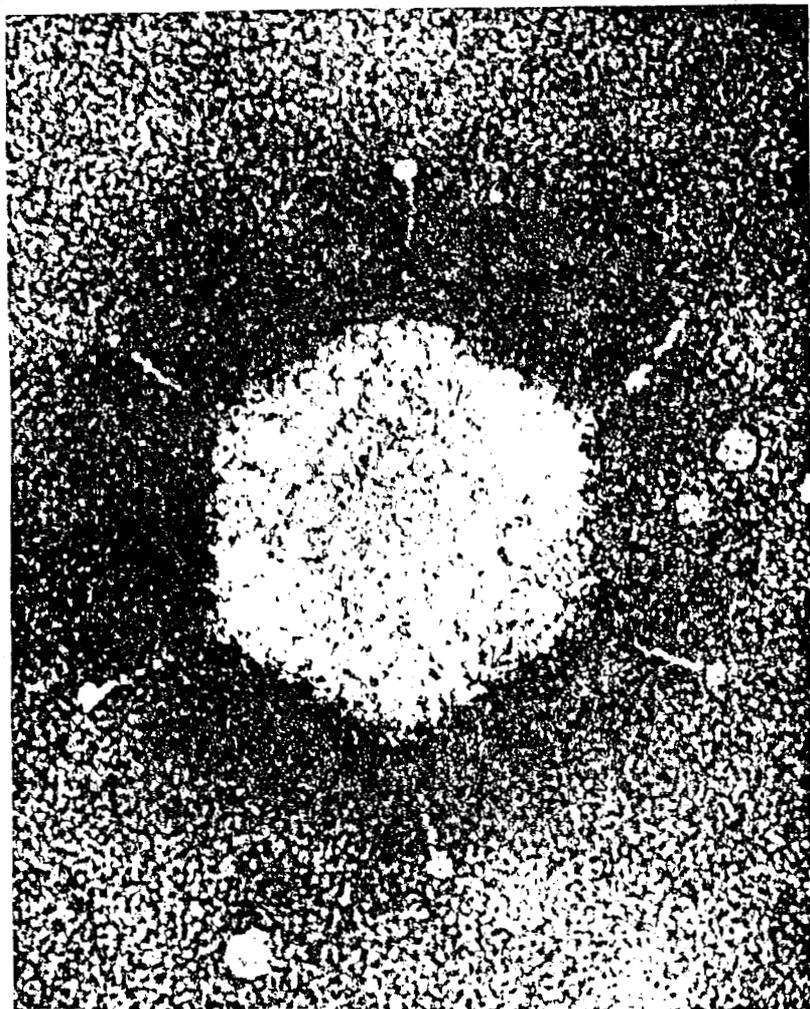
L'adénovirus de type 2 a un poids moléculaire de  $175 \times 10^6$  daltons et une densité de 1,345 en chlorure de césium. Il est constitué d'une capsidie extérieure protégeant un nucléoïde central. Cette capsidie uniquement composée de protéines a un diamètre de 720 Å et possède 20 triangles équilatéraux unis par 30 arêtes et 12 sommets (Revue Générale : PHILIPSON et PETTERSSON, 1973 - 7). Elle est constituée de 252 sous-unités protéiques, les capsomères :

- 240 capsomères ont une symétrie hexagonale. Ils sont situés sur les faces et les arêtes de l'icosaèdre et sont appelés "hexons" car chacun est entouré de six autres hexons.
- 12 capsomères ont une symétrie pentagonale. Ils sont situés aux sommets de l'icosaèdre et sont appelés "pentons". Chaque penton est entouré de cinq hexons (hexons péripentonaux). Le penton possède deux régions distinctes : une base (la base du penton) et une projection (la fibre), de longueur variable suivant les sérotypes, terminée par une spicule.

L'hexon, la base du penton et la fibre sont les constituants majeurs de la capsidie. Ils sont très immunogènes et sont souvent appelés "antigènes de capsidie".

a

7



b

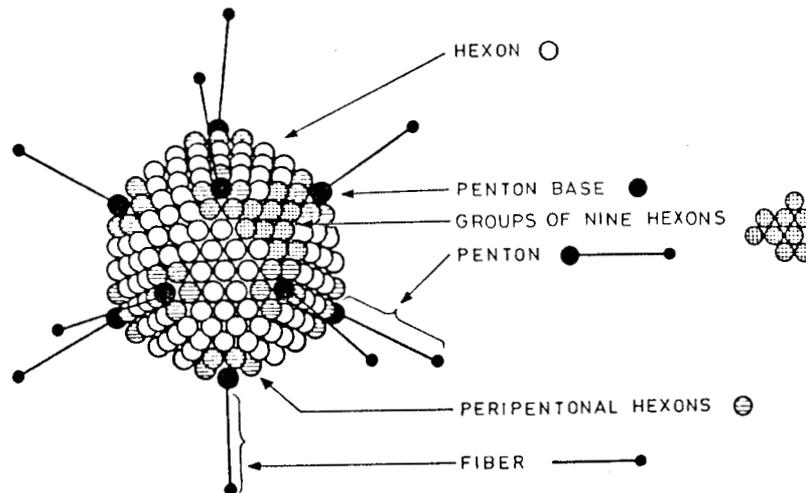


FIGURE 1

a : Adénovirus vu au microscope électronique x 500.000 (Valentine et Pereira, 1965 - 6)

b : Schéma d'un adénovirus et des constituants majeurs de la capsid virale (Philipson et Pettersson, 1973 - 7)



La dégradation de la capsid virale révèle une structure interne constituée de DNA et de protéines. Le DNA est bicaténaire. A l'intérieur de la capsid virale il est circulaire. Sa circularisation est probablement assurée par une protéine virale de 55000 daltons (ROBINSON et coll., 1975 - 8). Il est isolé sous forme linéaire par les méthodes classiques d'extraction utilisant les enzymes protéolytiques (pronase). Son poids moléculaire est de  $23 \times 10^6$  daltons, sa longueur  $12 \mu$  et il n'existe qu'une seule molécule de DNA par particule virale.

## II - COMPOSITION POLYPEPTIDIQUE

-----

La composition en polypeptides de l'adénovirus de type 2 a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant par MAIZEL et coll. en 1968 (9), PEREIRA et SKEHEL en 1971 (10), EVERITT et coll. en 1973 (11) et ANDERSON et coll. en 1973 (12).

14 polypeptides sont dénombrés (Fig. 2) :

- les polypeptides II (hexon), III (penton-base), IV (fibre) ont été identifiés comme les constituants majeurs de la capsid.
- les polypeptides basiques V et VII sont trouvés associés au DNA et forment le nucléoïde du virus ("core").
- les polypeptides VI, VIII et IX sont trouvés associés à l'hexon.
- le polypeptide III<sub>a</sub> est associé aux hexons péripentonaux.
- les polypeptides X, XI et XII n'apparaissent pas lors des marquages courts mais seulement après le clivage des précurseurs P-VI, P-VII et P-VIII en polypeptides VI, VII et VIII.
- les polypeptides IV<sub>a1</sub> et IV<sub>a2</sub> ne sont pas encore localisés.

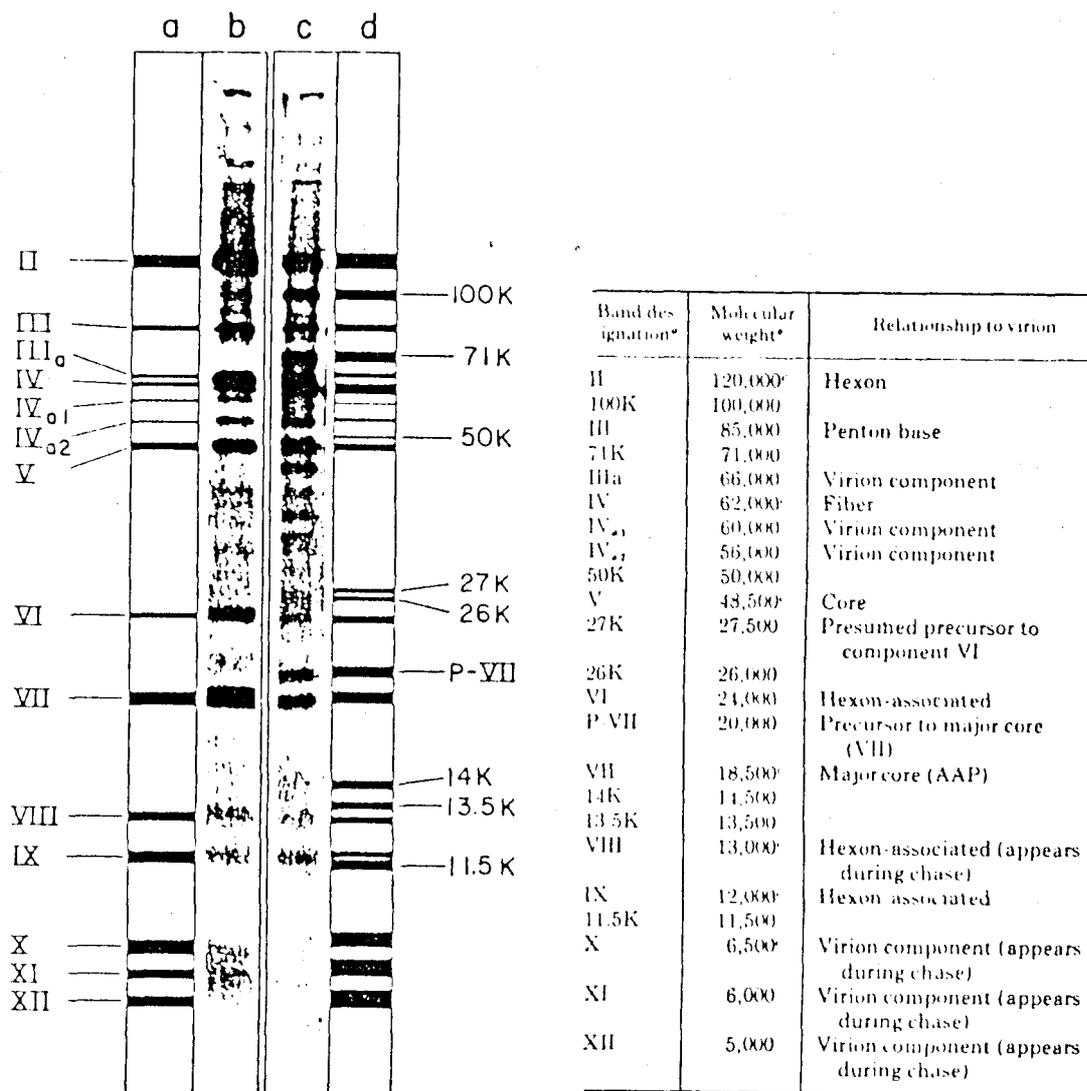


FIGURE 2

Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide - SDS (Anderson et coll., 1973-12)

a : protéines de l'adénovirus de type 2 marquées à la méthionine  $^{35}\text{S}$ .

b : protéines de cellules infectées par l'adénovirus : 22 protéines sont induites par le virus.



- le polypeptide I, inconstant, correspond vraisemblablement à un dimère du polypeptide II de l'hexon mal dissocié.

### III - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

-----

#### A/ ANTIGENICITE

Chaque membre du groupe adénovirus possède des déterminants antigéniques spécifiques du type ne réagissant qu'avec un sérum homotypique en test de neutralisation et des déterminants antigéniques spécifiques du groupe réagissant avec des sérums homo ou hétérotypique par fixation du complément.

#### B/ HEMAGGLUTINATION

Les adénovirus ont été classés par ROSEN en 1960 (13) en fonction de leurs propriétés d'hémagglutination :

- les adénovirus du sous-groupe I (sérotypes 3, 7, 11, 14, 16) donnent une hémagglutination complète avec les érythrocytes de singe.
- les adénovirus du sous-groupe II (sérotypes 8, 9, 10, 13, 19) donnent une hémagglutination complète avec les érythrocytes de rat.
- les adénovirus du sous-groupe III (sérotypes 1, 2, 5, 6, 12, 18, 31) donnent une hémagglutination incomplète avec les érythrocytes de rat qui peut être rendue complète par addition d'un sérum hétérotypique du même sous-groupe. (Fig. 3 A et B).

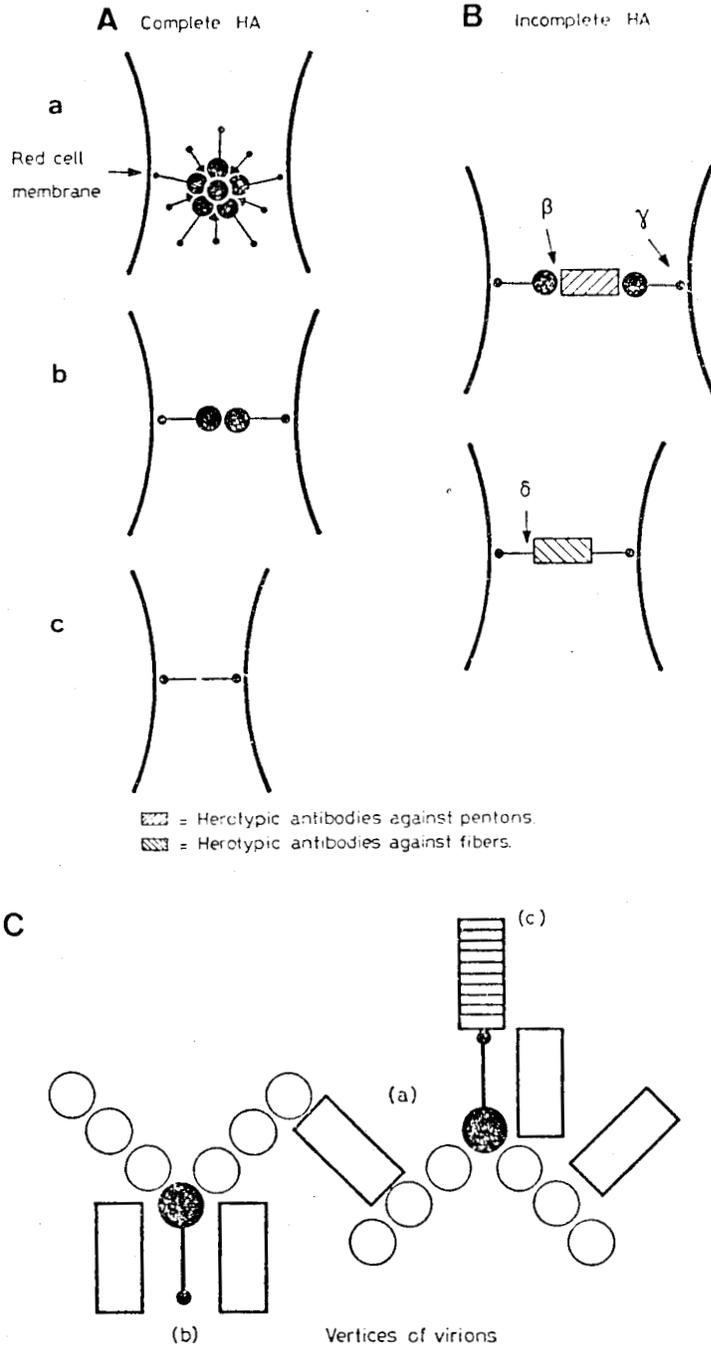


FIGURE 3

- A. Modèle d'hémagglutination (HA) complète en présence d'agglutinines complètes :  
 (a) agrégats de 12 pentons (dodecons), (b) dimères de pentons et (c) dimères de fibres.
- B. Modèle d'hémagglutination incomplète rendue complète par des sérums hétérotypiques.
- C. Inhibition de l'hémagglutination des adénovirus par :  
 (a) agrégation du virus en présence d'anticorps anti-hexon,  
 (b) blocage stérique des fibres par des anticorps anti-hexons péripentonaux,  
 (c) attachement d'anticorps anti-fibre.

( d'après Philipson et Pettersson, 1973 - 7 ).



### C/ EFFET CYTOPATHOGENE PRECOCE

---

Au début du cycle infectieux, à haute multiplicité d'infection, les cellules en culture sur verre s'agglutinent et se détachent.

### D/ IDENTIFICATION FONCTIONNELLE DES PROTEINES

---

L'hexon réagit en fixation du complément avec les antisérums homo et hétérosécifiques. Il est aussi impliqué dans les réactions de neutralisation.

La fibre possède des spécificités antigéniques de type mais est aussi impliquée dans l'hémagglutination partielle.

Le penton est responsable de l'effet cytopathogène précoce et provoque une hémagglutination complète (oligomères du penton) ou incomplète (monomères) (Fig. 3, PHILIPSON et PETERSSON, 1973 - 14).

## LES HEXONS

-----

## I - BIOSYNTHESE DE L'HEXON

-----

Lors de la reproduction de l'adénovirus dans les cellules permissives (cellules humaines poussant en lignée continue KB ou Hela) deux phases peuvent être distinguées :

- la phase précoce, qui se déroule avant le début de la réplication du DNA viral, est caractérisée par la synthèse de RNA messagers et de protéines précoces virales différentes des protéines de structure du virus.
- la phase tardive commence après la réplication. Les RNA messagers et les protéines virales tardives sont alors synthétisées, en particulier les protéines de structure de la capsid. Dès le début de la réplication les synthèses cellulaires sont inhibées.

L'hexon est synthétisé dans le cytoplasme de la cellule infectée à la phase tardive. Il apparaît vers la 10<sup>ème</sup> heure et son maximum de synthèse se situe entre la 18<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> heure. Il est ensuite transporté dans le noyau de la cellule où se fait l'assemblage de la capsid virale.

L'hexon est le constituant majeur du virus puisqu'il y a 240 hexons par particule. Comme la fibre et le penton, il est produit en excès par la cellule. Seulement 1 à 10 % des protéines synthétisées seront assemblées pour former la particule virale.

## II - ISOLEMENT ET ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'HEXON

---

### A/ PURIFICATION DE L'HEXON A L'ÉTAT NATIF

---

La propriété de la cellule de produire les protéines de capside en excès est utilisée pour leur isolement.

Plusieurs techniques de purification ont été décrites, la plupart étant des modifications de la méthode de GREEN et PINA (1963) (15). Des cellules Hela ou KB infectées par de l'adénovirus sont lysées et traitées au Fréon (trichlorotrifluoroéthane) pour éliminer les contaminations cellulaires. Les virions sont séparés des protéines de capside par centrifugation différentielle. Une chromatographie sur DEAE cellulose permet d'éluer séparément la fibre, le penton et l'hexon par augmentation de la force ionique.

Des stades de purification plus importants sont obtenus par des techniques variées :

PETTERSSON et coll. en 1967 (16) utilisent l'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide, et BOULANGER et coll. en 1969 (17) l'électrophorèse en film liquide.

WADELL en 1970 (18), SHORTRIDGE et BIDDLE en 1970 (19) adaptent une méthode très résolutive, l'isoélectrofocalisation, mais par cette technique les hexons ont tendance à précipiter à leur point isoélectrique (pHi).

BOULANGER et PUVION en 1973 (20) présentent une technique simple de préparation qui permet d'obtenir les protéines de capside en grande quantité et à l'état natif. Elle comprend trois étapes : précipitation par un sel neutre, chromatographie sur échangeur d'ions et chromatographie d'absorption (hydroxyapatite). Les préparations obtenues sont homogènes du point de vue immunologique et électrophorétique (gel de polyacrylamide) et par observation en microscopie électronique.

## B/ DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE

---

La constante de sédimentation de l'hexon de type 2 est de 12,9 S (FRANKLIN et coll., 1971 - 21). La détermination du poids moléculaire de l'hexon fut un problème très discuté.

Pour l'hexon dénaturé en milieu SDS (dodecyl sulfate de sodium), MAIZEL et coll. en 1968 (22) trouvent un poids moléculaire de 120.000 daltons par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. PETTERSSON en 1970 (23) par la même technique et par gel filtration de l'hexon réduit et alkylé, obtient un poids moléculaire de 60.000.

C'est par l'étude des cristaux d'hexon que CORNICK et coll. en 1973 (24) déterminent un poids moléculaire de 95.000 pour l'hexon dénaturé et de 309.000 pour l'hexon natif de type 5.

FRANKLIN et coll. en 1971 (25) par sédimentation à l'équilibre et par détermination de la constante de diffusion, déduisent pour l'hexon de type 2 un poids moléculaire de 313.000 à 356.000 daltons.

Considérant les trois groupes d'études suivants : analyse des cristaux, analyse physico-chimique et dosage des groupes - SH des cystéines (GRÜTTER et FRANKLIN, 1974 - 26, JÖRNVALL et coll., 1974<sub>a</sub> - 27) il est actuellement admis que le poids moléculaire de l'hexon de type 2 est de 360.000 lorsqu'il est à l'état natif et de 120.000 lorsqu'il est dénaturé. On peut donc conclure que l'hexon natif est constitué de trois sous-unités de 120.000. Le poids moléculaire de l'hexon de type 5 est légèrement inférieur à celui du type 2 (3 x 110.000).

## C/ CRISTALLISATION

---

L'hexon fut la première protéine d'un virus animal à être cristallisée. La méthode de cristallisation a d'abord été décrite par PEREIRA

et coll. en 1968 (28). Des hexons de type 5 purifiés sont dialysés contre du phosphate monopotassique 0,8 M. Le précipité formé est graduellement (en 24 h) transformé en cristaux. Ces derniers sont tétraédriques, d'une taille supérieure à 0,1 mm, et appartiennent au système cubique.

FRANKLIN et coll. en 1971 (29) utilisent des tampons citrate de pH variables. Ils obtiennent à pH 3,7 des cristaux pyramidaux semblables à ceux de PEREIRA, à pH 3,3 - 3,6 des cristaux de formes transitoires et à pH 3,2 des cristaux qui sont devenus bipyramidaux (Fig. 4). Les études de ces cristaux permettent de dire que l'hexon possède un axe de symétrie ternaire.

#### D/ PROPRIETES OPTIQUES

---

En 1972, BOULANGER et LOUCHEUX (30) et DAY et coll. (31) étudient les propriétés optiques des hexons de type 2 par absorption en UV, dichroïsme circulaire et dispersion optique rotatoire. Ces techniques apportent des renseignements sur la conformation des protéines, en particulier elles ont permis de calculer les pourcentages en structures ordonnées (hélice  $\alpha$  et structure  $\beta$  en feuillet plissé).

Les résultats suivants sont obtenus pour l'hexon natif :

	BOULANGER et LOUCHEUX	DAY et coll.
hélice $\alpha$	20 à 30 %	17 %
structure $\beta$	30 à 40 %	26 %
structure inordonnée	40 %	56 %

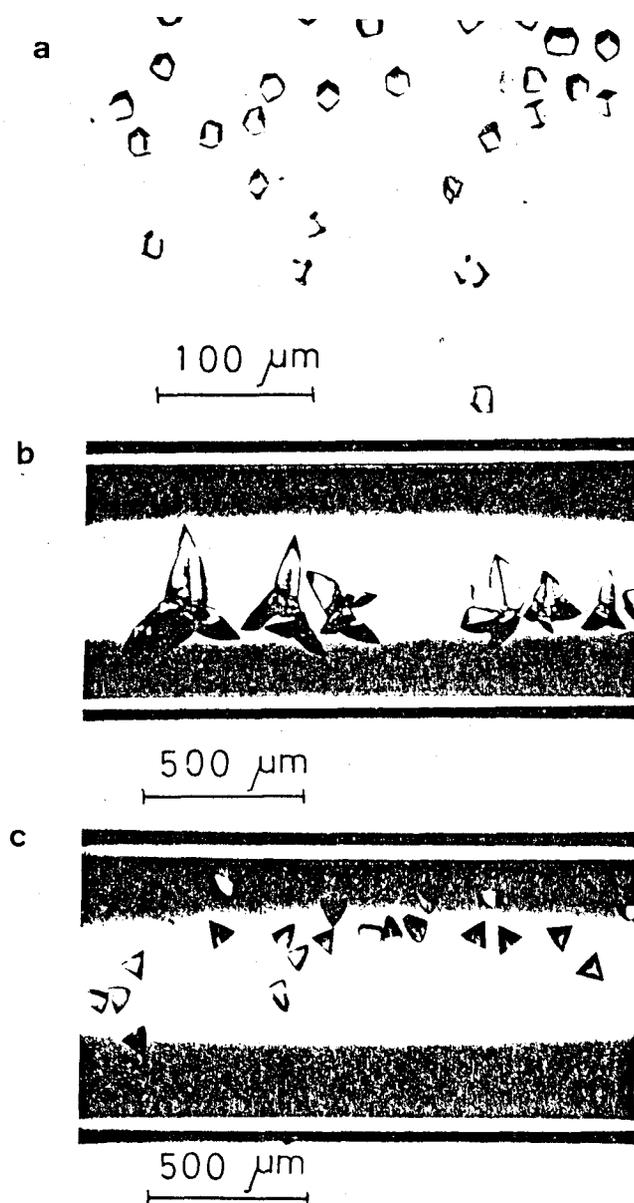


FIGURE 4

---

Cristaux d'hexons d'Adénovirus de type 2 obtenus dans des tampons citrate :

- a. pH 3,2 : formes pyramidales
- b. pH 3,5 : formes transitoires
- c. pH 3,7 : formes bipyramidales

(Franklin et coll., 1971 - 29)



L'hexon natif présente donc un faible pourcentage d'hélice  $\alpha$ . Ce résultat n'est pas surprenant car l'hexon a une structure polygonale compacte. Or, un grand nombre de protéines globulaires (sauf la globine) se sont révélées relativement pauvres en hélice  $\alpha$ .

Les résultats obtenus pour l'hexon dénaturé en SDS suggèrent un changement de conformation de l'hexon en une structure plus ordonnée de type hélice étendue (BOULANGER et LOUCHEUX, 1972).

## E/ ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE L'HEXON

L'hexon est de nature uniquement protéique. Il est constitué de trois sous-unités. Nous utilisons les termes de "polypeptide hexon" pour désigner la chaîne polypeptidique de 120.000 (monomère) et "hexon" ou "capsomère hexon" pour désigner l'hexon natif (trimère de 360.000).

### 1. Composition en acides aminés

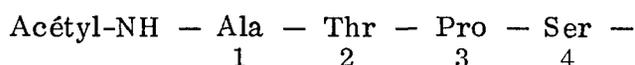
D'après la composition en acides aminés des polypeptides hexons des types 2, 5 et 3 (BISERTE et coll., 1966 - 32 ; PETTERSSON et coll., 1967 - 33 ; BOULANGER et coll., 1969 - 34 ; LAVER, 1970 - 35 et PETTERSSON, 1971 - 36) il n'y a pas de différences majeures entre les trois sérotypes étudiés. Tous les hexons sont riches en acides dicarboxyliques (environ 25 %) et contiennent environ 0,8 % de cystéine.

Les chaînes polypeptidiques de l'hexon possèdent de 950 à 1.000 résidus d'acides aminés. Leur séquence est en cours de réalisation dans le laboratoire de PHILIPSON (Uppsala).

## 2. Peptide N-terminal

-----

L'extrémité N-terminale du polypeptide hexon de type 2 est bloquée (LAVER, 1970 - 37 et PETTERSSON, 1970 - 38). JÖRNVALL et coll. en 1974<sub>b</sub> (39) identifient la nature du blocage et établissent la structure primaire de la région N-terminale. L'hexon purifié à partir de cellules infectées en présence d'acétate  $^{14}\text{C}$ , réduit et carboxyméthylé, est traité par la chymotrypsine. Un seul peptide est marqué au  $^{14}\text{C}$  quand l'hydrolysats enzymatique est analysé par électrophorèse à haut voltage. Ce peptide n'est pas coloré par la ninhydrine et ne possède pas d'acide aminé N-terminal libre. L'enchaînement des acides aminés de ce peptide est déterminé par spectrométrie de masse après perméthylation :



Actuellement les 31 premiers résidus sont connus et séquencés (JÖRNVALL - communication personnelle).

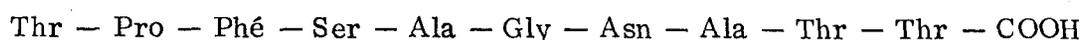
17 méthionines sont détectées dans l'hexon. La première se trouve à la position 5 du peptide N-terminal.

Les études suivantes sur le polypeptide hexon ont été réalisées par JÖRNVALL et coll. en 1974<sub>b</sub> (40).

## 3. Peptide C-terminal

-----

Un peptide non marqué est isolé à partir de l'hydrolysats trypsique de l'hexon  $^{14}\text{C}$ -carboxyméthylé. 10 résidus sont identifiés et séquencés :



Il s'agit vraisemblablement du peptide C-terminal, bien qu'il ait été impossible de vérifier sur la sous-unité entière, l'hydrazinolyse n'ayant pas donné de résultat.

#### 4. Peptides tryptiques

-----

D'après la composition en acides aminés 75 à 80 peptides tryptiques devraient être isolés ; or seulement 65 sont détectés. Ceci est dû à l'insensibilité de certaines régions de l'hexon à l'action des enzymes. En particulier la liaison Lys-Pro n'est pas coupée par la trypsine, et de nombreux enchaînements Lys-Pro ont été identifiés dans l'hexon. D'autre part certains peptides tryptiques peuvent être insolubles.

#### 5. Peptides tryptiques contenant de la cystéine

-----

Les peptides contenant de la cystéine sont isolés et séquencés à partir de l'hexon  $^{14}\text{C}$  - carboxyméthylé digéré par la trypsine. Six résidus de carboxy méthyl cystéine sont détectés et un 7ème est mis en évidence quand l'hexon est digéré par la chymotrypsine. De même un marquage in-vivo avec de la cystéine  $^{35}\text{S}$  permet de dénombrer 7 cystéines par sous-unité.

Le dosage des groupes -SH libre par le chloro-mercurinitro-phénol sur l'hexon natif préparé en absence de thiol ne donne pas de résultat ; en revanche, en présence de dithiothreitol (1 mM) un groupe -SH est accessible par sous-unité. Il doit être sous forme oxydée dans l'hexon natif.

De ces résultats il a été conclu que la sous-unité hexon possède une cystéine libre et trois cystéines formant des ponts disulfures, probablement intra-polypeptidiques.

#### 6. Caractérisation des sous-unités

-----

Un seul type de sous-unité est mis en évidence par chromatographie d'exclusion en milieu dissociant (Guanidine 5 M) de l'hexon réduit et carboxyméthylé. L'analyse des cartes polypeptidiques de chaque fraction du pic d'exclusion permet de conclure que toutes les sous-unités de l'hexon sont identiques.

De plus, l'étude de la distribution des acides aminés dans les peptides connus de l'hexon (environ 25 à 30 % de la séquence) permet d'exclure la possibilité d'unités répétitives dans le polypeptide hexon.

### III - ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'HEXON

-----

Des déterminants de groupe, de sous-groupe et de type sont présents sur l'hexon (NORRBY, 1969 - 41). L'hexon est responsable des réactions de fixation du complément et de neutralisation. Il possède des déterminants de groupe communs à tous les sérotypes et il est l'antigène responsable de l'induction d'anticorps neutralisants. Seuls les anticorps spécifiques des déterminants de type peuvent neutraliser le pouvoir infectieux des virus homologues mais pas celui des autres sérotypes.

Les déterminants spécifiques de type portés par l'hexon interfèrent avec l'hémagglutination des virus des sous-groupes I et II de ROSEN (NORRBY, 1966 - 42). Le mécanisme de cette interférence n'est pas connu mais un empêchement stérique provoqué par l'attachement des anticorps sur les hexons est possible. Les virus du sous-groupe III possédant des fibres plus longues que ceux des autres sous-groupes semblent moins sensibles à cette inhibition (Fig. 3).

#### A/ ETUDE DES DETERMINANTS DE L'HEXON

---

L'arrangement des déterminants antigéniques sur l'hexon a été étudié par protéolyse limitée des hexons de type 2, 5 et 3 (PETTERSSON, 1971 - 43) :

- la trypsine (1 mg/ml) enlève 5 à 10 % du polypeptide, probablement du côté C-terminal, sans changer l'antigénicité de l'hexon.

- la chymotrypsine (1 mg/ml) enlève 20 % du polypeptide et la plupart des déterminants spécifiques de groupe.
- la papaine et la subtilisine à basse concentration (0.1 mg/ml) enlèvent 50 à 60 % du polypeptide. Le polypeptide résiduel est appelé "hexon-core" et possède encore les mêmes déterminants antigéniques que l'hexon-chymotrypsine.
- à concentration plus élevée (1 mg/ml) la subtilisine enlève 10 % de plus du polypeptide et des déterminants de groupe supplémentaires.

Les déterminants spécifiques de type restent inchangés après protéolyse par ces trois enzymes mais ils sont inactivés par le traitement de l'hexon natif avec l'anhydride maléique (10 mg/100  $\gamma$  d'hexon) qui bloque les groupements  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> des lysines.

Les cartes peptidiques de l'hexon natif et de l'"hexon-core" montrent que ce dernier est enrichi en zones hydrophobes.

## B/ ACCESSIBILITE DES DETERMINANTS DE L'HEXON DANS LA CAPSIDE

---

Dans le virion intact les déterminants antigéniques spécifiques de type sont relativement accessibles alors que les déterminants de groupe ne le sont pas. Ceux-ci deviennent aisément détectables sur les hexons purifiés (PETTERSSON, 1971 - 44).

WILLCOX et MAUTNER en 1976 (45) démontrent que tous les hexons possèdent des déterminants de groupe et de type apparemment dans les mêmes proportions et qu'il n'y a pas de différences du point de vue immunologique entre les hexons des faces et des arêtes, les hexons péripentonaux et les hexons que l'on retrouve associés en groupes de 9 après dégradation de la capsid.

NORRBY en 1969 (46) et WADELL en 1972 (47) arrivaient à la conclusion que les anticorps anti-hexon ne se combinent pas facilement avec les virus intacts, en particulier avec ceux du sous-groupe III (Ad 2 , Ad 5), et ils en déduisent qu'il y aurait une "hiérarchie" des déterminants en fonction de leur accessibilité :

- les déterminants spécifiques de type seraient les plus exposés car les anticorps qu'ils induisent peuvent neutraliser directement le virus.
- les anticorps induits par les déterminants spécifiques des sous-groupes ne permettent pas la neutralisation mais peuvent sensibiliser le virus pour une neutralisation ultérieure ; ces déterminants sont probablement moins exposés.
- les anticorps induits par les déterminants spécifiques de groupe ne sensibilisent ni ne neutralisent le virus ; ces déterminants de groupe doivent être enfouis dans le virion.

### C/ NATURE DES DETERMINANTS

La présence de déterminants antigéniques communs à tous les sérotypes et de déterminants antigéniques de type différant d'un sérotype à l'autre, suggère l'existence de régions communes et de régions variables dans les séquences primaires des hexons.

STINSKY et GINSBERG en 1975 (48) étudient par isoélectrofocalisation le comportement des peptides de l'hexon obtenus après coupure au bromure de cyanogène pour les types 2, 5 et 3 :

- un tiers de ces peptides ont une migration identique pour les trois sérotypes (ce sont les peptides communs à un même groupe).
- un tiers ont une migration identique pour les types 2 et 5 appartenant au même sous-groupe (ce sont les peptides communs à un même sous-groupe).
- un tiers ont une migration différente (peptides caractéristiques de chaque type).

Pour un même type d'adénovirus, l'hexon assemblé en capsid n'a pas le même comportement immunologique que l'hexon libre. Pour mettre en évidence le fait que les régions accessibles dans l'hexon libre et l'hexon assemblé ne sont pas les mêmes, l'hexon purifié et le virion sont iodés par la technique à la lactoperoxydase. Seules les tyrosines et les histidines des zones exposées sont marquées. Les électrophorèses comparatives montrent que les peptides iodés dans les hexons purifiés sont en majorité différents des peptides iodés dans le virion. Ce résultat suggère une variation de conformation imposée par la structure tridimensionnelle de l'hexon.

#### IV - ETUDE DU CAPSOMERE HEXON ET DE SES ASSOCIATIONS :

-----

##### ASSEMBLAGE DU VIRUS

-----

Contrairement à certains virus à RNA où, lors de la morphogénèse, l'assemblage des protéines de capsid s'organise autour du RNA viral, le DNA d'adénovirus ne semble pénétrer dans la capsid que lorsque celle-ci est pratiquement terminée. Des intermédiaires d'assemblage ont été isolés et observés en microscopie électronique. Ils se présentent comme des particules d'aspect quasi-sphérique, dépourvues de structure interne (DNA et protéines du "core") et possédant des interstices visibles entre les capsomères de la capsid (SUNDQUIST et coll., 1973 - 49 ; D'HALLUIN et coll., 1978<sub>a</sub> - 50). Il est difficile de déterminer si ces orifices sont au niveau des sommets ou des faces de la capsid. Le rapport hexon-penton plus faible dans les particules incomplètes suggère à SUNDQUIST une localisation de ces ouvertures dans les faces triangulaires.

Pour étudier comment une telle capsid peut se former à partir du capsomère hexon, plusieurs voies d'approche sont envisagées : soit l'étude de la dégradation séquentielle du virus, soit l'étude des associations privilégiées des capsomères.

## A/ DEGRADATION SEQUENTIELLE DU VIRUS

---

Les virus purifiés et dialysés contre un tampon tris-maléate pH 6 à basse force ionique, perdent progressivement leur pouvoir infectieux et leur sensibilité à la DNase s'accroît. Les particules récupérées ont perdu leurs pentons et une incubation de quelques heures à la température ambiante de cette préparation conduit à des structures stables sans pentons ni hexons péripentonaux. En microscopie électronique cette structure semble plus sphérique que le virus (Fig. 5).

Si le virion est soumis à plusieurs cycles de congélations et décongélations, les hexons sont entièrement libérés (16 cycles) alors que le traitement à la pyridine (10 %, v/v) du virion ayant perdu ses pentons libère des groupes de 9 hexons.

Ces différents degrés de dégradation obtenus permettent de déduire que les interactions existantes entre les hexons des faces et des arêtes, entre ces hexons et les hexons péripentonaux et entre les hexons péripentonaux et les pentons doivent être différentes (PRAGE et coll., 1970 - 51).

## B/ PURIFICATION DES GROUPES DE 9 HEXONS

---

Deux techniques de dégradation du virus permettent d'obtenir des préparations riches en groupes de 9 et présentant les mêmes caractéristiques en microscopie électronique:

1. Le virus dialysé à basse force ionique est digéré par la trypsine (0,1 %, 30 mn) puis purifié sur DEAE-Sephadex (PEREIRA et SKEHEL, 1971 - 52).
2. Le virus dialysé est dissocié par 0,5 % de DOC (Désoxycholate de

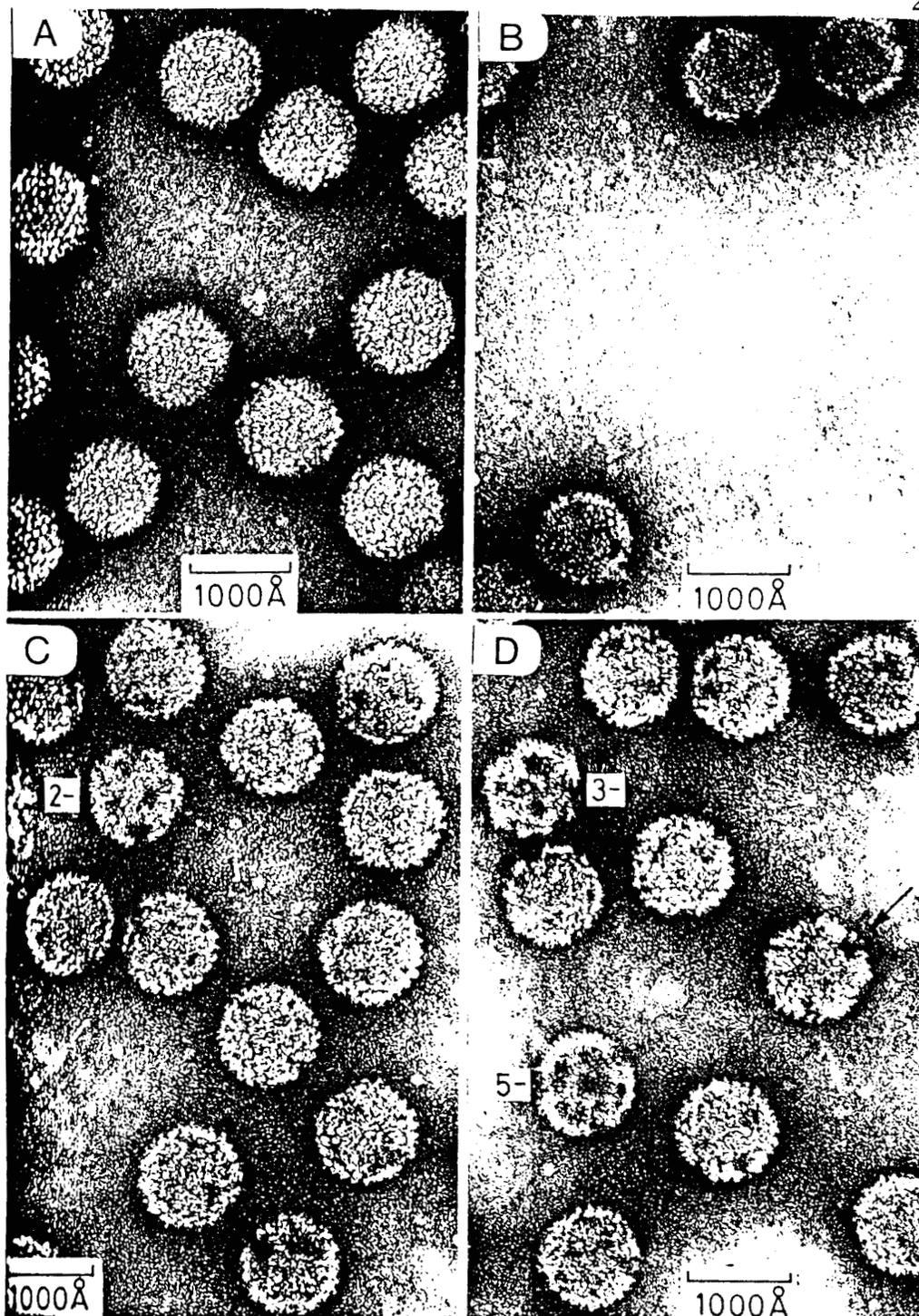


FIGURE 5

Photos de microscopie électronique de virus intacts et de virus ayant perdu leurs pentons ( Prage et coll., 1970 - 51 ).

A : Adénovirus de type 2 intacts.

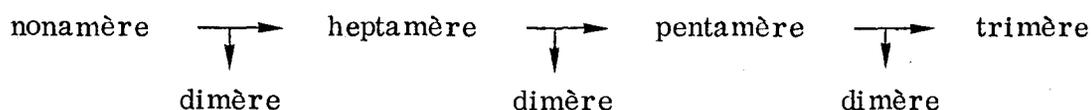
B, C, D : Adénovirus ayant perdu leurs pentons par dialyse ( l'agent de contraste, l'acétate d'uranyl, pénètre dans les cavités formées par le départ des pentons ).

sodium) et chauffé 30 à 60 secondes à 56°C. Un gradient de glycérol de 10 à 30 % permet de séparer les groupes de 9, les "cores" (DNA et protéines internes) et les protéines solubles (RUSSELL et coll., 1971 - 53).

### C/ DISSOCIATION DES GROUPES DE 9

---

En examinant un grand nombre de préparations de groupes de 9, PEREIRA et WRIGLEY en 1974 (54) dénombrent la présence de dimères, trimères, pentamères et heptamères d'hexons, mais jamais de tétramères, hexamères ou octamères. Ils suggèrent que lors de leur dégradation les groupes de 9 perdent d'abord un dimère puis un deuxième et un troisième suivant la séquence :



Les nonamères ou groupes de 9 seraient composés d'un trimère central et de trois dimères liés symétriquement. Cet arrangement préserve la symétrie ternaire des nonamères (CROWTHER et FRANKLIN, 1972 - 55).

Des expériences d'agrégation des capsomères hexons donnent des résultats en accord avec cette hypothèse. Le traitement in-vitro par des agents de pontage bi-fonctionnels comme le glutaraldéhyde des capsomères hexons conduit à la formation préférentielle de dimères et de trimères (BOULANGER et PUVION, 1974 - 56).

De plus, l'hydrolyse enzymatique limitée des capsomères hexons par la papaine à faible concentration (rapport enzyme : substrat, 1 : 50) induit l'agrégation spontanée des hexons en trimères ayant une constante de sédimentation de 19,3 S (l'hexon natif a, dans les mêmes conditions expérimentales, une constante de 10,4 S, c'est-à-dire une constante théorique de 21,6 S pour le trimère d'hexons). L'hexon digéré par la papaine est plus riche en résidus de lysines. Plusieurs coupures semblent provoquées par

l'enzyme, il faut donc supposer que des liaisons très fortes maintiennent l'intégrité de ces agrégats trimériques. Si une protéolyse partielle de l'hexon est nécessaire pour démasquer des sites de liaisons et provoquer l'assemblage, aucune preuve n'est actuellement apportée in-vivo (BOULANGER, 1975 - 57).

#### D/ REASSOCIATION DES GROUPES DE 9

---

Les nonamères purifiés par les deux techniques citées précédemment ont la propriété de se réassocier in-vitro à des valeurs de pH faible en paires de nonamères, en "bagues" de cinq nonamères et en capsides icosaédriques de vingt nonamères qui en microscopie électronique présentent les mêmes caractéristiques que les capsides virales sans sommets (PEREIRA et WRIGLEY, 1974 - 58) (Fig. 6).

#### E/ MORPHOLOGIE DES HEXONS ET DES GROUPES DE 9

---

##### 1. Les hexons

-----

Examinés en microscopie électronique, les hexons sont d'abord apparus comme des "sphères solides" (HORNE et coll., 1959 - 59 ; VALENTINE et PEREIRA, 1965 - 60) ou comme des "bâtonnets polygonaux" avec un trou central (WILCOX et GINSBERG, 1963 - 61). Pour FRANKLIN et coll. en 1972 (62) l'hexon est une macromolécule complexe avec un trou axial et trois sous-unités en forme de "cigare".

A l'aide de photos de microscopie électronique de groupes de 9 RUSSELL et coll. en 1973 (63) examinent les hexons sous deux positions différentes. Si l'hexon est vu de côté il paraît avoir une configuration en X et s'il est vu par au-dessus il présente un trou axial. Un modèle tenant

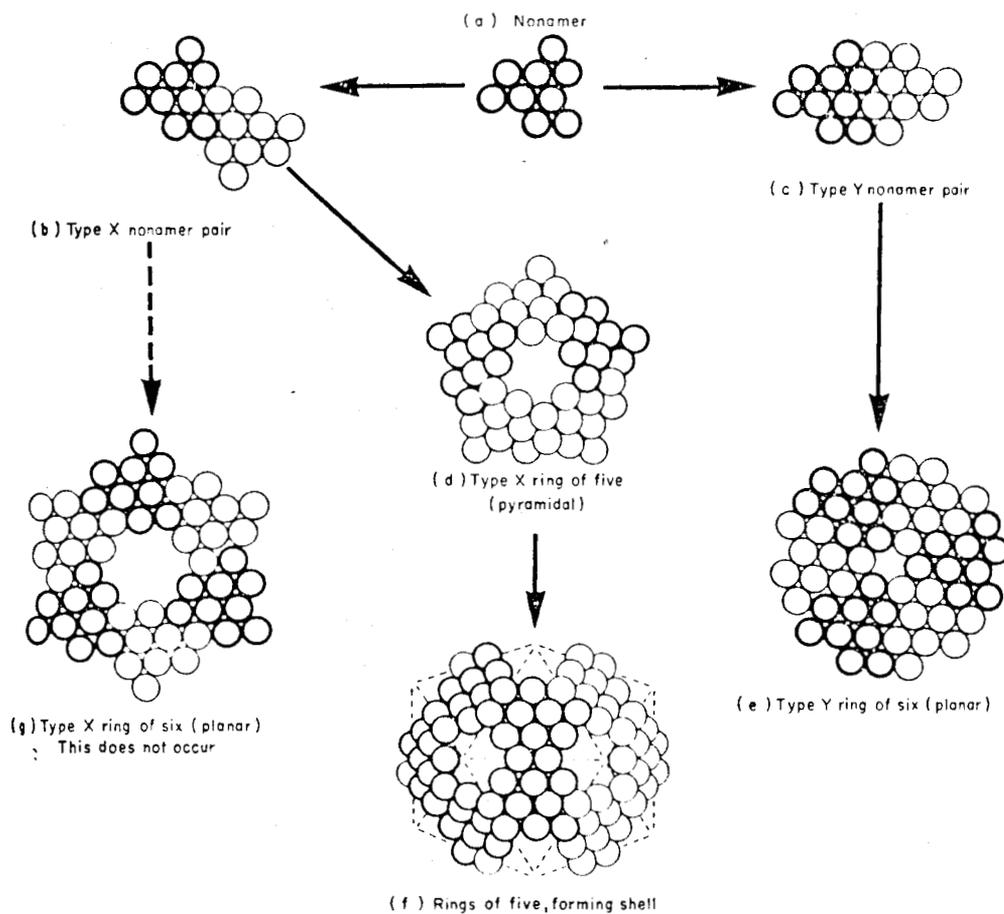


FIGURE 6

Schéma de groupes de 9 hexons à différents stades d'association (Pereira et Wrigley, 1974 - 58).

- a : groupe de 9 (nonamère) .
- b : paire de nonamères (association de type X) .
- c : paire de nonamères (association de type Y) .
- d : "bague" de 5 nonamères (forme pyramidale) :  
seule structure pouvant conduire à la formation d'un icosaèdre (f) .

compte de ces observations est construit (Fig. 7). Chaque chaîne polypeptidique peut être en contact avec chacune des deux autres et peut également interagir avec deux chaînes de deux hexons voisins.

Par des techniques récentes de préparations (cryodécapage) et des techniques traditionnelles de coloration négative utilisées en microscopie électronique, NERMUT en 1975 (64) décrit l'hexon de type 5 comme un "cône" de 110 Å de haut avec une base triangulaire de 96 Å de côté. Le sommet semble arrondi avec un diamètre de 75 Å. La base de l'hexon (ancrée dans la capsid) est plus compacte que le sommet et les sous-unités sont plus épaisses à la base qu'au sommet. Elles sont liées entre elles approximativement à un tiers de la base par des liaisons très fortes, difficiles à rompre (Fig. 8).

Un canal très fin au centre de la base (diamètre de 10 à 15 Å) se dilate vers le sommet en un trou de 25 à 35 Å.

Dans ce modèle les sous-unités (ou "bras") sont supposées rectilignes mais une certaine rotation (ou croisement) n'est pas exclue (comme dans le modèle de RUSSELL), les trois bras étant probablement flexibles. Cette flexibilité permettrait des contacts supplémentaires.

## 2. Les groupes de 9

-----

Les groupes de 9 peuvent se présenter sous deux orientations : gauche ou droite, suivant la disposition régulière des dimères autour du triangle central.

D'après PEREIRA et WRIGLEY en 1974 (65) l'orientation des groupes de 9 dans la capsid est gauche, vue de l'extérieur. L'hexon est donc orienté dans le virus de façon que le plus grand diamètre du canal central soit vu sur l'extérieur de la capsid (Fig. 9).

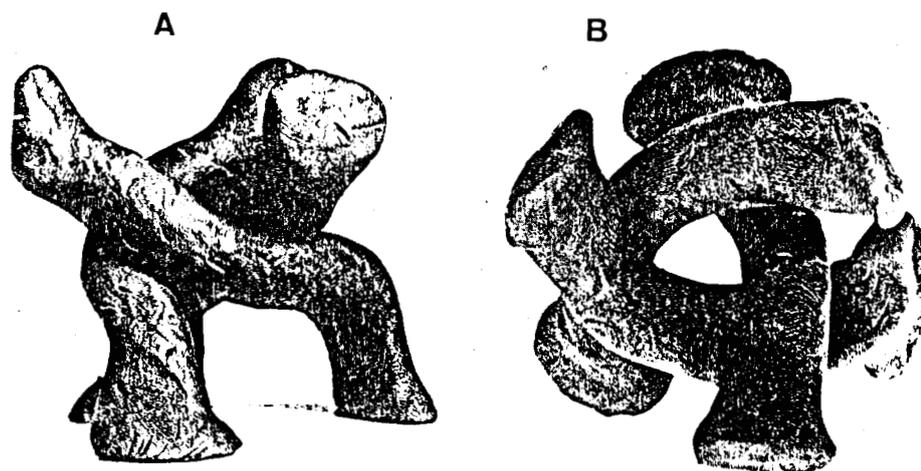


FIGURE 7

---

Modèle montrant l'arrangement possible dans le capsomère hexon de trois chaînes polypeptidiques identiques (Russell et coll., 1973 - 63).

- A. vue latérale
- B. vue externe .

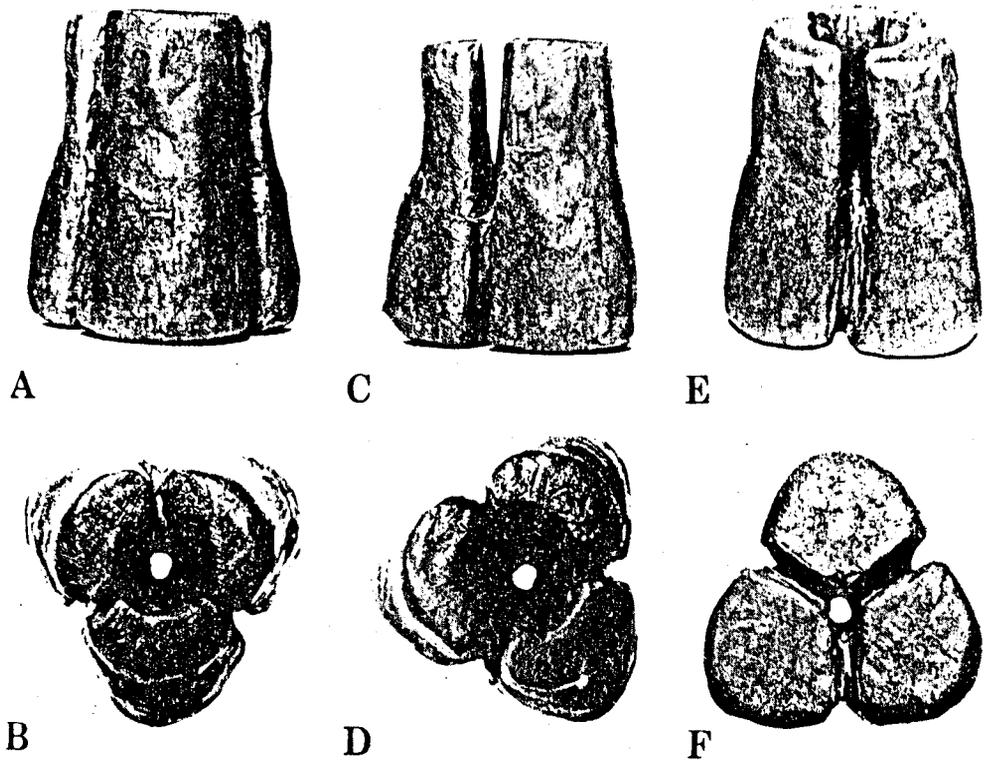


FIGURE 8

Modèle du Capsomère Hexon d'après Nermut en 1975 (64) .

A, C, E : vues latérales, hauteur : 110 Å .

B et D : vues de la face externe .

F : vue de la face interne .

côté de la base triangulaire : 96 Å

diamètre au sommet : 72 Å

canal central, diamètre au sommet : 25 à 30 Å

diamètre à la base : 10 à 15 Å .

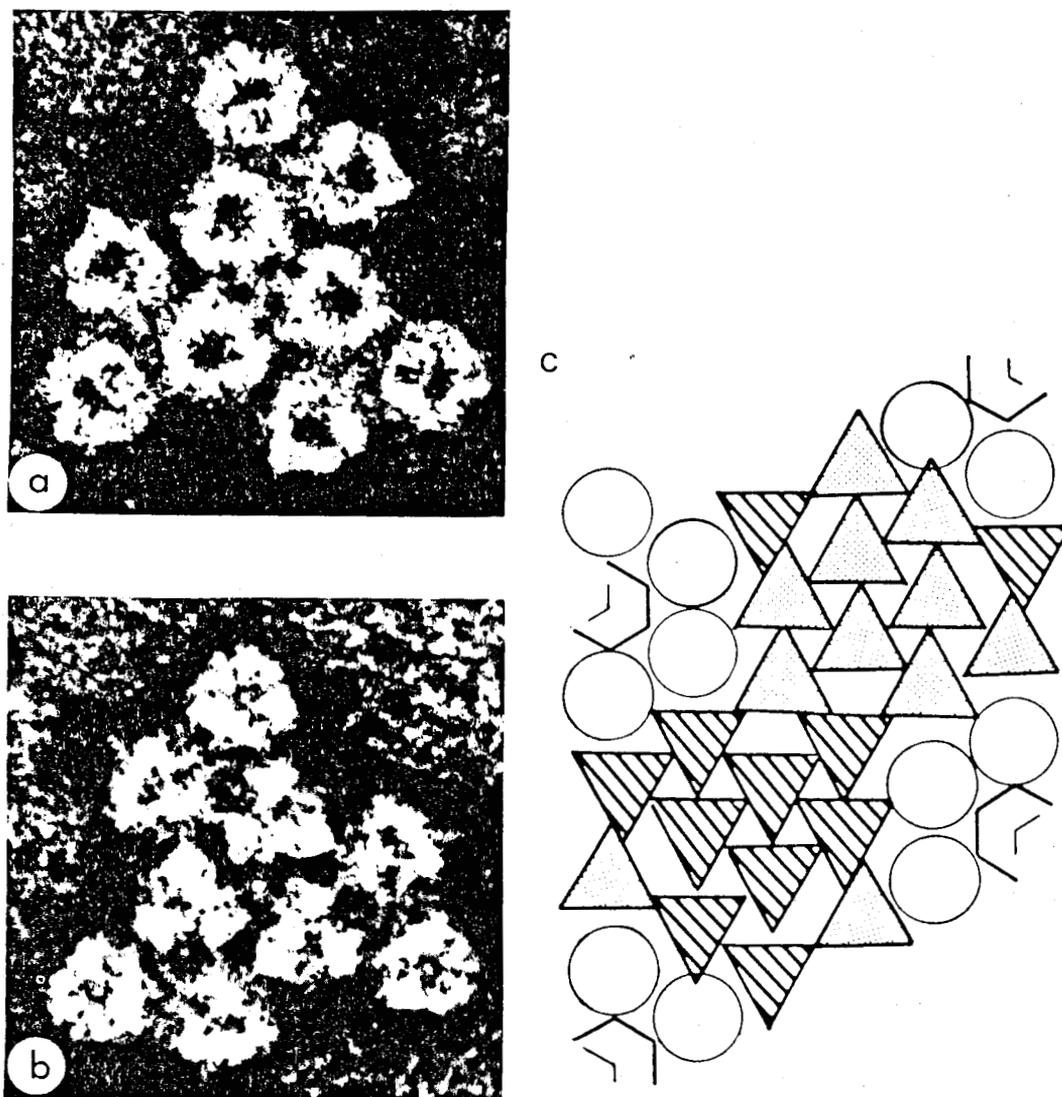


FIGURE 9

-----  
Groupes de 9 hexons

- a. orientation gauche (diamètre du canal central : 25 - 35 Å)  
 b. orientation droite (diamètre du canal central : 10 - 15 Å)  
 c. orientation de deux groupes de 9 hexons : liaison "sommet-arête"  
 à l'intérieur des groupes de 9, liaison "sommet-sommet"  
 entre les capsomères de 2 groupes voisins.

(Photos et modèle d'après Nermut, 1975 - 66).

### 3. Organisation des hexons dans le virus (Fig. 9)

---

En microscopie électronique les hexons des groupes de 9 apparaissent de forme prismatique triangulaire et, dans tous les cas observés, la liaison d'un hexon à l'autre à l'intérieur du groupe de 9 se fait entre le sommet de l'un et l'arête de l'autre (liaison sommet-arête).

Les faces triangulaires de la capsidie icosaédrique étant inclinées à  $60^\circ$ , l'orientation de deux groupes de 9 adjacents est différente et ils forment également un angle de  $60^\circ$  entre eux. Pour cette raison le contact entre les hexons périphériques de deux groupes de 9 contigus ne se fait plus entre un sommet et une arête mais entre deux sommets (liaison sommet-sommet).

Cette organisation peut expliquer pourquoi lors de la dégradation douce de la capsidie virale, les cassures ne se font pas au hasard mais ont lieu à des sites préférentiels libérant des groupes de 9. Dans un milieu hydrophobe les liaisons sommet-sommet sont plus fragiles que les liaisons sommet-arête (NERMUT, 1975 - 66).

#### F/ POLYPEPTIDES ASSOCIES A L'HEXON DANS LA CAPSIDE

---

Des polypeptides de faible poids moléculaire sont associés à l'hexon (EVERITT et coll., 1973 - 67). Ils sont désignés par des chiffres romains suivant leur migration en électrophorèse sur gel de polyacrylamide : VI, VIII et IX. Dans le but de les localiser à l'intérieur ou à l'extérieur de la capsidie, EVERITT et coll. en 1975 (68) utilisent trois techniques : iodation enzymatique par la lactoperoxydase, immunoprécipitation par des sérums spécifiques et réticulation avec des agents bi-fonctionnels clivables :

- les polypeptides VI et VIII n'ont pas de résidu tyrosine ni de déterminants antigéniques accessibles à l'extérieur de la capsidie. De plus, ils sont retrouvés associés à l'hexon même après dégradation du virus en

capsomères. Ils sont localisés à l'intérieur de la capside et probablement associés à tous les hexons ;

- le polypeptide IX n'a pas de résidu tyrosine accessible mais certains de ses déterminants antigéniques sont exposés à la surface du virion. La relativement faible efficacité de l'immunoprécipitation suggère que les déterminants antigéniques sont enfouis entre les hexons. Ce polypeptide est encore attaché à l'hexon dans les groupes de 9 mais lorsque ceux-ci sont dégradés en capsomères il est libéré.

L'ensemble de ces résultats permet aux auteurs de proposer une carte topographique des protéines de l'adénovirus (Fig. 10).

## V - GENETIQUE DE L'HEXON

-----

### A/ CARTE GENETIQUE DE L'ADENOVIRUS

---

Les gènes codant pour les protéines virales ont été localisés sur le DNA viral par traduction in-vitro des RNA messagers viraux (l'origine de ces RNA messagers est déterminée par hybridation avec les fragments de DNA produits par action des enzymes de restriction (Fig. 11<sub>a</sub>)).

Le gène codant pour l'hexon est situé sur le brin r à la position 51,9 - 62,2 (CHOW et coll., 1977 - 69).

Très récemment (Cold Spring Harbor symposium 1977), plusieurs laboratoires ont mis en évidence le fait que le RNA messenger de l'hexon était transcrit à partir de quatre régions différentes et non contiguës du génome et non pas uniquement par la région 51,9 - 62,2 (Fig. 11<sub>b</sub>). Ce phénomène a reçu le nom de "raboutage" des messagers ou "splicing".

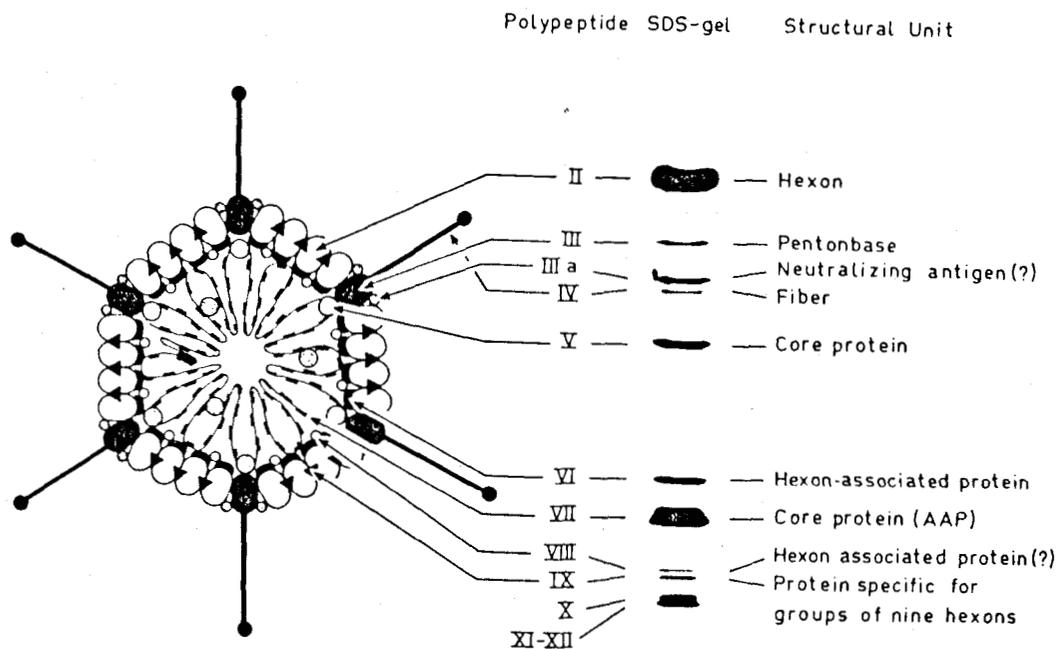


FIGURE 10

---

Modèle topographique de l'adénovirus  
de type 2 .

d'après Everitt, Lutter et  
Philipson, 1975 (68) .



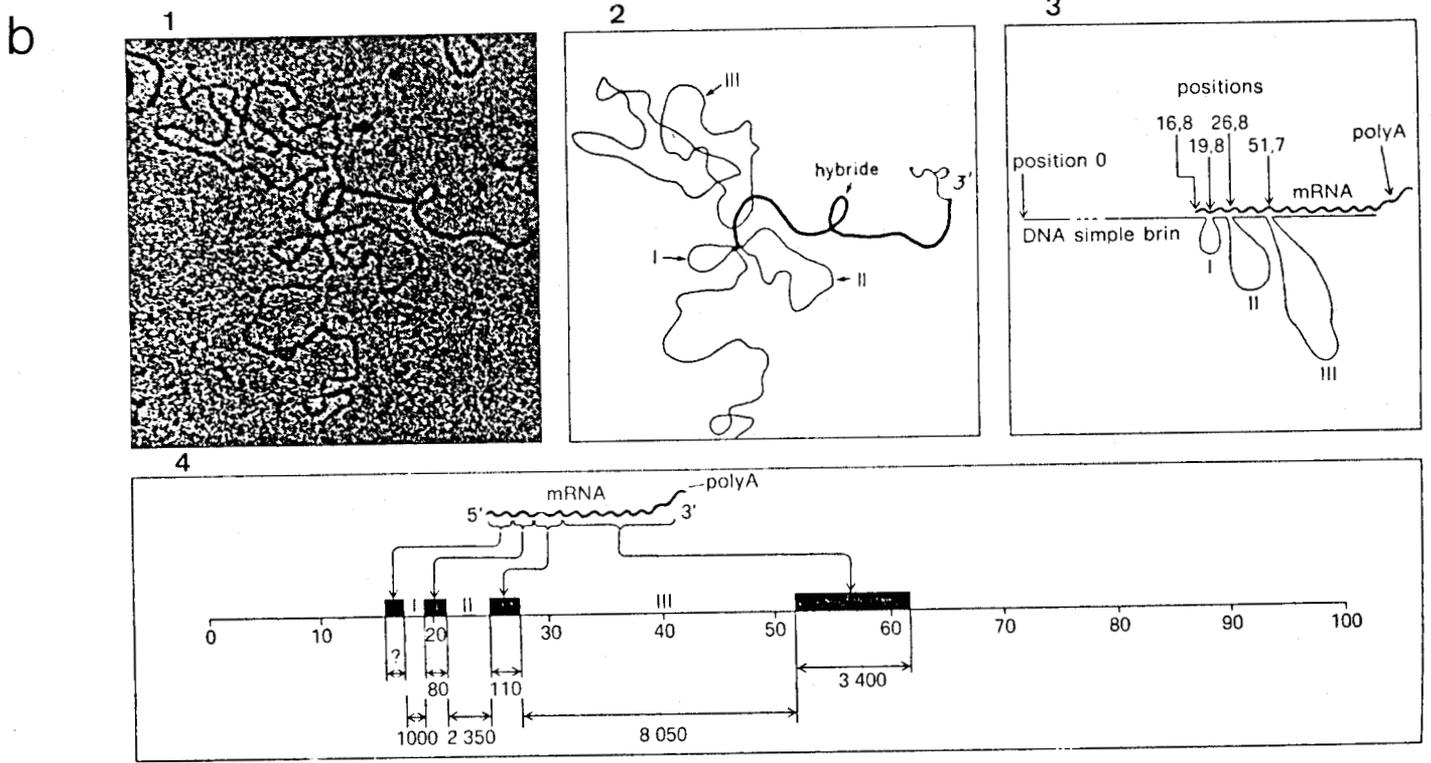
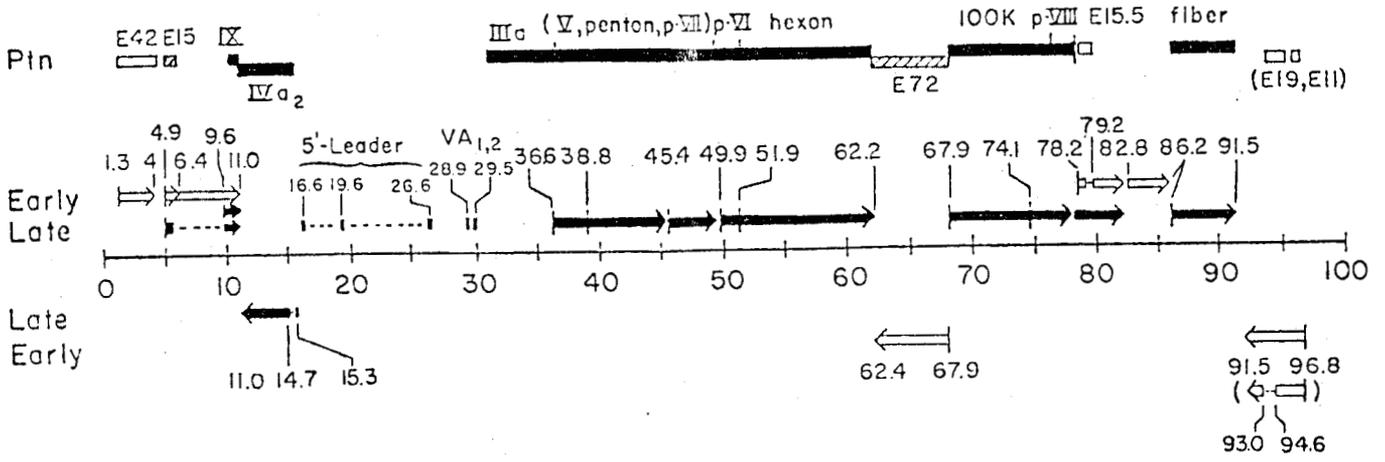


FIGURE 11

- a. Carte génétique de l'adénovirus de type 2 d'après les résultats présentés au Cold Spring Harbor Symposium en 1977 :  
 mRNA précoces  $\Rightarrow$  et tardifs  $\Rightarrow$  transcrits sur le brin r (1) et l (2)  
 et protéines (3) précoces  $\square$  , tardives  $\blacksquare$  et précoces-tardives  $\square$
- b. Hybride formé entre le mRNA d'hexon et le DNA simple brin du fragment A produit par l'action de l'enzyme de restriction ECO-RI (1) et sa schématisation (2 et 3) par Berget et coll., 1977 (80).  
 Localisation sur le génome des différents fragments de RNA associés dans le mRNA de l'hexon (4). Les trois premiers fragments non traduits en protéines sont appelés "sequence guide" (Leader) .



Les trois régions supplémentaires sont courtes (de 80 à 110 nucléotides). Elles semblent être également transcrites dans les RNA messagers de la fibre, du penton et d'une protéine virale tardive non structurale de 100.000 daltons mais ne sont pas traduites dans les protéines. Un tel phénomène est surprenant mais pourrait être expliqué par l'existence d'un RNA précurseur commun aux protéines tardives qui serait clivé. La présence dans le noyau des cellules infectées de RNA "géants" (WALL et coll., 1972 - 70) vient à l'appui de cette théorie.

## B/ MUTANTS

Un certain nombre de mutants thermosensibles de l'adénovirus ont été isolés et caractérisés (Revue Générale : GINSBERG et YOUNG, 1977 - 71). Leur étude est très importante et peut permettre une analyse plus précise des mécanismes moléculaires qui contrôlent la synthèse virale.

Plusieurs étapes au niveau desquelles peut intervenir une mutation sont à considérer au cours de la synthèse de l'hexon et de son assemblage en capsomère puis en capsid : :

### 1. Assemblage des polypeptides hexons en capsomères

-----

Une mutation dans le gène hexon (substitution d'une base nucléique par une autre) peut provoquer le changement d'un acide aminé à un site important de la chaîne polypeptidique et celle-ci devient incapable de se replier normalement pour former un trimère d'hexons. L'hexon n'est alors plus détecté immunologiquement (exemple mutant H<sub>5</sub> ts 10, RUSSELL et coll., 1972 - 72).

Dans certains cas, le trimère peut néanmoins se former à partir d'une chaîne polypeptidique aberrante, mais c'est alors l'assemblage en capsid ou le transport vers le noyau qui est bloqué (H<sub>5</sub> ts 2, RUSSELL et coll., 1972 - 73).

La relation entre le phénotype apparent et le gène codant pour la protéine impliquée n'est pas toujours claire. Par exemple à température non permissive (39,5°) le mutant H<sub>2</sub> ts 48 (WEBER - communication personnelle) induit la synthèse de monomères (120.000) mais pas celle de trimères (360.000). La mutation n'est pas dans le gène codant pour l'hexon mais semble localisée soit dans le gène codant pour une protéine virale tardive non structurale de 100.000 daltons ( la 100 K), soit à l'extrémité gauche du génome.

De même, les mutants H<sub>5</sub> ts 115 et H<sub>5</sub> ts 116 (KAUFFMAN et GINSBERG, 1976 - 74) n'induisant pas d'hexons immunologiquement actifs à 39,5° présentent une mutation dans la région du DNA codant pour la 100 K.

L'absence de protéine 100 K fonctionnelle pourrait donc bloquer l'assemblage du capsomère hexon.

## 2. Transport de l'hexon vers le noyau

-----

Les protéines virales sont synthétisées par les polyribosomes cytoplasmiques et rapidement transportées au noyau de la cellule hôte (VELICER et GINSBERG, 1968 - 75 , 1970 - 76). Lors de l'infection cellulaire par le mutant H<sub>5</sub> ts 147 (KAUFFMAN et GINSBERG, 1976 - 77) à température non permissive, l'hexon capsomère synthétisé est immunologiquement et biochimiquement normal mais se retrouve uniquement dans le cytoplasme. Son transport vers le noyau semble bloqué. Si les cultures cellulaires sont portées à température permissive (33°), le transport a lieu immédiatement et les hexons sont assemblés en virions. Une synthèse protéique est démontrée indispensable au transport et à l'assemblage de l'hexon. Un polypeptide précurseur du polypeptide de structure (VI) associé à l'hexon, le P-VI, est dégradé à 39,5°. Un rôle dans le transport de l'hexon pourrait lui être attribué.

### 3. Formation de capsides

-----

Des mutants d'assemblage, bien qu'induisant la synthèse de protéines de capside normales du point de vue immunologique, ne provoquent pas à 39,5° l'apparition de capsides même vides (H<sub>2</sub> ts 107, D'HALLUN - communication personnelle). D'autres induisent la formation de capsides vides ou de capsides ne contenant qu'un fragment de DNA (H<sub>2</sub> ts 4, KHITTOO et WEBER, 1977 - 78) et (H<sub>2</sub> ts 112, D'HALLUN et coll., 1978<sub>b</sub> - 79) mais la maturation du virus n'a pas lieu.

Une fonction protéique est certainement impliquée dans l'assemblage de l'hexon en capside et dans l'incorporation de "cores" nucléoprotéiques dans le virion (protéines virales de structure et/ou protéines induites par le virion 100 K, 50 K, 39 K ...) mais aucune preuve formelle n'est encore obtenue.

P R E M I E R E      P A R T I E

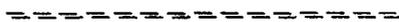
---

ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE CLASSE PARTICULIERE DE

CAPSOMERES HEXONS : LES HEXONS "LENTS".

RÔLE DES HEXONS LENTS DANS LA MORPHOGENESE DU VIRION.

## INTRODUCTION



D'après la structure de la capsid virale on peut, a priori, prévoir plusieurs classes d'hexons dans le virus suivant leur environnement : les hexons péripentonaux, les hexons des faces et ceux des arêtes. Des populations d'hexons possédant des propriétés électrophorétiques et immunologiques différentes ont été mises en évidence.

PRAGE et coll. en 1970 (81) montrent que les hexons péripentonaux isolés lors de la préparation des groupes de 9 par traitement à la pyridine migrent moins vite en électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dissociant, que les hexons purifiés des surnageants de cultures cellulaires infectées.

SHORTRIDGE et BIDDLE en 1970 (82) obtiennent également deux populations d'hexons par dégradation des particules virales.

PETTERSSON en 1971 (83) isole deux classes d'hexons lors d'électrophorèses préparatives sur gel de polyacrylamide. Les hexons de la population mineure ont une migration retardée en gel de polyacrylamide et en immunoelectrophorèse, une taille semblable à celle des hexons normaux mais ils induisent des anticorps neutralisants avec une plus grande efficacité (50 fois plus actifs).

Dans notre laboratoire nous avons isolé une population d'hexons minoritaire, différente de la population normale. L'étude comparative des propriétés immunologiques et biochimiques de ces deux populations a été réalisée dans le but d'obtenir des informations sur leur relation et leurs rôles respectifs dans la morphogenèse de l'adénovirus.

## R E S U L T A T S

=====

 I - SEPARATION DES HEXONS LENTS ET DES HEXONS NORMAUX PAR CHROMATO-  
 -----  
 GRAPHIE SUR ECHANGEUR D'IONS  
 -----

Les antigènes solubles de l'adénovirus (protéines de capsid synthétisées en excès par la cellule infectée) sont purifiés à partir des surnageants de cultures cellulaires infectées, et séparés par chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 équilibré en tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 6,8. L'antigène fibre n'est pas retenu à ce pH et à cette force ionique. Un gradient de chlorure de sodium de 0 à 0,5 M permet d'éluer le penton à 0,1 M NaCl et l'hexon entre 0,35 et 0,40 M d'après la technique de BOULANGER et PUVION en 1973 (84).

Lors de chromatographies sur DEAE-Sephadex de préparations contenant de grandes quantités de protéines, le profil d'élution de la colonne montre souvent un pic supplémentaire ou un épaulement à la base du pic d'hexon. Le matériel protéique du pic mineur s'élue à 0,350 M alors que le matériel du pic majoritaire s'élue à 0,375 M (Fig. 12). Les fractions correspondant à ces deux pics sont rassemblées, concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium à 55 % de saturation et purifiées par une seconde chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 dans les mêmes conditions.

La préparation ayant servi aux études biochimiques des deux classes d'hexons a permis d'obtenir :

- 5,3 mg de protéines purifiées à partir du pic mineur (fractions 125 à 132)
- 22,4 mg de protéines purifiées à partir du pic majeur (fractions 133 à 145).

Les contrôles en microscopie électronique montrent que les fractions provenant des deux pics ne contiennent que des hexons de morphologie normale.

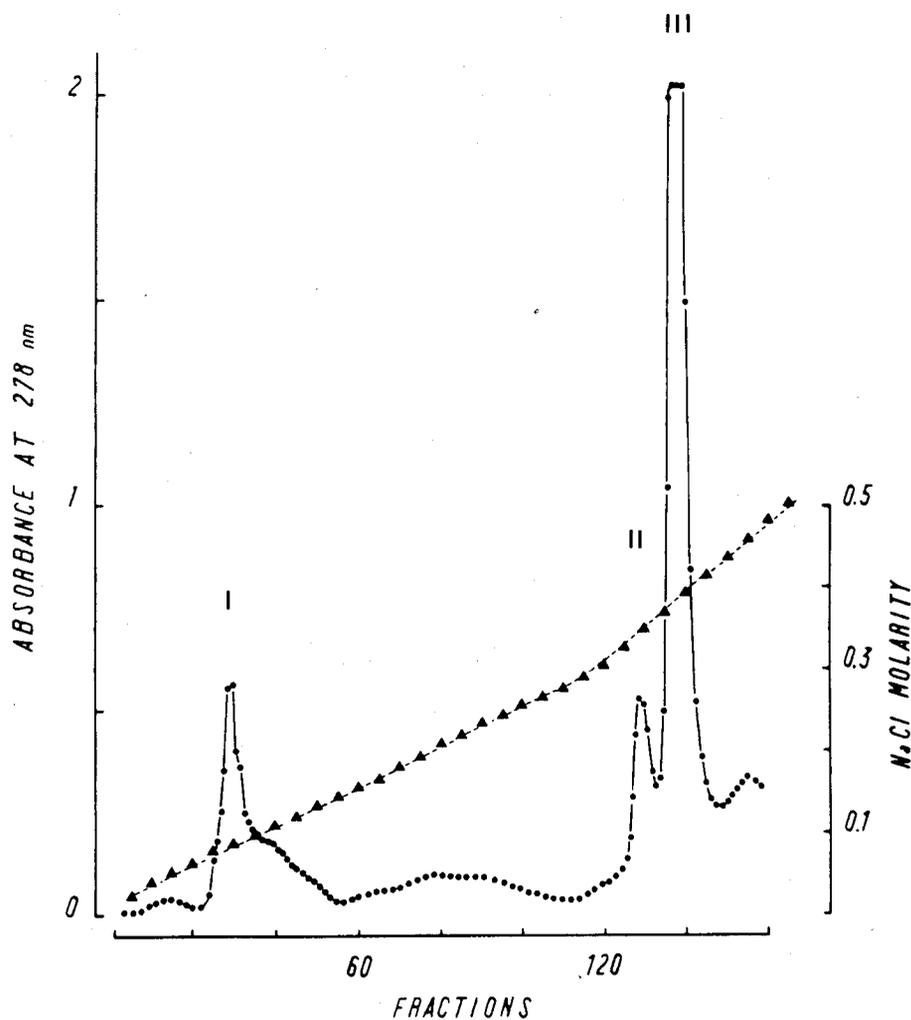


FIGURE 12

Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 des protéines solubles de l'adénovirus.

Le pic exclu (non représenté) contient la fibre, le pic I (0,1 M NaCl) le penton, le pic II (0,350 M NaCl) les hexons lents et le pic III (0,375 M NaCl) les hexons normaux.

L'accroissement de la molarité en NaCl est contrôlé par des mesures de conductimétrie.



## II - CARACTERISATION DES DEUX POPULATIONS D'HEXONS

---

### A/ ANALYSE PAR IMMUNOELECTROPHORESE

---

L'analyse par immunoélectrophorèse en agarose 1 % pH 8,6 en présence d'un sérum anti-hexon montre que les deux classes d'hexons sont actives immunologiquement, mais que l'arc de précipitation de la population mineure est retardé par rapport à l'arc correspondant à la population majeure (les centres des arcs de précipitation ne sont pas alignés) (Fig. 13).

### B/ ANALYSE PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE NON DISSOCIANT

---

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide 5 % à pH 8,9 des protéines natives montre que chaque classe d'hexons est homogène et non contaminée l'une par l'autre (Fig. 14).

Les hexons du pic minoritaire ont une mobilité électrophorétique plus faible que les hexons du pic majoritaire. Ils seront, par la suite, désignés sous le nom d'hexons lents.

### C/ COMPOSITION EN ACIDES AMINES

---

Des différences peuvent être observées dans les compositions en acides aminés des deux classes d'hexons (Table I).

Les hexons lents présentent un pourcentage plus élevé en acides aminés basiques et particulièrement en lysine (16,4 % d'augmentation), ce qui pourrait expliquer leur plus faible migration anodique à pH 8,9.

Une diminution significative est observée pour l'acide aspartique (15,5 % de diminution). Le contenu en acides dicarboxyliques passe de 23 %

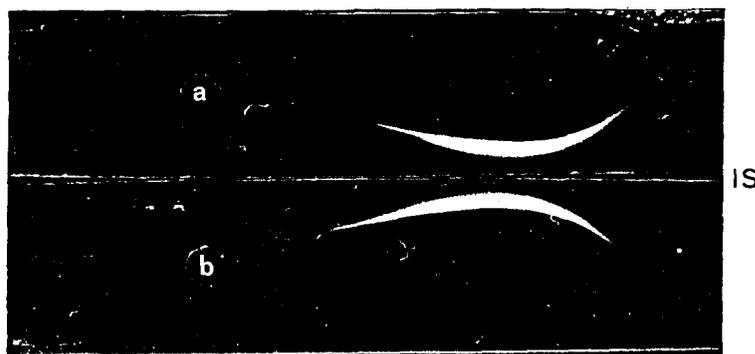


FIGURE 13

-----  
Immunoélectrophorèses d'hexons normaux et  
d'hexons lents .

- a : Hexons normaux (25  $\mu$  g)  
b : Hexons lents (25  $\mu$  g)  
IS : Sérum anti-hexons normaux.



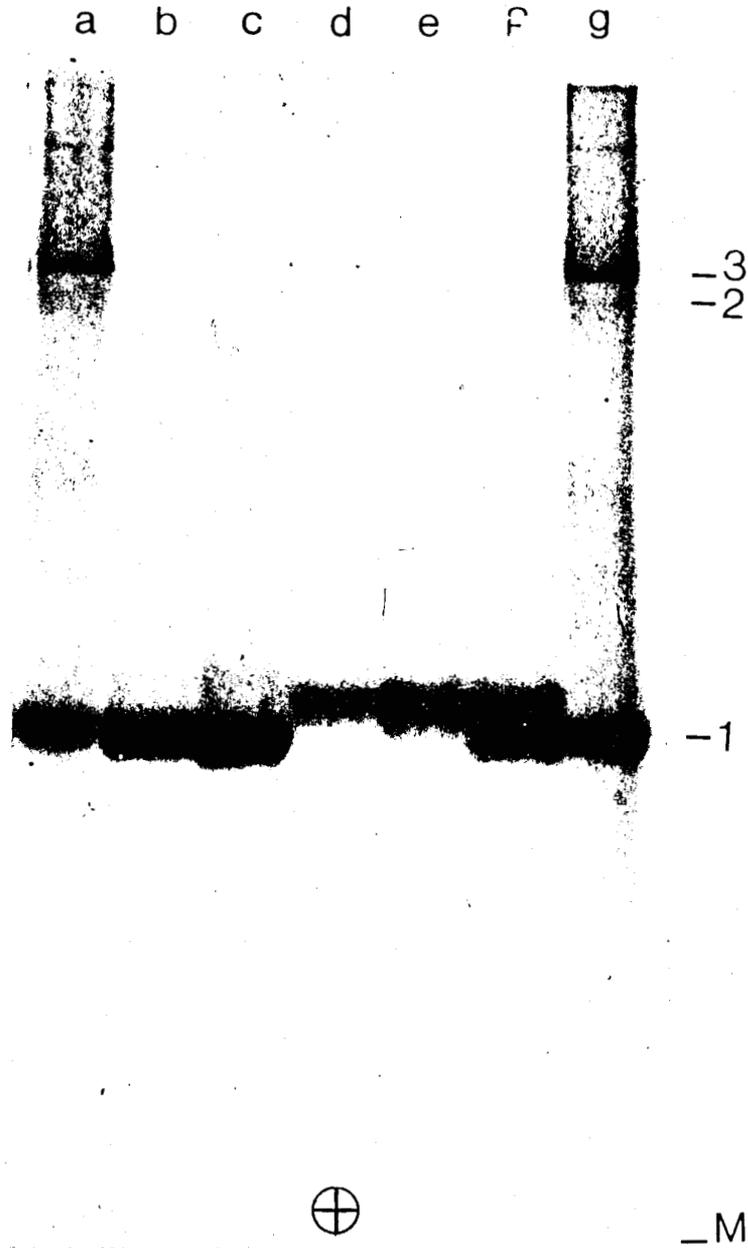


FIGURE 14

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 5 % pH 8,9.

- a et g : Protéines solubles de l'adénovirus de type 2 (45  $\mu$  g)  
 (1) hexon, (2) fibre, (3) penton.  
 b et c : Hexons normaux (b = 22  $\mu$  g, c = 44  $\mu$  g)  
 d et e : Hexons lents (d = 13  $\mu$  g, e = 26  $\mu$  g)  
 f : mélange de 20  $\mu$  g d'hexons normaux et 20  $\mu$  g d'hexons lents  
 M : migration de marqueur (bleu de bromophénol).

La cathode est au sommet du gel.

TABLE I

Compositions en acides aminés des hexons normaux et des hexons lents (a)		
Acide Aminé	Hexon normal (b)	Hexon lent (b)
Asp	14,0	12,7
Thr <sup>c</sup>	7,7	7,4
Ser <sup>c</sup>	7,2	7,1
Glu	9,0	9,7
Pro	6,3	6,4
Gly	7,0	7,2
Ala	7,2	6,9
1/2 - Cys	traces	traces
Val <sup>d</sup>	5,4	5,6
Met <sup>c</sup>	1,7	1,9
Ileu <sup>d</sup>	3,6	4,1
Leu <sup>d</sup>	7,9	7,9
Tyr	5,6	4,9
Phe	4,5	4,5
Lys	4,5	5,2
His	1,7	1,7
Arg	5,3	5,5
Trp	1,3	1,7
Amide <sup>e</sup>	0,50	0,48

(a) moyenne de 2 déterminations après hydrolyse acide et hydrolyse enzymatique. Une différence de 5 à 7 % peut être considérée comme significative.

(b) exprimés en moles pour 100 moles d'acides aminés totaux.

(c) extrapolés au temps 0 de l'hydrolyse.

(d) valeurs déterminées après 72 h d'hydrolyse.

(e) déterminé d'après la différence entre le contenu en acides aspartiques et glutamiques des hydrolyses acide et enzymatique totale.



pour l'hexon normal à 22,4 % pour l'hexon lent. Cette diminution se retrouve dans le contenu en amides : il n'y a plus que 48 % des résidus aspartiques et glutamiques qui sont amidés dans l'hexon lent, au lieu de 50 %.

#### D/ DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE (pHi)

---

L'isoélectrofocalisation permet de déterminer le pHi des hexons des deux classes. Les hexons lents ont un pHi de 4,9 et les hexons normaux un pHi de 4,7. Cette différence de 0,2 unité de pH est constante après plusieurs déterminations. Les hexons lents sont plus basiques que les hexons normaux comme le laissait prévoir leur comportement sur DEAE-Sephadex : moins acides, ils sont moins retenus sur résine échangeuse d'anions.

### III - COMPARAISON DES PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

---

#### A/ ASSOCIATION POSSIBLE AVEC DES POLYPEPTIDES DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE

---

La technique de double immunodiffusion est employée pour déterminer si les hexons lents ne seraient pas des hexons normaux associés à des polypeptides de faible poids moléculaire comme le suggérait PETERSSON en 1971 (85). Trois polypeptides sont habituellement trouvés associés à l'hexon (EVERITT et coll., 1973 - 86) : le VI, le VIII et le IX.

Les hexons lents sont analysés en double immunodiffusion contre des sérums anti-VI, anti-VIII et anti-IX. Aucune réaction immunologique n'est obtenue avec ces antisérums. Les hexons lents ne sont probablement pas associés à l'un de ces peptides.

## B/ POUVOIR ANTIGENIQUE DES HEXONS NORMAUX ET DES HEXONS LENTS

---

Pour comparer l'antigénicité des deux hexons, des immunoélectrophorèses en double dimension sont réalisées suivant la technique de LAURELL avec un dépôt unique ou des dépôts en tandem. En utilisant ces techniques il a été montré que la surface de l'immunoprécipité rend compte du nombre de déterminants antigéniques présents et que l'intensité de la coloration par le bleu de Coomassie correspond à la quantité de protéines dans cet immunoprécipité (LAURELL, 1965 - 87 ; KRØLL en 1973 - 88 ; WEEKE en 1973 - 89 et MARTIN et coll. en 1975 - 90).

Deux sérums sont utilisés : un sérum anti-hexon de l'adénovirus de type 5 qui révèle les déterminants de groupe, et un sérum anti-hexon digéré par la papaine qui révèle uniquement les déterminants de type.

La Figure 15 met en évidence la différence de mobilité électrophorétique par la présence d'un "épaulement" correspondant aux hexons lents sur le pic de précipitation des hexons normaux (a) ou par un pic distinct d'hexons lents (c). Par co-électrophorèse (a) et par électrophorèse en tandem (b), les hexons normaux et les hexons lents réagissent d'une façon identique avec le sérum anti-hexon de type 5. Les surfaces des pics de précipitation des hexons normaux et des hexons lents sont dans le même rapport (36,5 : 15,9) que la quantité de protéines déposées dans les puits de départ (27,5 : 13,25). Les déterminants de groupe ont la même réactivité pour les deux classes d'hexons.

Avec le sérum anti-déterminants de type, la même surface de précipitation est obtenue pour les hexons normaux et pour les hexons lents (34,0 : 30,5) alors que le dépôt d'hexons lents est deux fois plus faible que celui des hexons normaux (27,5 : 13,25). Les hexons lents auraient deux fois plus de déterminants antigéniques spécifiques du type accessibles que les hexons normaux.

La coloration au bleu de Coomassie des immunoprécipités provoqués par les hexons lents est plus faible, ce qui vérifie le fait que deux fois moins de protéines sont déposées dans les puits de départ.

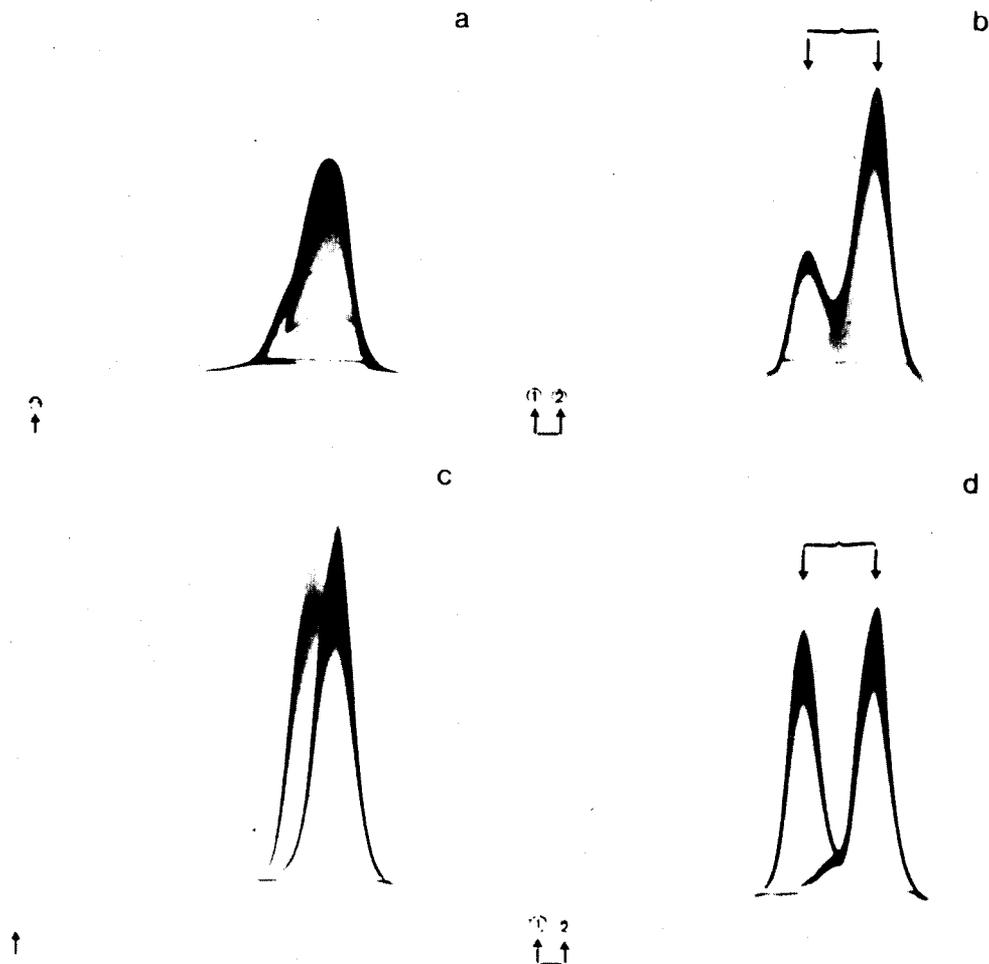


FIGURE 15

Immunoélectrophorèses en double dimension

- a et c : 27,5  $\mu$ g d'hexons normaux et 13,5  $\mu$ g d'hexons lents dans le même puits
- a : dans la seconde dimension l'agarose contient 350  $\mu$ l de sérum anti-hexon de l'adénovirus de type 5 (anti déterminants de groupe)
- c : dans la seconde dimension l'agarose contient 100  $\mu$ l de sérum anti "papain-core" de l'hexon (anti déterminants de type).
- b et d : Dépôts en tandems : 27,5  $\mu$ g d'hexons normaux et 13,5  $\mu$ g d'hexons lents dans des puits différents (2 et 1, respectivement).
- Dans la seconde dimension des quantités de sérum analogues à (a) et à (c) sont mélangées à l'agarose.

L'anode est à droite dans la première dimension et au sommet dans la seconde.

IV - COMPARAISON DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES DES HEXONS NORMAUX ET DES
 

---

 HEXONS LENTS
 

---

 A/ CARTES PEPTIDIQUES
 

---

Les études immunologiques montrent que les hexons lents diffèrent des hexons normaux par leurs déterminants de type. De plus, les compositions en acides aminés des hexons des deux classes sont significativement différentes. Il peut donc y avoir des modifications de la séquence d'acides aminés à certains sites antigéniques localisés à l'extérieur des capsomères hexons.

 1. Marquage à l'  $^{125}$  Iode
 

---

Dans le but d'établir les cartes peptidiques des hexons des deux pics, les protéines purifiées natives sont iodées à l'  $^{125}$  Iode par l'intermédiaire de la Chloramine T.

Environ 2  $\mu$  g d'hexon normal et 2  $\mu$  g d'hexon lent sont marqués avec une efficacité de  $5 \times 10^6$  cpm /  $\mu$  g de protéine.

 2. Hydrolyse chymotrypsique
 

---

Les protéines iodées sont dénaturées à 100° en milieu SDS 0,5 % et hydrolysées par la chymotrypsine (0,1 mg/ml, 24 h). Les hydrolysats sont déposés sur plaque de cellulose et analysés par électrochromatographie.

Les autoradiographies des électrochromatographies de l'hexon normal et de l'hexon lent présentent des différences dans le nombre et la répartition des taches peptidiques (Fig. 16). Un nombre plus grand de peptides iodés est observé dans l'électrochromatographie de l'hexon lent.



FIGURE 16

-----  
Electrochromatographies

2  $\mu$ g d'hexons normaux (a) et 2  $\mu$ g d'hexons lents (b) sont marqués à l' $^{125}$ Iode, dénaturés et digérés par la chymotrypsine. Les hydrolysats sont déposés sur plaques de cellulose 20 x 20 cm.

E : Electrophorèse (900 V, 50 mn, pH 1,9).

C : Chromatographie (pyridine/acide acétique/n-butanol/eau, 100:30;150:120).

Les flèches droites indiquent les peptides les plus significatifs qui disparaissent et les flèches courbes les peptides dont les migrations sont différentes.



L'iode se fixant préférentiellement sur les tyrosines et les histidines, il est probable qu'une proportion plus grande d'acides aminés aromatiques sont accessibles à la surface de l'hexon lent.

## B/ ETUDE DU POIDS MOLECULAIRE DE L'HEXON LENT

---

Pour étudier les sous-unités des deux hexons et leur poids moléculaire, les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS - Urée). Dans ces conditions les protéines migrent presque uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

Chaque classe d'hexon montre une bande homogène mais l'hexon lent migre légèrement plus loin que l'hexon normal. L'hexon lent comme l'hexon normal est donc constitué de sous-unités identiques, mais la sous-unité de l'hexon lent aurait un poids moléculaire plus faible.

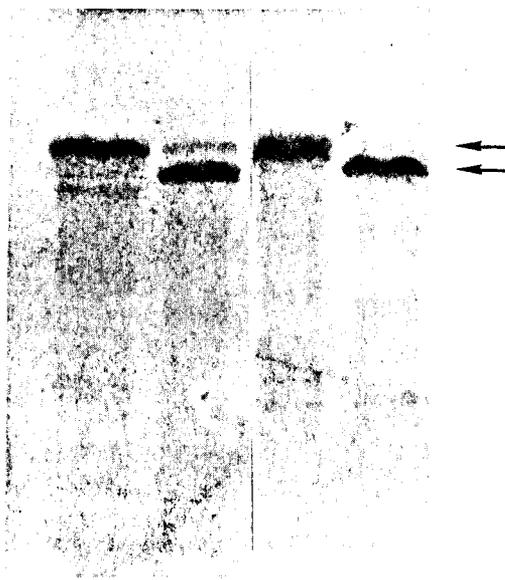
Une courbe de calibration est réalisée en utilisant les protéines de l'adénovirus comme marqueurs. Si le poids moléculaire apparent de la sous-unité de l'hexon normal est de 120 000 daltons, celui de l'hexon lent est de 115 000 daltons d'après la courbe (Fig. 17 a et b).

Cette différence de 5 000 daltons correspond à la perte d'environ 50 résidus d'acides aminés. Cette perte de séquence peut être due à un clivage exo ou endoprotéolytique à l'extrémité N-terminale du polypeptide hexon normal ou à l'extrémité C-terminale ou aux deux. Dans ce cas les extrémités de l'hexon lent seront différentes de celles de l'hexon normal. Pour localiser cette différence, les deux populations d'hexons sont soumises à l'action d'enzymes dégradant les extrémités des protéines. Si les séquences d'acides aminés ne sont pas identiques à une extrémité, des résultats différents peuvent être obtenus par l'action de ces enzymes.



⊕

a' b' c' d'



## C/ ETUDE DE L'EXTREMITE C-TERMINALE DE L'HEXON LENT

---

Les dix derniers résidus de l'extrémité C-terminale de l'hexon normal ont été séquencés par JÖRNVALL et coll. en 1974<sub>a</sub> (91). L'étude de cette séquence permet de déduire que la carboxypeptidase A peut dégrader huit résidus d'acides aminés avant d'être arrêtée par un résidu de proline : 1 % de la séquence totale peut donc être dégradée.

L'hexon normal et l'hexon lent dénaturés par le SDS sont digérés par la carboxypeptidase A (rapport Enzyme - Substrat de 1 : 25) et sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide - SDS (Fig. 17<sub>e</sub> et f). Aucun changement de migration entre les échantillons digérés ou non digérés par l'enzyme n'est détectable. Si l'hexon lent est altéré du côté C-terminal, cette altération est donc très faible et inférieure à 1 %.

## D/ ETUDE DE L'EXTREMITE N-TERMINALE DE L'HEXON LENT

---

### 1. Action de l'amino peptidase M

-----

L'extrémité N-terminale de l'hexon normal a été trouvée bloquée par acétylation de l'alanine (JÖRNVALL et coll., 1974<sub>b</sub> - 92), et la séquence du peptide N-terminal est connue.

La première proline est en position 3 et les suivantes en positions 6 et 24 (JÖRNVALL - communication personnelle). Une enzyme, l'amino peptidase M, dégrade les peptides depuis l'extrémité N-terminale et son action n'est pas arrêtée par la proline, l'enzyme coupe la liaison polypeptidique suivante en libérant un dipeptide proline-X-COOH bien que le rendement de cette coupure soit faible (Dr. DAUTREVAUX et Dr. HAN - communication personnelle).

L'analyse en gel de polyacrylamide - SDS de l'hexon normal et

de l'hexon lent (12,5 mg de chaque classe d'hexons) dénaturés par le SDS et digérés par l'amino peptidase M (rapport enzyme - substrat de 1 : 25) ne montre, comme prévu, aucune différence au niveau de l'hexon normal (Fig. 17<sub>c</sub>) : puisque son extrémité est bloquée, l'enzyme n'a pas pu agir.

Mais des changements apparaissent pour l'hexon lent (Fig. 17<sub>d</sub>). Une bande mineure de 120 000 daltons visible dans la piste témoin d'hexon lent (b) au-dessus de la bande majeure de 115 000 daltons, disparaît presque complètement après digestion par l'amino peptidase M (piste d). Cette bande mineure de 120 000 daltons n'est observée que lorsque les échantillons protéiques déposés sur gel de polyacrylamide sont très concentrés. Elle ne correspond certainement pas à une contamination par l'hexon normal puisque celui-ci n'est pas détecté en gel non dissociant (Fig. 14<sub>d</sub> et e).

## 2. Détermination de l'acide aminé N-terminal

-----

Dans le but de mettre en évidence le clivage de l'hexon lent du côté N-terminal, 33  $\mu$ g d'hexon normal (correspondant à 100 p M d'hexon natif soit 300 p M de la sous-unité hexon) et 33  $\mu$ g d'hexon lent dénaturés par chauffage à 100° durant 5 mn en présence de SDS 0,5 % sont dansylés avec du chlorure de dansyl  $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$  - DNS - Cl) et hydrolysés par l'acide chlorhydrique 5,6 N durant 16 h à 110°. Les hydrolysats sont analysés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de polyamide. Les Dansyl-aminoacides (DNS - aminoacides) ont une fluorescence intense et absorbent le rayonnement ultra-violet. Les taches peuvent être repérées avec une lampe UV mais un résultat plus précis est obtenu après autoradiographie.

L'examen de l'autoradiographie de l'hexon normal (Fig. 18<sub>a</sub>) montre uniquement des taches correspondant aux DNS - O - tyrosine, DNS -  $\epsilon$ -lysine, DNS-NH<sub>2</sub> et des traces de DNS-OH c'est-à-dire les produits secondaires de dégradation de la dansylation.

Au contraire, sur l'autoradiographie de l'hexon lent (Fig. 18<sub>b</sub>) la tache correspondant au DNS -  $\epsilon$ -lysine semble beaucoup plus intense que sur l'autoradiographie de l'hexon normal.

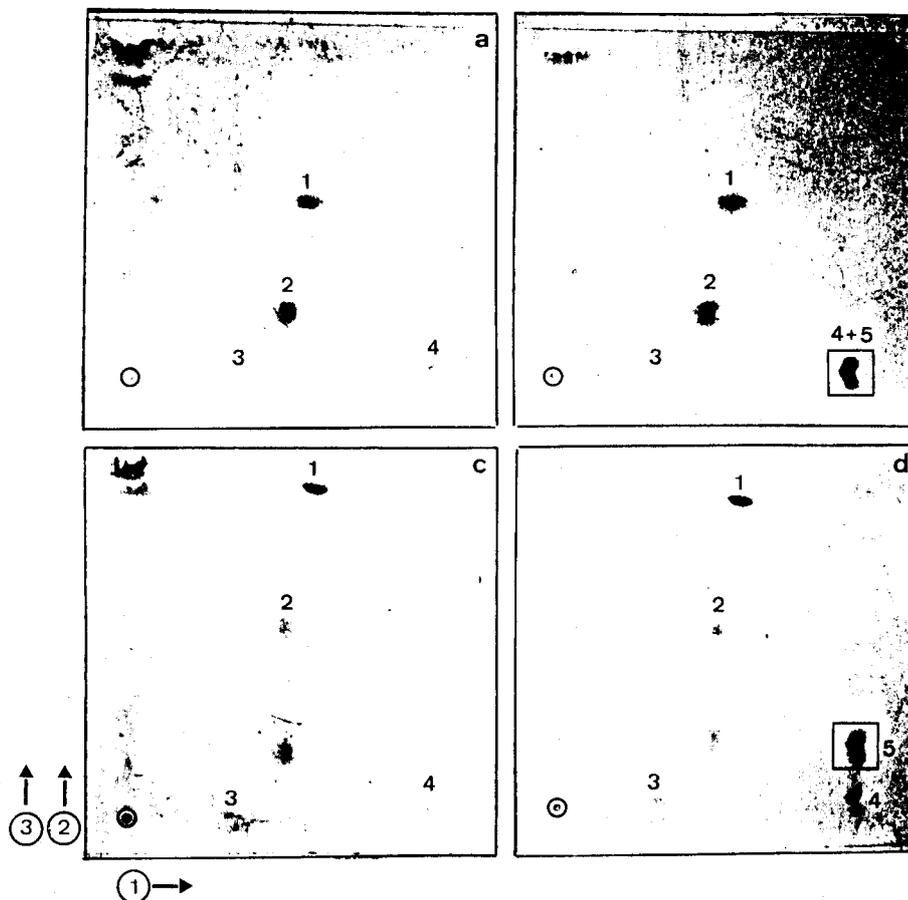


FIGURE 18

Détermination de l'acide aminé N-terminal par Chromatographies

33  $\mu$  g d'hexons normaux et 33  $\mu$  g d'hexons lents sont dansylés, hydrolysés et déposés sur plaque de polyamide (5 x 5 cm)

1. première dimension (acide formique 1 %)
2. deuxième dimension (benzène/acide acétique, 90 : 10)
3. troisième dimension  
(acétate d'éthyle/méthanol/acide acétique, 20:1:1)

a et b : autoradiogrammes après 2 dimensions

c et d : autoradiogrammes après la troisième dimension.

a et c : hexons normaux

b et d : hexons lents.

O : origine, tache 1 : DNS -NH<sub>2</sub>, tache 2 : DNS -O-tyrosine, tache 3 : DNS -OH,  
tache 4 : DNS -  $\epsilon$  -lysine , tache 5 : DNS -  $\alpha$  -histidine.

Une troisième course dans un autre système de solvants est nécessaire pour séparer le DNS -  $\epsilon$  - lysine du DNS -  $\alpha$  - histidine. Une tache est nettement visible sur l'autoradiographie de l'hexon lent (Fig. 18<sub>d</sub>) après la troisième course au niveau du  $^{14}\text{C}$ -DNS-histidine. Ce résultat suggère que l'acide aminé N-terminal de l'hexon lent est libre et différent de l'acide aminé N-terminal de l'hexon normal (alanine acétylée).

Une trace de  $^{14}\text{C}$ -DNS-histidine est aussi observée sur le chromatogramme de l'hexon normal (Fig. 18<sub>c</sub>). La dansylation est une méthode qualitative et il est difficile de quantifier le nombre de résidus d'histidine libre par chaîne polypeptidique. Nous avons cependant essayé de comparer le marquage présent dans la tache de  $^{14}\text{C}$ -DNS-histidine et dans les autres taches des deux chromatogrammes c et d, de deux façons :

- les taches sont repérées sur la plaque de polyamide à l'aide de l'autoradiographie, grattées et la poudre recueillie est comptée dans du liquide de scintillation.
- les tracés densitométriques des deux autoradiogrammes sont analysés.

En utilisant les taches voisines comme témoin interne, il a été calculé que 20 à 25 fois plus de radioactivité est présente dans la tache correspondant au DNS-histidine sur l'autoradiographie de l'hexon lent que sur celle de l'hexon normal.

La présence d'une tache DNS-histidine sur l'autoradiographie de l'hexon normal suggère une contamination de 3 à 5 % de l'hexon normal par l'hexon lent. Un tel pourcentage de contamination d'une protéine par une autre peut exister sans être révélé par les contrôles biochimiques habituels.

La tache DNS -  $\epsilon$  - lysine de l'hexon lent est également plus intense (Fig. 18). Ceci est en accord avec les conclusions déduites de l'observation de la composition en acides aminés et de la détermination du point isoélectrique : un pourcentage plus grand de résidus lysines semble exister dans l'hexon lent.

## V - RELATION ENTRE HEXONS LENTS ET ENCAPSIDATION

-----

L'hexon lent pourrait représenter l'un des hexons particuliers localisés dans la capsid de l'adénovirus.

Pour explorer cette possibilité, l'hexon lent est comparé avec les hexons des groupes de 9 et les hexons péripentonaux isolés sur gradient de glycérol après dégradation du virion au désoxycholate de sodium.

Les différents hexons sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. Les hexons des groupes de 9 (Fig. 17<sub>g</sub>) et les hexons péripentonaux (Fig. 17<sub>j</sub>) sont constitués de la même sous-unité de 120 000 daltons comme l'hexon majoritaire isolé des surnageants de cultures infectées.

Ces hexons sont également analysés pour leur sensibilité aux enzymes spécifiques des extrémités N et C terminales (Amino peptidase M et Carboxy peptidase A). Ils sont insensibles à l'action de ces enzymes, même après dénaturation avec le SDS (Fig. 17<sub>h</sub> et <sub>i</sub> pour les groupes de 9 et Fig. 17<sub>k</sub> et <sub>l</sub> pour les hexons péripentonaux).

## DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE

-----

Nous avons décrit dans ce travail l'isolement et la caractérisation d'une classe mineure d'hexons, les "hexons lents", possédant des charges électriques différentes de celles des hexons normaux. Leur mobilité électrophorétique est, de ce fait, changée et leur point isoélectrique est de 4,9 au lieu de 4,7 .

Une classe d'hexons lents avait déjà été mise en évidence par PETERSSON en 1971 (93), leur pouvoir d'induire des anticorps neutralisants était 50 fois plus élevé que celui des hexons normaux. Des données de la littérature, il est impossible actuellement d'affirmer l'identité entre les hexons lents de notre laboratoire et ceux isolés par PETERSSON.

Comparés aux hexons normaux, nos hexons lents ont une réactivité antigénique différente, ils sont deux fois plus réactifs en présence d'un sérum anti "hexon-papaine" (sérum spécifique des déterminants de type de l'hexon). De plus, les électrochromatographies de l'hexon lent et de l'hexon normal marqués à l'iode 125 ne sont pas complètement semblables, des différences apparaissent dans le nombre et la répartition des taches peptidiques. Ces résultats suggèrent que, probablement, des changements sont intervenus à la surface de la molécule d'hexon lent et qu'un certain nombre de résidus aromatiques sont impliqués dans la séquence des déterminants spécifiques de type de l'hexon. Au contraire, une réactivité identique est observée en présence de sérum spécifique des déterminants de groupe de l'hexon.

L'analyse électrophorétique en milieu dissociant des hexons lents révèle qu'ils sont constitués de sous-unités identiques de poids moléculaire apparent 115 000 daltons. La différence de 5 000 daltons entre les hexons normaux et les hexons lents correspond à une perte d'environ 50 acides aminés.

L'immunodiffusion en présence de sérums spécifiques et l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS ne permettent pas de détecter de polypeptide mineur associé à l'hexon lent comme le suggérait précédemment PETTERSSON (1971) (94).

La comparaison du comportement des enzymes Carboxy peptidase A et Amino peptidase M vis-à-vis des extrémités C et N-terminales de l'hexon normal et de l'hexon lent, permet de dire que l'extrémité N-terminale de l'hexon lent est modifiée. L'analyse de l'acide aminé N-terminal de l'hexon lent révèle un résidu histidine libre, alors que dans les mêmes conditions aucun acide aminé n'est mis en évidence pour l'hexon normal, l'extrémité N-terminale étant bloquée.

En dépit de ces différences immunologiques et biochimiques, l'examen au microscope électronique de ces deux sortes d'hexons ne laisse apparaître aucune différence morphologique.

En résumé :

L'hexon lent diffère de l'hexon normal par une extrémité N-terminale non acétylée ayant perdu 50 acides aminés, par une perte de charges négatives et une accessibilité plus grande des déterminants antigéniques de type, mais aucun changement n'apparaît pour les déterminants antigéniques de groupe et sa morphologie demeure inchangée.

Ces résultats suggèrent que la classe mineure d'hexons isolés correspond à des capsomères composés de sous-unités polypeptidiques normales raccourcies par clivage protéolytique. Cette protéolyse n'empêcherait pas le capsomère hexon de se former mais l'assemblage en groupes de 9 et en virion deviendrait impossible puisque les hexons lents ne sont jamais retrouvés dans les groupes de 9 ou dans le virion mature. De même ces hexons lents ne correspondent pas aux hexons péripentonaux qui entourent les pentons dans la capside.

Il semble donc que ces hexons lents soient des hexons aberrants

survenant occasionnellement quand les cultures cellulaires sont infectées à haute multiplicité et qu'ils n'interviennent pas dans la morphogenèse de l'adénovirus.

Une perte de séquence d'environ 50 acides aminés semble intervenir à l'extrémité N-terminale des hexons lents. Ceux-ci étant plus basiques que les hexons normaux, on peut imaginer que la séquence manquante possède un excès de résidus dicarboxyliques. Or, parmi les 31 premiers résidus actuellement séquencés (JÖRNVALL - communication personnelle), deux charges positives et deux charges négatives se compensent. Pour que cette hypothèse se vérifie il faudrait donc une proportion relativement élevée de résidus dicarboxyliques entre les positions 31 et 50.

Cette perte de séquence pourrait être attribuée à un défaut d'acétylation. En effet une analyse récente effectuée par JÖRNVALL en 1975 (95) sur le nombre de protéines  $\alpha$ -amino acétylées (Table II) suggère que l'acétylation des protéines aurait une fonction protectrice vis-à-vis de la protéolyse des protéines ayant un rôle structural. La non-acétylation du polypeptide hexon rendrait la région N-terminale sensible au clivage protéolytique. Cette hypothèse pourrait expliquer l'apparition des hexons lents. Le fait que l'électrophorèse d'hexons lents dénaturés par le SDS révèle, en plus de la bande majoritaire de 115 000, une bande mineure de 120 000 sensible à l'action de l'amino peptidase M, est en faveur de cette hypothèse. Les hexons normaux dénaturés migrent (dans les mêmes conditions) à la position 120 000 mais ne sont pas sensibles à l'enzyme. Certaines sous-unités de l'hexon lent seraient donc encore intactes. Elles auraient la même composition en acides aminés mais l'alanine terminale ne serait pas acétylée ce qui rendrait ces sous-unités sensibles à la protéolyse.

La probabilité de trouver ces hexons lents peut dépendre de la capacité de N-acétylation des systèmes enzymatiques des cellules infectées. Mais il ne peut être exclu que les hexons lents soient produits lors de l'extraction ou de la purification.

TABLE II

*N*-terminal regions of  $\alpha$ -amino acetylated polypeptides. Species variations are indicated by alternative residues at appropriate positions. The first ten residues, or all if less are known, are listed. Structures given without references indicate that these sequences and original references are summarized in Dayhoff (1972, 1973)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Polypeptide
Ac-Thr- Ac-Ala-	Ala- Ala Thr	Leu-Lys-	Asp-	Lys-	Leu-	Ile	Gly-His-			Dogfish M <sub>4</sub> (Taylor, Oxley, Allison & Kaplan, 1973), rat M <sub>4</sub> (Sanborn, Brummel, Stegink & Vestling, 1970) and bovine and chicken H <sub>4</sub> (Brummel, Sanborn & Stegink, 1971) lactate dehydrogenase
Ac-Ser- Ac-Ser- Ac-Ser- Ac-Ala- Ac-Ala- Ac-Ser- Ac-Ala-	Thr- Ile Ile Ile	Ala- Pro- Lys-	Gly- Glu- Gly-	Lys- Thr- Ile	Val- Gln- Asp-	Ile	Lys-Cys-Lys- Gly-Val-Ile- Gly-Arg-			Horse liver alcohol dehydrogenase Yeast alcohol dehydrogenase (Jörnvall, 1973) Lobster glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Rabbit muscle enolase (Winstead & Wold, 1964) Rabbit muscle phosphoglucose isomerase (James & Noltmann, 1973) Human phosphoglycerate kinase (Yoshida, 1972)
Ac-Ala- Ac-Ser- Ac-Ala-	Ser- Pro- Asp-	Pro- Asp- Trp-	Gly- Tyr- Asp-	Lys- Asp-	Lys-	Lys-	Asp-Asp-Lys-			Human carbonic anhydrase B (Andersson, Nyman & Strid, 1972; Lin & Deutsch, 1973)
Ac-Ser- Ac-(Tyr, Ac-Gly-	His- Leu, Ile	His- Phe, Val	Trp- Ala Ala	Gly- Glu- Lys-	Tyr- Lys- Gly-	Gly- Lys- Lys-	Ile- Ile- Phe-	Asp- Thr Val		Human carbonic anhydrase C (Henderson, Henriksson & Nyman, 1973) Bovine hyaluronidase (Soru & Zaharia, 1967) Vertebrate cytochrome <i>c</i>
Ac-Ala-	Ser- Thr	Phe- Ala Ser Asn Gln	Asp- Glu- Ala-	Gly- Ala- Pro-	Pro- Pro-	Gly- Gly-	Asp- Asn			Plant cytochrome <i>c</i>
Ac-Ser- Ac-Ala-	Leu- Leu-	Ser- Ser-	Asp- Lys- Asp-	Lys- Lys- Ala-	Lys- Ala-	Ala- Val-	Val- Asp			Fish haemoglobin, $\alpha$ -chain  Toad (Caffin, Chauvet & Acher, 1969) and frog (Chauvet & Acher, 1971) haemoglobin, $\alpha$ -chain
§Ac-Ser- †Ac-Val- ‡Ac-Gly-	Phe- Thr- His-	Leu- Leu-	(Ser, Ala, Glu, Glu)-	Lys-						Cat haemoglobin, $\beta$ -chain (Taketa, Mauk & Lessard, 1971) Chicken haemoglobin, $\beta$ -chain (Satake, Sasakawa & Maruyama, 1963) Human haemoglobin F <sub>1</sub> , $\gamma$ -chain
Ac-Gly- Ac-Ser- §Ac-Thr- Ac-Ser- Ac-Ser- Ac-Ser-	Ser- Ser- Glu- Tyr- Arg- Ile	Gly- Phe- Pro- Ser- Gly- Thr-	Ile- Arg- Pro- Met- Pro- Lys-	Ala- Arg- Tyr- His- Leu- Gln-	Asp- Asp- Glu- Phe- Pro- Ile-	Gly- Gly- Gly- Arg- Gly- Ile-	Lys- Gly- Lys- Gly- Glu- Glu- Ala-			Ovalbumin (Narita & Ishii, 1962) Horse apoferritin (Suran, 1966) Bovine fibrinopeptide B (Folk & Gladner, 1960) Mammalian $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone, $\alpha$ -MSH Sheep, pig and bovine luteinizing hormone, $\beta$ -chain <i>E. coli</i> ribosomal protein L7 (Terhorst, Möller, Laursen & Wittmann-Liebold, 1973)
Ac-Ser- Ac-Ser- Ac-Ala-	Gly- Glu- Phe-	Arg- Ala- Ala-	Gly- Pro- Gly-	Lys- Ala- Ile	Gly- Ala- Leu-	Gly- Thr- Ala-	Lys- Ala- Asp-	Gly- Gly- Ala- Ala- Asp-	Leu- Ala- Asp-	Calf thymus and pea histone IV Calf thymus histone IIb1 (Yeoman <i>et al.</i> , 1972) Rabbit and calf thymus histone I Fish myogen (muscle Ca-binding protein)
Ac-(Asp, Met)-Ala- Ac-Ser- Ac-Asp- Ac-Ala-	Ser- Ser- Glu- Ser-	Asp- Asp- Glu- Ala-	Ala- -Asp- -Asp- Gln-	-Asp- Thr- Lys- Arg-	Thr- Ala- Pro- Ser-	Ala- Leu- Val- Gln- Arg-	Leu- Val- Cys- Gln- Arg-			Rabbit tropomyosin (Alving, Moczar & Laki, 1966) Rabbit myosin (Offer, 1964) Rabbit actin Human and bovine myelin membrane encephalitogenic protein
Ac-Ser-										Bovine mitochondrial structural protein (Criddle, Edwards & Petersen, 1966)
Ac-Met-	Asp- Ile	Ala- Ile	Gln- His- Pro- Trp- Phe-							Bovine lens $\alpha$ -crystalline
Ac-Ala-	Cys- Ser	Cys- Arg	Ala- Leu	Pro- Phe	Arg- Gly	Cys- Phe	Cys- Gly	Ser- Phe	Val-	Sheep keratin
Ac-Ser- Ac-Ser-	Cys- Tyr- Ser- Asn	Tyr- Ser- Ile	Asn- Thr- Thr- Asn	Pro- Thr- Pro- Asn	Cys- Thr- Ser- Asn	Leu- Pro- Ser- Tyr	Pro- Arg- Gln- Phe-	Ser- Phe-		Emu feather keratin (O'Donnell, 1973) Tobacco mosaic virus coat protein
Ac-Ser- Ac-(Thr, Ser, Ac-Met- Ac-Ala-	Thr, Ser, Gly, Val, Val)- Thr- Glu- Ile)- Asp- Lys- Glu- Leu- Ala- Pro- Glu-									Alfalfa mosaic virus coat protein (Kraal <i>et al.</i> , 1972) Cowpea chlorotic mottle virus coat protein (Tremaine, Agrawal & Chidlow, 1972) Turnip yellow mosaic virus coat protein Adenovirus hexon coat protein (Jörnvall, Ohlsson & Philipson, 1974)

† Acetylation questionable (Moss & Thompson, 1969).

‡ Minor component; major component has the same type of chain but anacetylated.

§ One component; unacetylated variants occur but do not have the same terminal sequence.

DEUXIEME PARTIE

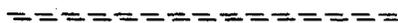
---

STRUCTURE CONFORMATIONNELLE DES CAPSOMERES HEXONS

ASSEMBLES DANS LA CAPSIDE VIRALE.

ETUDE DES GROUPES DE NEUF HEXONS.

## I N T R O D U C T I O N



Le mécanisme de la construction de la capsid virale et les liaisons spécifiques qui permettent l'assemblage des différents capsomères ne sont pas encore élucidés.

Les hexons, protéines trimériques, ont été trouvés associés en édifices plus complexes comme les groupes de neuf hexons et les capsides virales. Ils ont tendance à s'agréger, spontanément ou après protéolyse partielle (BOULANGER, 1975 - 96). De même, in-vitro le pontage des hexons par des agents bi-fonctionnels conduit à des formes multimériques, principalement des trimères (BOULANGER et PUVION, 1974 - 97).

Dans des conditions douces de dégradation, les particules virales relâchent des structures nonamériques : les groupes de 9 hexons (PRAGE et coll., 1970 - 98 ; RUSSELL et coll., 1971 - 99). Nous avons comparé les propriétés optiques des capsomères hexons libres et engagés dans les groupes de 9, dans le but de déterminer si des changements de la structure tridimensionnelle des chaînes polypeptidiques de l'hexon surviennent lors de l'assemblage des monomères en nonamères et éventuellement d'élucider quels résidus d'acides aminés sont impliqués dans la liaison intra-nonamérique.

D'autre part, des polypeptides de faible poids moléculaire sont associés aux protéines de capsid et servent de "ciment" entre les sous-unités protéiques majeures pour former la capsid. Le polypeptide IX en particulier est associé aux hexons dans les groupes de 9. Son rôle dans l'association des hexons et sa topographie seront discutés.

## R E S U L T A T S

=====

## I - SOLEMENT DES GROUPES DE 9 HEXONS

-----

## A/ ANALYSE DU GRADIENT DE GLYCEROL

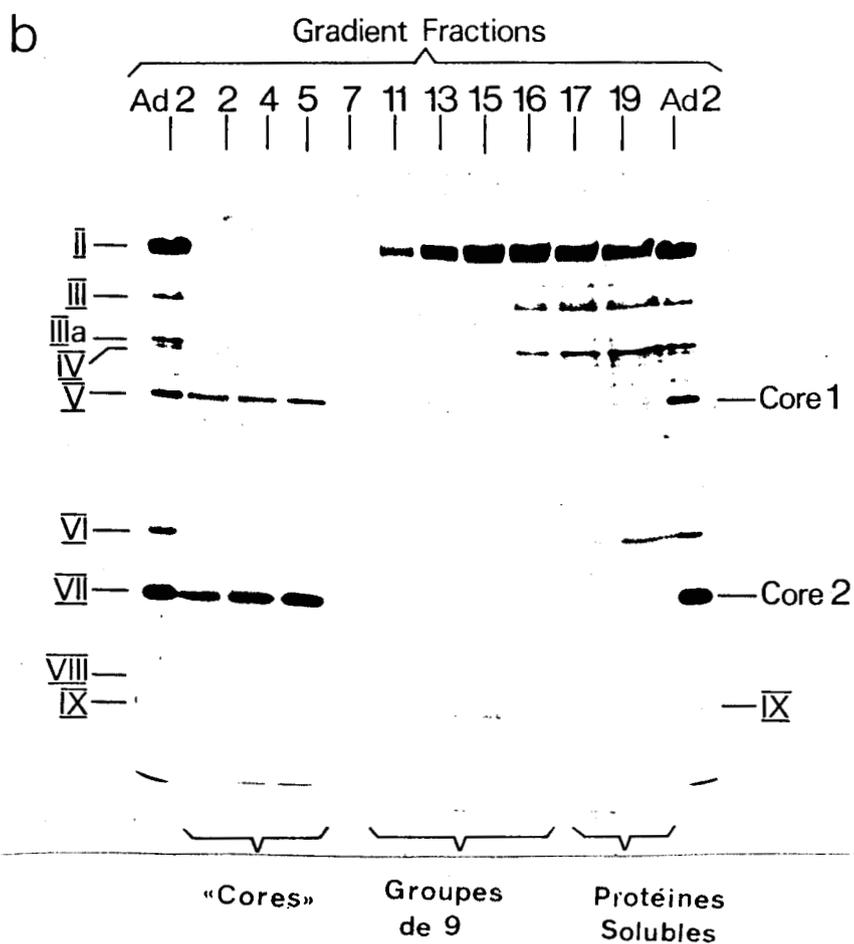
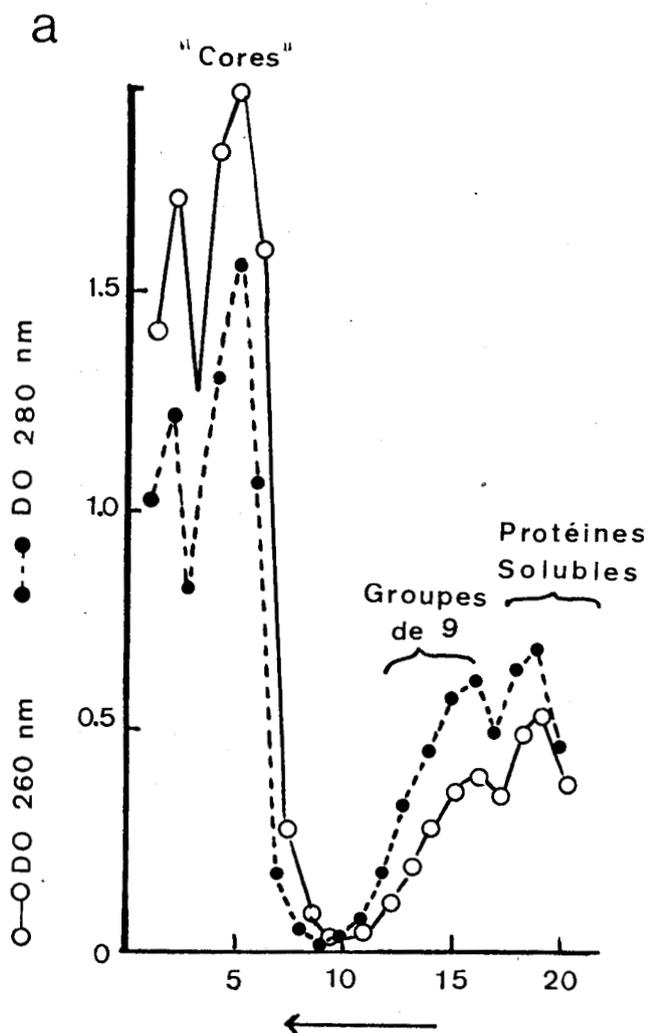
-----

Le virus purifié en chlorure de césium et dissocié au DOC (désoxycholate de sodium) 0,5 % durant 90 secondes à 56°C, est déposé sur un gradient linéaire de glycérol 10 à 40 % formé au-dessus d'un coussin de glycérol 80 %. Après 80 minutes de centrifugation à 35000 tours/mm dans un rotor Spinco SW 41, chaque fraction est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm et analysée en électrophorèse sur gel de polyacrylamide - SDS.

Plusieurs pics d'absorption sont observés (Fig. 19<sub>a</sub>). Les fractions 5 à 7 sédimentant juste au-dessus du coussin de 80 % présentent une forte absorption à 260 nm (longueur d'onde d'absorption maximum des acides nucléiques), le gel de polyacrylamide-SDS révèle que ces fractions contiennent principalement les protéines V et VII normalement associées au DNA viral (Fig. 19<sub>b</sub>). Il s'agit des "cores" nucléoprotéiques ou structures internes du virus, ils sédimentent avec une constante de sédimentation apparente de 185 à 200 S.

Les fractions 11 à 16 (constante de sédimentation apparente de 50 à 60 S) contiennent les groupes de 9 hexons. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS montre des bandes protéiques correspondant aux polypeptides hexon (II) et IX.

Les fractions du sommet du gradient (sédimentant à 10-12 S) contiennent les antigènes libres de la capside.



## B/ PURIFICATION SUR ECHANGEURS D'IONS

---

Les fractions 11 à 16 du gradient contenant les groupes de 9 sont rassemblées, dialysées contre un tampon phosphate de Na 50 mM pH 6,8 et chromatographiées sur DEAE-sephadex A-50 équilibré dans le même tampon. Les groupes de 9 ne sont pas retenus sur la résine et sont élués dans le pic exclu. Les protéines libres contaminant la préparation sont éluées avec un gradient linéaire de molarité croissante en NaCl 0 à 0,6 M dans les conditions décrites pour la purification des antigènes de capsid (BOULANGER et PUVION, 1973 - 100).

## II - COMPARAISON DES SPECTRES DICHROIQUES DES HEXONS LIBRES ET DES HEXONS

---

### ASSEMBLES

---

Les spectres dichroïques d'une solution d'hexons libres et d'une solution d'hexons assemblés sont comparés dans la zone de longueur d'onde de 180 à 320 nm.

## A/ ULTRA-VIOLET LOINTAIN

---

Dans l'UV lointain de 180 à 250 nm, les spectres dichroïques sont identiques pour les deux types d'hexons. La résolution des courbes du dichroïsme circulaire en bandes gaussiennes permet de définir une bande positive à 191 nm et quatre bandes négatives à 198, 207, 214 et 222 nm. La bande à 222 nm représente la transition  $n \rightarrow \pi^*$  d'un électron de l'oxygène de la liaison peptidique  $-\text{CO-NH}-$ , la mesure de son amplitude permet d'évaluer le contenu en hélice  $\alpha$  selon CHEN et coll. en 1974 (101). La valeur de -35000 est utilisée pour l'hélice  $\alpha$  maximum (100 %). De la même façon la proportion de structure  $\beta$  est estimée en utilisant la bande à 214 nm et en prenant pour la structure  $\beta$  standard (100 %) la valeur de - 9200.

D'après ces calculs, l'hexon contient environ 16 % de structure en hélice  $\alpha$  et 25 % de structure  $\beta$ . Le reste du polypeptide est apparemment dans une configuration inordonnée ("Random Coil").

## B/ ULTRA-VIOLET PROCHE

Dans l'UV proche, entre 250 et 320 nm, les spectres dichroïques des hexons libres et des hexons assemblés en groupes de 9 montrent des différences significatives (Fig. 20).

Toutes les bandes sont négatives : une bande à 275 nm est uniquement visible dans le spectre des groupes de 9 hexons, à 283 nm et à 290 nm les bandes semblent plus intenses dans le spectre des groupes de 9 que dans le spectre des hexons libres, et à 302 nm un épaulement apparaît dans le spectre des groupes de 9.

Les compositions en acides aminés des hexons provenant des groupes de 9 et des hexons libres sont identiques. Les changements d'amplitude observés dans le spectre des hexons nonamères sont donc très vraisemblablement provoqués par une organisation différente des chaînes polypeptidiques dans les nonamères. Les bandes nouvelles ou amplifiées peuvent être imputées à l'environnement électronique différent du radical d'un acide aminé impliqué dans l'assemblage des hexons.

Les bandes à 302 et 290 nm sont caractéristiques du chromophore du tryptophane. La bande à 290 nm est souvent accompagnée d'une bande déplacée de 6 à 8 nm vers les faibles longueurs d'onde (STRICKLAND, 1974 - 102). Elle pourrait correspondre à la bande observée à 283 nm mais il est difficile de dire si cette bande correspond effectivement au tryptophane car le maximum d'absorption de la tyrosine sur un spectre dichroïque est localisé entre 282 et 275 nm.

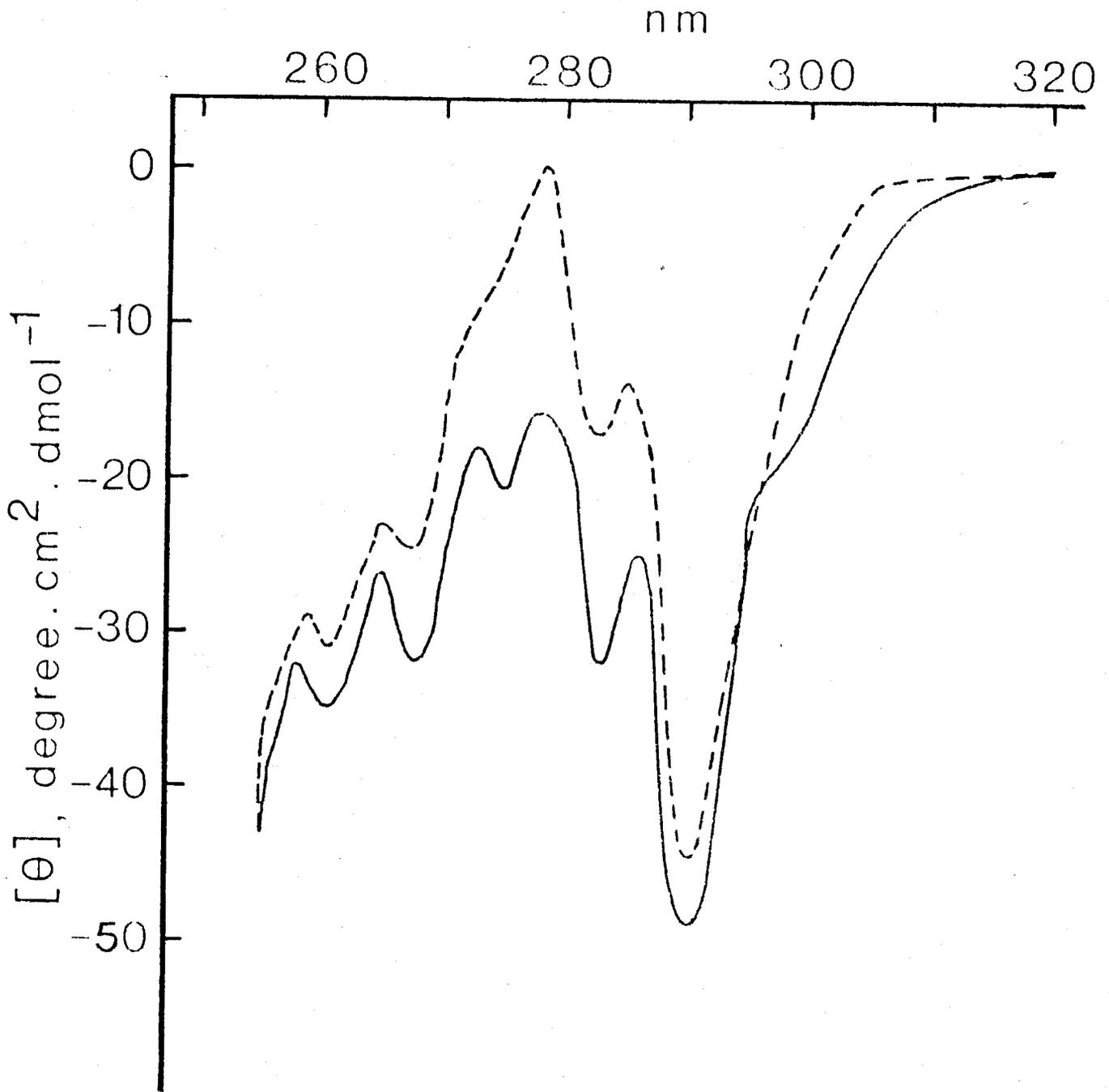


FIGURE 20

Spectres dichroïques de 250 à 300 nm .

- capsomères hexons libres  
 — capsomères hexons assemblés  
 en groupes de 9.



## III - ETUDE DES POLYPEPTIDES IX ASSOCIES AUX HEXONS DANS LES GROUPES DE 9

Des polypeptides de faible poids moléculaire VI, VIII et IX sont trouvés associés aux hexons dans la capsid virale. Nous avons étudié les polypeptides IX qui sont libérés avec les hexons lors de la dissociation des groupes de 9 (EVERITT et coll., 1973 - 103).

## A/ PRESENCE DE POLYPEPTIDES IX ASSOCIES AUX HEXONS

## DANS LES GROUPES DE 9

Des groupes de 9 préparés par dissociation au DOC 0,5 % et purifiés sur gradient de glycérol sont analysés par immunoélectrophorèse en double dimension (technique de Laurell) en présence d'un sérum anti-hexon et d'un sérum anti-polypeptide IX. Le sérum anti-polypeptide IX est préalablement saturé par une solution d'hexons purifiés pour éviter toute réaction non spécifique avec l'hexon.

En présence de sérum anti-hexon un pic de précipitation caractéristique de l'hexon se forme (l'hexon migre dans la première dimension vers l'anode) (Fig. 21<sub>c</sub>). En présence de sérum anti-polypeptide IX un pic de précipitation apparaît à la même position (Fig. 21<sub>d</sub>). Le sérum ayant été saturé par un excès d'hexons, les anticorps anti-IX ne peuvent avoir précipité que les polypeptides IX liés aux hexons et ayant migré avec eux dans la première dimension. Les polypeptides IX sont apparemment basiques et migrent vers la cathode lorsqu'ils sont libres (Fig. 21<sub>a</sub> et b).

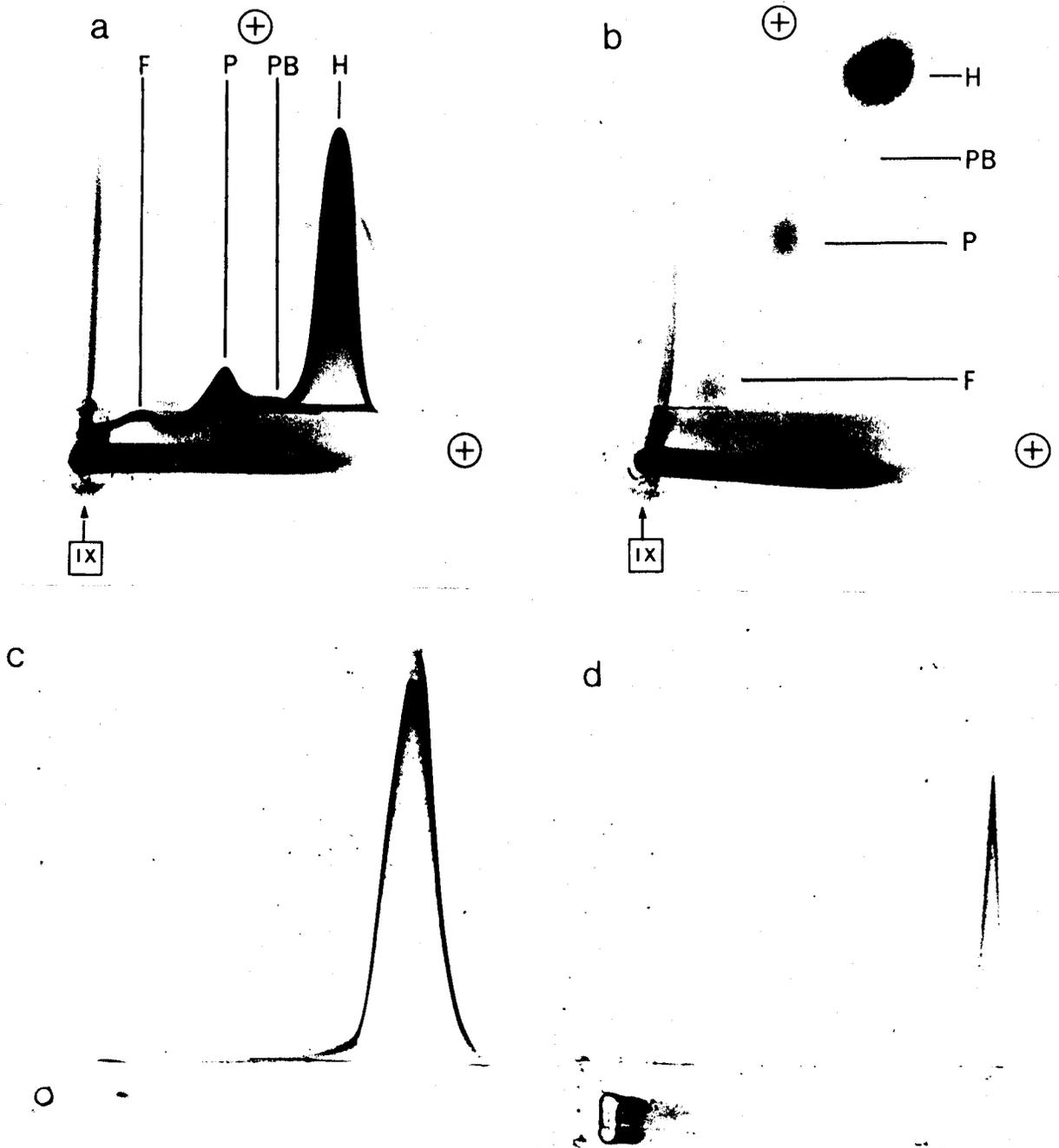


FIGURE 21

Immunoélectrophorèses en double dimension :

- En haut : des protéines virales, Hexon (H), base du penton (PB, penton (P) et fibre (F)
- a : en présence d'un sérum anti-protéines virales  
 b : en présence d'un sérum anti-polypeptide IX.
- En bas : des groupes de 9 préparés par traitement au désoxycholate
- c : en présence d'un sérum anti-hexon  
 d : en présence d'un sérum anti-polypeptide IX  
 préalablement saturé par une solution d'hexons purifiés.



B/ QUANTIFICATION DU POLYPEPTIDE IX DANS LES GROUPES DE 9

ET DANS LE VIRION

Des virions marqués à la valine  $^{14}\text{C}$  et des groupes de 9 préparés par traitement de virions "froids" au DOC 0,5 % et purifiés en gradient de glycérol sont dissociés en milieu SDS - Urée et soumis à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS comme précédemment. Le gel est coloré au bleu de Coomassie ou autoradiographié sur film Kodirex (Kodak). Les tracés densitométriques des gels colorés et des autoradiographies ont été réalisés à l'aide du densitomètre Joyce-Loebl (Fig. 22). Si l'on admet un poids moléculaire de 360.000 pour le capsomère hexon et de 12.500 pour le polypeptide IX, les profils densitométriques donnent les résultats suivants :

1. La figure 22 montre l'enregistrement densitométrique de la piste du gel de polyacrylamide-SDS où a migré la fraction N° 13 du gradient de glycérol (Fig. 19). Cette fraction ne contient que des groupes de 9 et le gel montre les polypeptides II (hexon) et IX. Le rapport des surfaces des pics correspondant aux polypeptides II et IX est de 18,8. Comme il y a 9 capsomères hexons dans un groupe de 9, on peut en déduire le nombre de polypeptides IX par groupe de 9 à l'aide du calcul suivant :

$$\frac{360.000 \times 9}{x \times 12.500} = 18,8 \quad \text{d'où} \quad x = 13,6$$

2. L'enregistrement densitométrique de l'autoradiographie des protéines des virus marqués à la valine  $^{14}\text{C}$  et dissociés en SDS, montre que 2,4 % de la radioactivité se trouve dans la bande correspondant au polypeptide IX. La masse moléculaire des protéines contenues dans le virus est de  $150 \times 10^6$  daltons. Le poids moléculaire du IX est de 12.500. Le calcul suivant :

$$\frac{150 \times 10^6 \times 2,4}{100 \times 12.500} = 288$$

permet de dire que 288 polypeptides IX sont présents par virus.

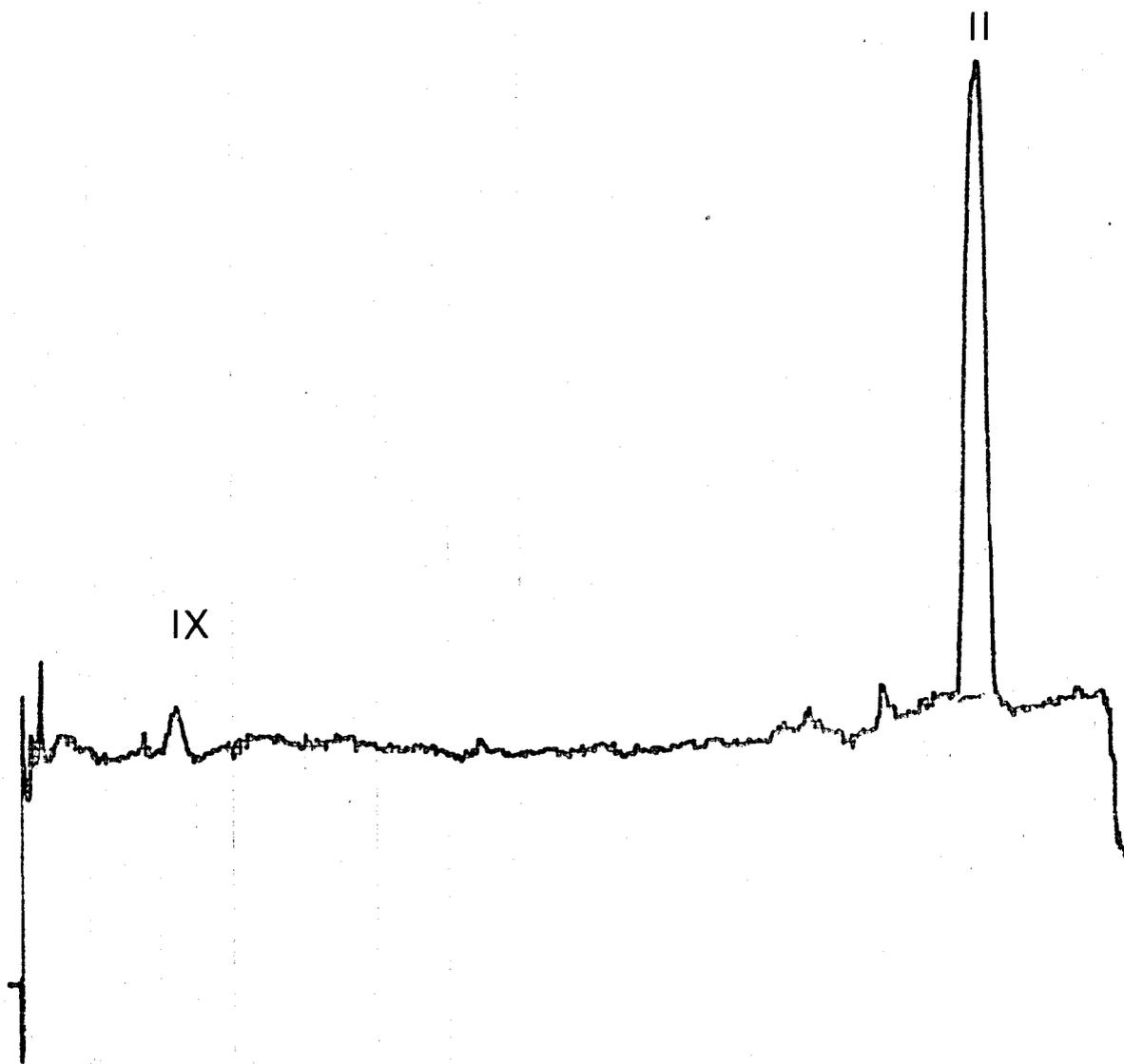


FIGURE 22

Enregistrement densitométrique des protéines des groupes de 9 :

Enregistrement de la piste du gel de polyacrylamide où a migré la  
fraction 13 du gradient de glycérol 10-40 %

( voir Figure 19 )



Puisque la capside virale se dégrade en 20 groupes de 9 hexons, on peut déduire que  $\frac{288}{20} = 14,4$  polypeptides IX sont présents par groupe de 9. Cette valeur est proche de la valeur 13,6 trouvée pour le nombre de IX dans les groupes de neuf hexons par enregistrement du gel coloré.

## C/ ETUDE DU POLYPEPTIDE IX DANS LES GROUPES DE 9

---

### APRES ACTION DE LA TRYPSINE

---

Plusieurs techniques permettent d'obtenir des groupes de 9 identiques morphologiquement (en microscopie électronique). Deux techniques sont particulièrement employées : la dissociation au DOC 0,5 % (RUSSELL et coll., 1971 - 104) utilisée pour ce travail et le traitement par la trypsine (PEREIRA et SKEHEL, 1971 - 105). Nous avons étudié si l'action de la trypsine apportait des modifications à la structure polypeptidique et au comportement antigénique des groupes de 9 préparés par dissociation au DOC.

#### 1. Structure polypeptidique des groupes de 9 traités par la trypsine

-----

Les groupes de 9 traités et non traités par la trypsine (rapport enzyme : substrat 2 : 100, 18 h à 37°C) sont dissociés en milieu SDS - Urée et déposés sur gel de polyacrylamide 17,5 %-SDS. Après 16 h d'électrophorèse dans les conditions habituelles les gels sont colorés (Fig. 23). Le polypeptide hexon (120 000) et le polypeptide IX (12 500) ont disparu après traitement par la trypsine. En revanche, des bandes protéiques inhabituelles sont visibles : une bande majoritaire de migration plus rapide que l'hexon (80 000) et deux bandes mineures (16 500 - 15 500). Il semble donc que la trypsine ait dégradé partiellement l'hexon en laissant un "core" de 80.000 de poids moléculaire. Le IX serait digéré en petits fragments échappant à l'analyse sur ce type de gel d'acrylamide.

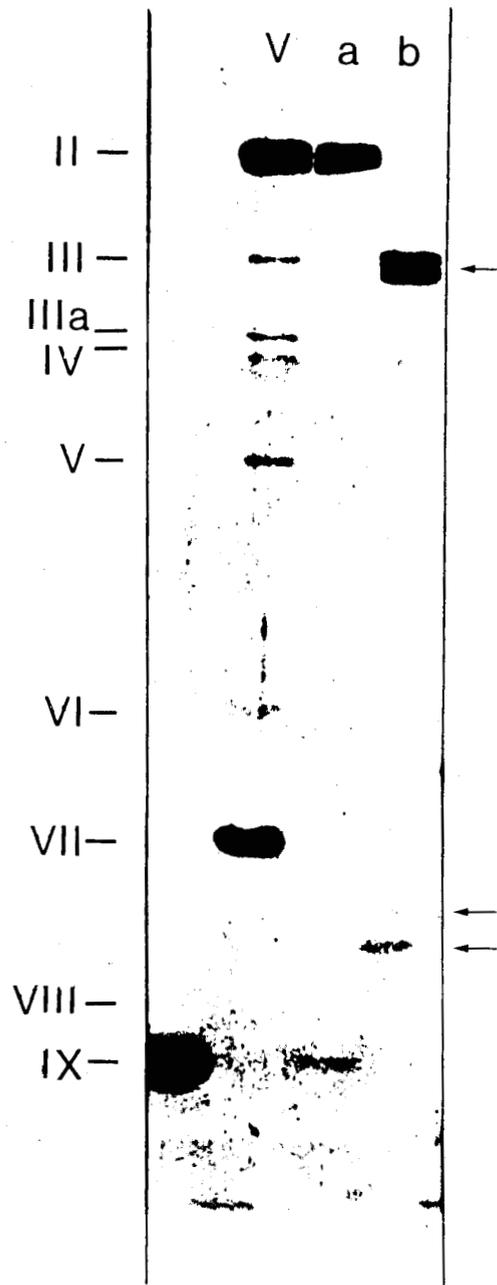


FIGURE 23

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 17,5 % - SDS  
des groupes de 9 hexons préparés par traitement au DOC 0,5 %  
avant (a) et après (b) digestion par la trypsine.

Les protéines de l'adénovirus de type 2 sont utilisées  
comme marqueurs de poids moléculaire (V).

## 2. Comportement immunologique des protéines des groupes de 9

---

Le comportement immunologique est étudié par immunodiffusion dans de l'agarose 1 % (tampon véronal pH 8,6) en présence d'un sérum monospécifique anti-polypeptide IX.

Les groupes de 9 préparés par dissociation du virus au DOC 0,5 %, avant et après digestion par la trypsine, et les protéines virales solubles contenues dans le surnageant de cultures cellulaires infectées, avant et après digestion par la trypsine, sont mis en diffusion contre le sérum anti-IX.

Les groupes de 9, digérés ou non par la trypsine, présentent un arc de précipitation avec le sérum anti-IX, alors que le surnageant protéique de cellules infectées traité par la trypsine ne présente plus d'arc de précipitation avec l'anti-IX (Fig. 24).

Nous pouvons donc conclure que le polypeptide IX est sensible à l'action de la trypsine. Lorsqu'il est à l'état libre ses déterminants antigéniques sont entièrement dégradés, alors que lorsqu'il est associé aux hexons dans les groupes de 9 hexons, son (ou ses) site(s) antigénique(s) semble(nt) préservé(s), bien que sa chaîne polypeptidique soit clivée (comme le montrent les gels dissociants en milieu SDS).

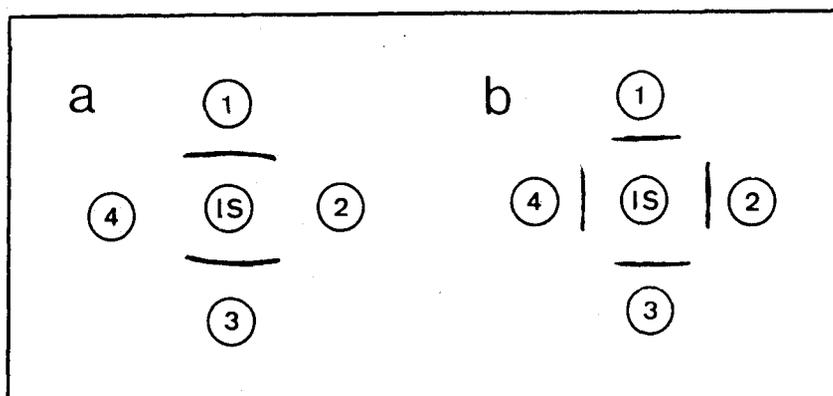


FIGURE 24

Immunodiffusions (Ouchterlony)

IS : sérum anti-polypeptide IX :

a : Surnageant de cultures cellulaires infectées contenant les protéines solubles de l'adénovirus

1 et 3 : non digéré

2 et 4 : digéré par la trypsine.

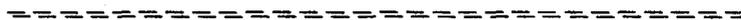
b : Groupes de 9 hexons préparés par traitement au DOC 0,5 %

1 et 3 : non digérés

2 et 4 : digérés par la trypsine.



## DISCUSSION DE LA DEUXIEME PARTIE



L'analyse comparative des spectres dichroïques des capsomères hexons libres et assemblés a été réalisée dans le but de mettre en évidence les conséquences possibles de l'engagement des capsomères dans des structures régulières sur la conformation de la protéine. La lecture des spectres dans la région de l'UV lointain donne des indications sur les modifications intervenant au niveau de la structure secondaire. Dans la région UV proche les indications concernent la structure tertiaire et en particulier les perturbations électroniques intervenant dans l'environnement des acides aminés aromatiques. Si un résidu aromatique se trouve à moins de 10 Å d'un autre résidu aromatique un couplage électronique s'établit (couplage  $\mu - \mu$ ) qui provoque une réponse intense sur le spectre. D'autres couplages peuvent exister entre les résidus aromatiques et des liaisons peptidiques (transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$ ).

Les spectres dichroïques dans l'UV proche des capsomères hexons libres et assemblés montrent des différences significatives bien que faibles. Des bandes négatives à 300, 290 et 283 nm apparaissent ou sont intensifiées lorsque les capsomères sont assemblés. Les longueurs d'onde des bandes observées sont caractéristiques du tryptophane ; il est donc possible que le noyau indole de certains tryptophanes soit impliqué dans la liaison entre les hexons des groupes de 9 sans que des perturbations importantes interviennent dans la structure tertiaire de la molécule d'hexon.

Le même type de liaison semble impliqué dans l'agrégation des protéines de la capsidite du virus de la mosaïque du tabac (VOGEL et JAENICKE, 1976 - 106).

L'absence de variations appréciables dans l'intensité des spectres dichroïques dans l'UV lointain des capsomères hexons libres et assemblés

suggère que l'assemblage des hexons en groupes de 9 ne s'accompagne pas d'altérations dans la structure secondaire de la molécule.

Les groupes de 9 dissociés en présence d'urée et de SDS et analysés sur gel de polyacrylamide-SDS se révèlent constitués de polypeptides II (hexon) et IX. Ce polypeptide de faible poids moléculaire (12 500) est bien associé à l'hexon car lors d'immunoélectrophorèse en double dimension les polypeptides IX (normalement basiques) migrent avec les hexons vers l'anode et sont précipités par leur anti-sérum.

Les groupes de 9 peuvent être préparés par deux techniques : traitement au désoxycholate ou à la trypsine, qui conduisent à des préparations de groupes de 9 identiques en microscopie électronique (PEREIRA et WRIGLEY, 1974 - 107). Les déterminants antigéniques des polypeptides IX dans les groupes de 9 sont également accessibles avant et après traitement par la trypsine comme le montrent les immunodiffusions en présence de sérum anti-IX. Néanmoins le traitement par la trypsine est plus drastique que le traitement au désoxycholate et cause des clivages à la fois dans la molécule d'hexon et dans celle du IX. L'analyse sur gel de polyacrylamide-SDS des groupes de 9, traités par la trypsine et dissociés en milieu SDS-Urée, montre que la sous-unité hexon est dégradée en un polypeptide majeur de plus faible poids moléculaire (80 000) et en deux petits polypeptides mineurs (16 500-15 500). Le polypeptide IX n'est plus détecté sur le gel après digestion par la trypsine, ses produits de clivage protéolytique étant vraisemblablement de très faibles poids moléculaires.

Malgré les coupures provoquées par la trypsine dans les chaînes polypeptidiques des hexons et des IX, la structure en groupes de 9 reste intacte (microscopie électronique) ainsi que les déterminants antigéniques des deux protéines. On peut donc penser que la trypsine ne peut hydrolyser que les liaisons spécifiques exposées à l'extérieur de la structure en groupes de 9. Cette structure est probablement suffisamment compacte et les interactions entre molécules protéiques suffisamment fortes pour empêcher la dissociation des produits clivés par protéolyse. Les coupures des chaînes polypeptidiques ne deviennent évidentes qu'après dégradation des groupes de 9 en milieu dissociant (SDS).

EVERITT et coll. en 1975 (108) suggèrent que le polypeptide IX est enfoui entre les hexons car dans le virus intact il n'est accessible aux anticorps anti-IX qu'avec une faible efficacité en double immunoprécipitation. Le polypeptide IX étant aisément détecté dans les groupes de 9 par immunodiffusion, nous pouvons penser que le polypeptide IX est enfoui entre les hexons du côté externe de la capsid. mais qu'il est apparent du côté interne, laissant ainsi accessibles certains des déterminants antigéniques du IX. La trypsine peut également cliver le IX mais les interactions du IX avec les hexons maintiennent les sites antigéniques encore réactionnels malgré les coupures.

D'autre part les tracés densitométriques des polypeptides du virus et des polypeptides des groupes de 9 donnent les résultats suivants :  
288 polypeptides IX sont présents par virus et 13,6 à 14,4 par groupe de 9.

D'après les observations de NERMUT (1975) (109) en microscopie électronique les capsomères hexons ont une forme prismatique triangulaire et apparaissent accolés les uns aux autres à l'intérieur des groupes de 9 par des contacts "sommet-arête" (voir Généralités, Fig. 9). L'hexon capsomère a une symétrie ternaire. Cette symétrie existe également dans un groupe de 9 (FRANKLIN et coll., 1972 - 110). Si une protéine IX est localisée à chaque point de contact "sommet-arête" de deux hexons voisins dans un groupe de 9, la symétrie ternaire du nonamère est respectée. Il y a ainsi 15 points de contact "sommet-arête" à l'intérieur d'un groupe de 9, et il faudrait donc 15 polypeptides IX par groupe de 9 soit 300 par virus intact. Ces chiffres théoriques sont très proches des résultats obtenus à partir des tracés densitométriques. Des modifications apportées au schéma de NERMUT permettent de rendre compte de cette hypothèse (Fig. 25).

Il reste à établir si le (ou les) tryptophane(s) impliqué(s) dans les interactions reliant deux hexons voisins dans un groupe de 9 sont localisés dans la chaîne polypeptidique de l'hexon lui-même ou dans celle du polypeptide IX ou dans les deux. La contribution du polypeptide IX au changement d'amplitude du spectre dans la zone 300-283 nm ne peut être établie définitivement car le contenu en tryptophane du polypeptide IX n'est pas connu. La

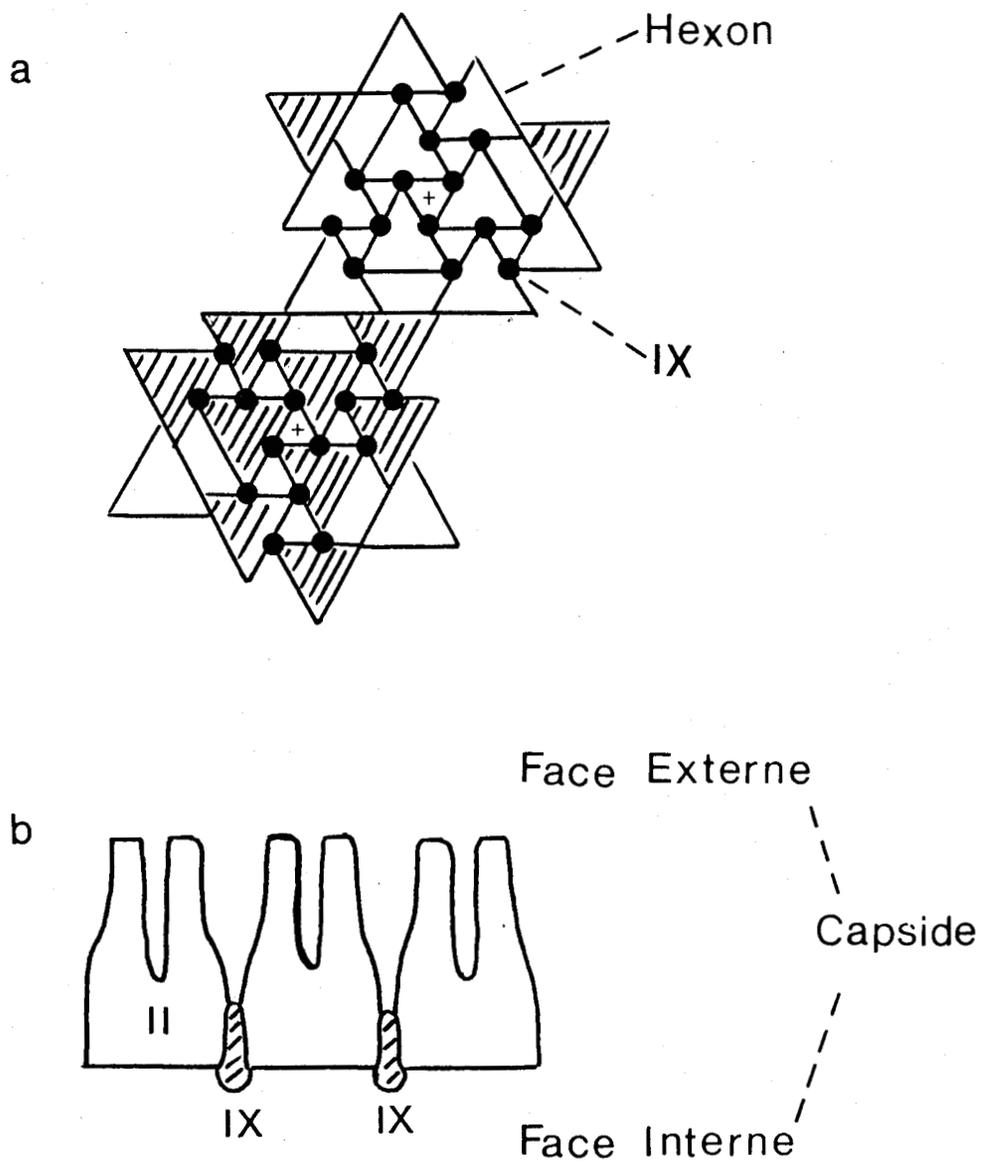


FIGURE 25

-----

Localisation des polypeptides IX dans les groupes de 9 aux points de contact "sommet-arête" :

- a : la disposition des IX permet de conserver la symétrie ternaire des groupes de 9 ( + : centre de symétrie ).
- b : le polypeptide IX est enfoui entre les hexons sur la face externe de la capside mais accessible sur la face interne.

proportion de tryptophane dans l'hexon est de 1,2 à 1,5 % et le spectre UV de la protéine native présente un épaulement à 293 nm spécifique du tryptophane.

La dégradation douce de la capside permet par conséquent d'étudier les interactions entre les capsomères à différents stades d'assemblage. Les résultats observés lors de ce travail conduisent à l'hypothèse suivante : les hexons seraient maintenus entre eux dans les groupes de 9 par l'intermédiaire de ponts hydrogène formés entre certains tryptophanes. Cet édifice semble la plus stable des sous-structures de la capside. Les liaisons entre deux nonamères voisins sont plus faibles que les liaisons intra-nonamériques. La présence de polypeptides IX associés aux hexons à l'intérieur du groupe de 9 peut contribuer à la stabilité de la structure nonamérique. La nature des liaisons inter-nonamériques reste à élucider.

TROISIEME PARTIE

---

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE ASSOCIEE A L'HEXON

## INTRODUCTION



Des réactions de protéolyse, en particulier le clivage d'un précurseur P-VII de 21 000 daltons de poids moléculaire en un produit VII de 18 000 daltons associé au DNA viral (ANDERSON et coll., 1973 - 111), sont mises en évidence lors de la maturation du virion. Ces réactions pourraient être catalysées par des enzymes cellulaires, par des enzymes induites par le virus dans la cellule infectée, ou par des protéines structurales du virus ayant une activité enzymatique. Dans l'adénovirus de type 2 une activité enzymatique (endonucléasique) a déjà été trouvée associée à une protéine structurale de la capsid (base du penton) par BURLINGHAM et coll. en 1971 (112).

Dans ce travail nous avons essayé de mettre en évidence une ou plusieurs activités protéasiques liées aux protéines virales. De nombreuses enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, subtilisine ...) ainsi que des estérases et des phosphotransférases possèdent une sérine dans leur site actif. Il existe un inhibiteur spécifique de ces enzymes à sérine : le di-iso-propyl-fluorophosphate (DFP) qui réagit uniquement avec les sérines du site actif (BALLS et JANSEN, 1952 - 113) (SCHAFFER et coll., 1953 - 114 et 1954 - 115) en donnant naissance à un composé covalent stable (Fig. 26). L'emploi de DFP radioactif permet de repérer parmi les protéines synthétisées celles qui possèdent une sérine active.

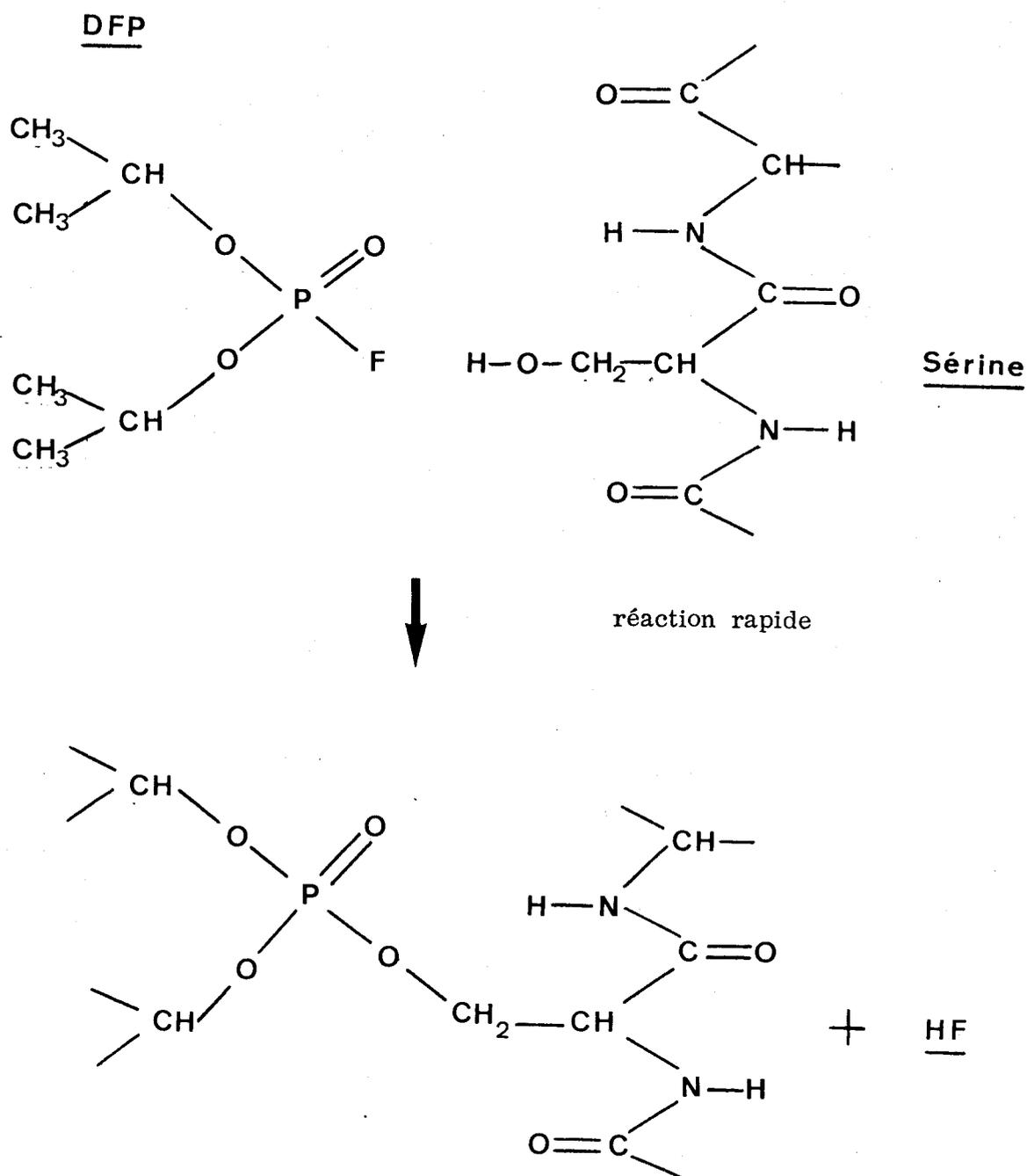


FIGURE 26

Le composé covalent stable formé peut s'hydrolyser lentement  
si l'enzyme n'est pas dénaturée.



## R É S U L T A T S

=====

## I - ANALYSE DES EXTRAITS CELLULAIRES INFECTÉS MARQUÉS AU DFP RADIOACTIF

-----

## A/ PRÉPARATION DES EXTRAITS MARQUÉS

Trois extraits cellulaires sont préparés :

1. Un extrait de cellules Hela non infectées sert de témoin.
2. Un extrait de cellules Hela infectées et recueillies 6 heures après l'infection permet d'étudier les protéines du stade précoce.
3. Un extrait de cellules Hela infectées et recueillies 24 heures après l'infection permet d'étudier les protéines du stade tardif.

Les cellules sont recueillies dans un tampon hypotonique, ultrasonnées et centrifugées à 15 000 g. Le surnageant est immédiatement incubé avec du DFP radioactif ( $^3\text{H}$  ou  $^{32}\text{P}$  - DFP).

## B/ ANALYSE PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DISSOCIANT

Une aliquote de chaque extrait cellulaire (100  $\mu$  l) est précipitée au TCA 10 % à froid durant 30 mn à 0°C. Le précipité est lavé avec du TCA 0,1 % froid, repris dans le tampon de dépôt (SDS - mercaptoéthanol et urée) chauffé 2 mn à 100° et déposé sur un gel de polyacrylamide 17,5 % - SDS dans les conditions habituelles. A la fin de l'électrophorèse le gel est séché, coloré au bleu de Coomassie et autoradiographié sur film Kodirex (Kodak). La coloration permet de repérer les protéines virales précoces

et tardives synthétisées par les cellules alors que l'autoradiographie ne révèle que les protéines possédant une sérine active sur laquelle se sera fixé du  $^{32}\text{P}$ -DFP. Les protéines virales du virus ( $^{14}\text{C}$ -Valine) dissociées en SDS servent de marqueurs de poids moléculaire (Fig. 27).

Aucune différence n'est visible entre les bandes marquées de l'extrait de cellules recueillies au stade précoce et de l'extrait de cellules non infectées. Dans l'extrait de cellules infectées recueillies au stade tardif, une protéine marquée au  $^{32}\text{P}$ -DFP et migrant au niveau du polypeptide de l'hexon (120 000) est visible. Elle n'est retrouvée ni dans l'extrait de cellules non infectées ni dans l'extrait de cellules infectées recueillies au stade précoce. Cette bande marquée a la même migration que la bande majoritaire colorée par le bleu de Coomassie et qui correspond à la sous-unité de l'hexon synthétisée dans la cellule infectée au stade tardif.

#### C/ ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DES EXTRAITS DE CELLULES

##### MARQUEES AU DFP- $^{32}\text{P}$

Le matériel protéique marqué au  $^{32}\text{P}$ -DFP au stade tardif est analysé contre des sérums anti-adénovirus de type 2 et anti-hexon de type 2.

Les extraits cellulaires (100  $\mu$  l) sont mis en présence des anti-sérums (20  $\mu$  l) et laissés 1 nuit à + 4°C. Les complexes antigène-anticorps solubles sont alors isolés sélectivement par les propriétés d'affinité de la protéine A de Staphylococcus Aureus pour les segments  $\text{F}_c$  des immunoglobulines, suivant la technique de CRAWFORD et LANE (1977) (116).

Le culot de cellules bactériennes est repris par le tampon de dépôt (SDS - urée), chauffé à 100°C, 2 mn et déposé sur un gel de polyacrylamide 17,5 %-SDS. Après électrophorèse le gel est séché, coloré et autoradiographié sur film Kodirex. Aucune protéine marquée n'est visible en autoradiographie alors que les protéines normalement précipitées par ces anti-sérums sont visibles en coloration.

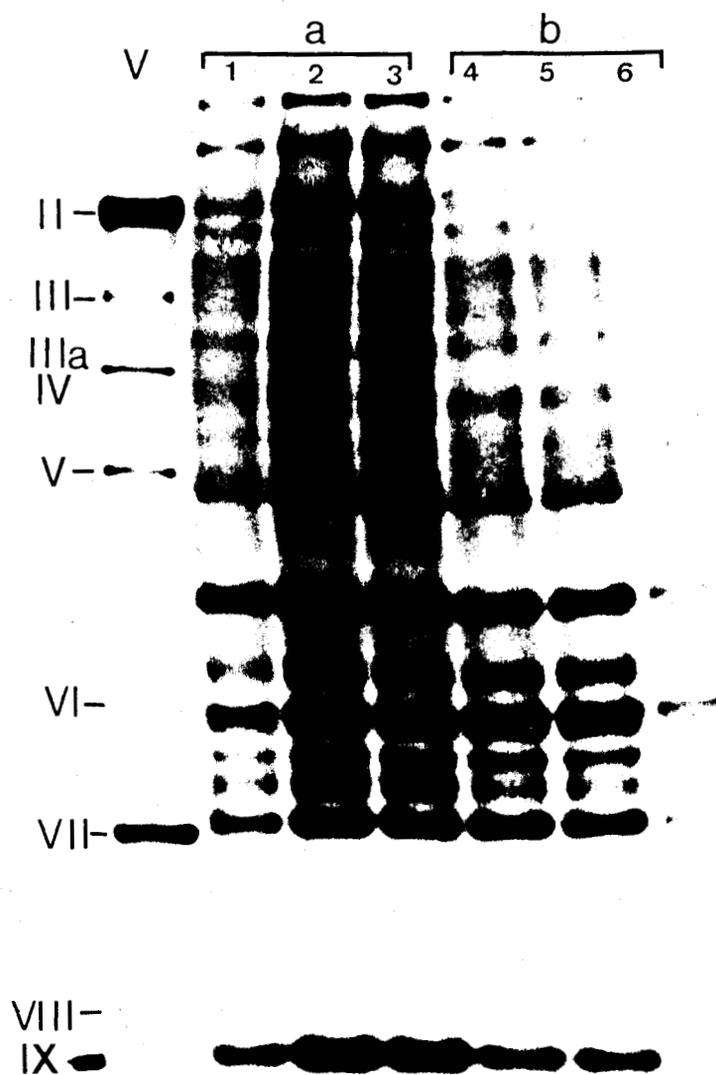


FIGURE 27

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 17,5 % - SDS des extraits de cellules Hela infectées et non infectées marquées au  $^{32}\text{P}$ -DFP.

a : Cellules infectées recueillies au stade tardif (1 : 10  $\mu\text{l}$ ,  
(2 et 3 : 20  $\mu\text{l}$ )

b : Cellules non infectées (4 et 5 : 20  $\mu\text{l}$ , 6 : 10  $\mu\text{l}$ ).

V : Les protéines de l'adénovirus de type 2 dissocié en milieu SDS servent de marqueurs de poids moléculaire.

Ce résultat permet d'émettre trois hypothèses :

- 1/ les protéines marquées ne sont pas des protéines virales et ne réagissent pas avec les anticorps ;
- 2/ ou bien la fixation du  $^{32}\text{P}$ -DFP sur une sérine active d'une protéine virale change la conformation de cette protéine et modifie ses déterminants antigéniques ;
- 3/ ou encore la fixation du DFP sur une protéine virale oligomérique non encore assemblée empêche l'assemblage des monomères en oligomères et par conséquent leur réactivité antigénique.

## II - LOCALISATION DES PROTÉINES MARQUÉES PAR LE DFP

-----

### A/ ÉTUDE DES JEUNES VIRIONS ET DES PROTÉINES SOLUBLES PAR

#### FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS CELLULAIRES SUR GRADIENT 25-40 %

Après 24 h d'infection des virus sont déjà formés dans la cellule. Dans le but de séparer les virions des protéines non encore assemblées en particules virales, les extraits de cellules infectées récoltées aux stades précoces et tardifs et l'extrait de cellules non infectées sont déposés sur gradient linéaire de sucrose 25-40 %. Après 95 mn de centrifugation (22.000 tours/mn à +4°C) dans un rotor SW 41, les gradients sont fractionnés. Chaque fraction est analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 17,5 %-SDS. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

Le gel coloré permet de repérer deux zones riches en protéines virales dans le gradient des extraits cellulaires marqués au stade tardif. Les fractions du sommet de gradient (6-12 S) contiennent les protéines non assemblées (protéines solubles). Les fractions du milieu du gradient correspondent aux virions (700-750 S). Le pic de virions contient à ce stade du cycle des virions matures et des virions immatures ou "jeunes virions" (ISHIBACHI et MAIZEL, 1974 - 117) qui ont la même constante de sédimentation.

Les fractions correspondant aux zones 750 S et 6-12 S des trois gradients sont rassemblées et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 17,5 % -SDS. Le gel est révélé par fluorographie (Fig. 28). Aucune bande protéique marquée isotopiquement n'est visible dans les pistes correspondant aux jeunes virions et aux virions matures pour les trois extraits cellulaires. Au contraire dans les pistes correspondant aux protéines solubles, des bandes marquées sont visibles. Une protéine de poids moléculaire 19 000 paraît fortement marquée dans les extraits cellulaires recueillis au stade précoce. Elle est à peine visible dans les extraits de cellules non infectées et semble très atténuée au stade tardif. Dans les extraits de cellules recueillies au stade tardif, la protéine de 120 000 daltons migrant comme l'hexon est toujours présente ; elle n'est visible ni dans les extraits de cellules non infectées ni au stade précoce.

Ces résultats permettent de dire qu'aucune protéine marquée au DFP n'est présente ni dans les "jeunes virions" ni dans les virus matures. D'autre part, le passage sur gradient semble avoir diminué la complexité protéique des extraits cellulaires et l'examen des fractions du sommet de gradient contenant les protéines libres nous permet de mettre en évidence une protéine de 19 000 marquée au DFP qui est présente au stade précoce. Elle est probablement masquée lors de l'électrophorèse des extraits "bruts".

Lors de l'infection virale, deux protéines ont donc une sérine active à un moment déterminé du cycle, soit au stade précoce (protéine de 19.000) soit au stade tardif (protéine de 120 000).

## B/ ÉTUDE DES VIRUS MATURES

Pour confirmer qu'aucune protéine de 120 000 n'est marquée au DFP dans les virus matures, 100  $\mu$  l de virus (adénovirus de type 2, 6 mg de protéines/ml et  $1,5 \times 10^{13}$  Pfu/ml) dissociés par une série de trois congélations et décongélations sont mis en présence de  $^{32}$ P-DFP durant 2 h. Le mélange réactionnel est alors dissocié en milieu Urée-SDS et déposé sur gel de polyacrylamide-SDS. Aucune bande marquée n'est visible, même après un temps long d'autoradiographie.

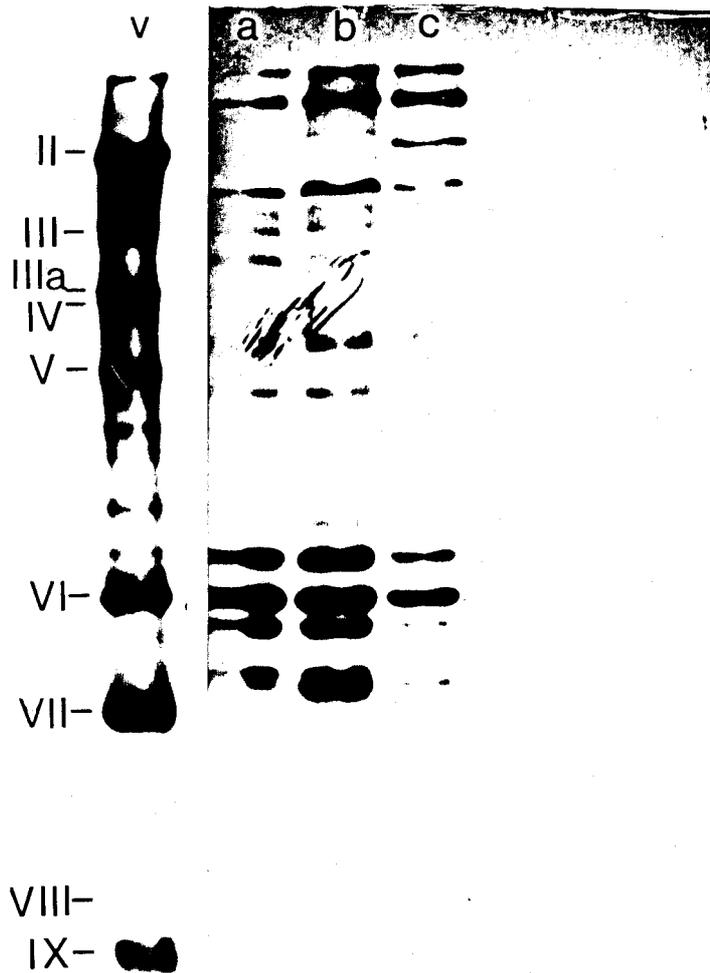


FIGURE 28

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 17,5 % - SDS des fractions du sommet des gradients de sucrose 25 - 40 % :

- a : Extrait de cellules non infectées (marquées au  $^3\text{H}$ -DFP)
- b : Extrait de cellules marquées au stade précoce
- c : Extrait de cellules marquées au stade tardif.

V : Protéines de l'adénovirus de type 2 dissocié en milieu SDS.



### III - DÉTERMINATION DE LA CONSTANTE DE SÉDIMENTATION DE LA PROTÉINE

#### MARQUÉE AU DFP AU STADE TARDIF

La protéine marquée au stade tardif de l'infection a un poids moléculaire apparent de 120 000 daltons en gel de polyacrylamide dissociant (SDS). L'analyse de cette protéine par électrophorèse en gel d'acrylamide non dissociant et la détermination de sa constante de sédimentation en gradient de sucrose doivent permettre de préciser si cette structure est oligomérique à l'état natif.

#### A/ GEL NON DISSOCIANT

Une aliquote de l'extrait de cellules infectées et marquées au stade tardif est analysée en gel de polyacrylamide 5 % pH 8,9. Après 5 h de migration à 5 mA par cm, le gel est séché et autoradiographié. Aucune protéine marquée ne semble co-migrer avec l'hexon natif témoin mais plusieurs bandes très marquées sont visibles au front de migration.

#### B/ GRADIENT DE SUCROSE 5-20 %

La sédimentation de la protéine marquée au DFP au stade tardif est analysée en gradient de sucrose 5-20 %. Les fractions des sommets des gradients 25-40 % dans lesquels ont sédimenté les extraits de cellules non infectées et infectées marqués au  $^3\text{H}$ -DFP au stade tardif sont dialysées contre un tampon borate de sodium 20 mM, pH 8, NaCl 1 M et EDTA 1 mM et déposées sur des gradients linéaires de sucrose 5-20 % dans le même tampon (volume final 12 ml). Une préparation d'hexons purifiés natifs et une préparation d'hexons dénaturés par 2 % de SDS et 1 % de mercaptoéthanol sont également déposées sur des gradients comme marqueurs de 12 S et 3,4 S constantes de sédimentation de l'hexon natif et de sa sous-unité polypeptidique (VELICER et GINSBERG, 1970 - 118).

Les gradients sont centrifugés dans le rotor SW 41 d'une centrifugeuse Spinco à 30.000 tours/mn durant 16 h puis fractionnés (0,3 ml). Une aliquote de chaque fraction (20  $\mu$ l) est précipitée au TCA 10 % à froid et sa radioactivité est comptée dans du liquide scintillant. Les courbes représentant les gradients des extraits de cellules infectées et non infectées ne présentent pas de différences majeures. La radioactivité des deux extraits se retrouve au sommet du gradient, au niveau 3,4 S, aucun pic de radioactivité n'est visible au niveau du 12 S (Fig.29 a et b). Les fractions 18 à 21 et 28 à 33 correspondant aux positions des marqueurs 12 S et 3,4 S sont rassemblées, précipitées à froid au TCA 10 %, lavées au TCA 0,1 % et centrifugées. Les précipités sont repris dans le tampon de dépôt et analysés en gel de polyacrylamide 17,5 %-SDS. Après autoradiographie du gel aucune protéine marquée, de poids moléculaire apparent 120.000, n'est visible dans les fractions correspondant au marqueur 12 S alors qu'elle est présente, dans les fractions du sommet du gradient des extraits de cellules infectées, à 3,4 S (Fig. 30).

#### IV - TEST D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU CAPSOMERE HEXON

-----

Des essais d'activité protéasique sont réalisés suivant la méthode de BARETT (1967) (119) en utilisant l'hémoglobine de bœuf (2 %, poids/volume) dénaturée en milieu acide (HCl 1 N, pH 1,8, 1 h à 45°C) comme substrat.

La solution d'hémoglobine est dialysée contre un tampon phosphate de Na 0,05 M, pH 6,8 et mise en présence d'une solution d'hexons purifiés par la technique de BOULANGER et PUVION (1973) (120) et marqués à la Leucine <sup>3</sup>H. Des aliquotes sont incubées à pH 6,8 et 37°C durant 24, 48 et 72 heures et les protéines sont précipitées par addition d'un volume égal de TCA à 20 %. L'estimation des acides aminés libérés et des peptides acido-solubles se fait par mesure de l'absorption du surnageant TCA à 278 nm et par comparaison avec l'absorption à 278 nm du surnageant trichloracétique

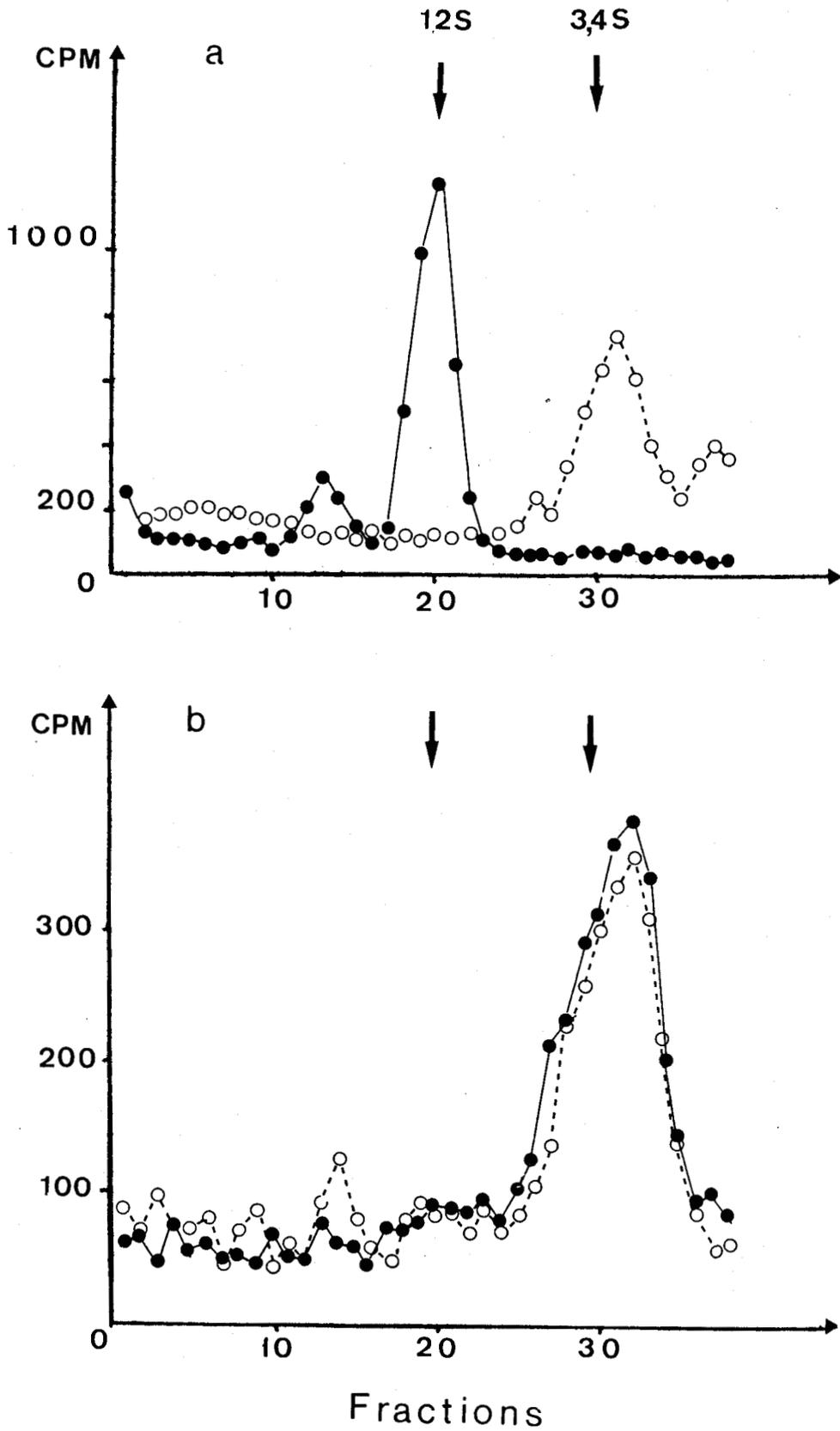


FIGURE 29

Gradients de glycérol 5 - 20 %.

a : Témoins hexon natif 12 S ( ●—● ) et hexon dénaturé 3,4 S ( ○--○ )

b : Extraits de cellules marquées au <sup>3</sup>H-DFP, non infectées ( ○--○ )  
 et infectées marquées au stade tardif ( ●—● )



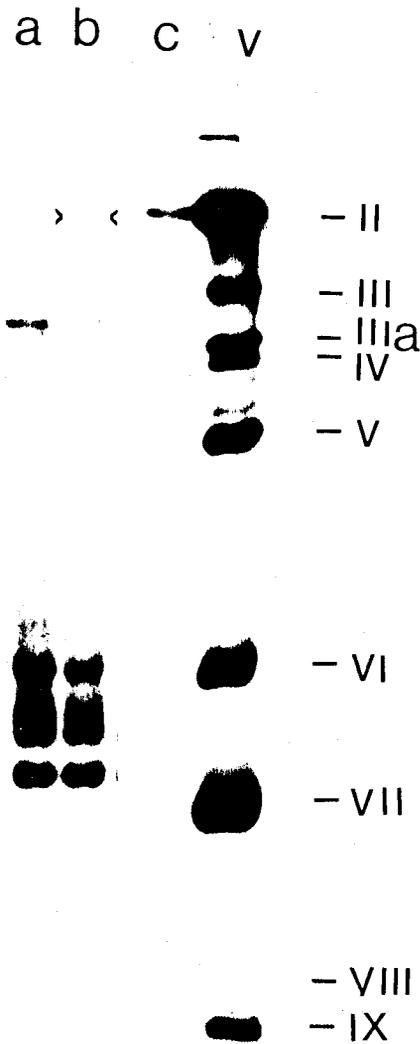


FIGURE 30

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 17,5 % - SDS des fractions 28-33  
du sommet du gradient de glycérol 5 - 20 % :

- a : extrait non infecté marqué au  $^3\text{H}$ -DFP
- b : extrait infecté marqué au  $^3\text{H}$ -DFP au stade tardif
- c : Témoin hexon (marqué à la  $^{35}\text{S}$ -methionine)

v : protéines de l'adénovirus de type 2 dissocié en milieu SDS.



du temps 0 de l'hydrolyse. L'hexon marqué au tritium est utilisé de façon à corriger la protéolyse spontanée éventuelle de l'hexon natif. Les résultats obtenus montrent qu'aucune activité protéasique n'est décelable dans l'hexon natif. De plus, l'hexon natif ne se dégrade pas lors de l'incubation.

## V - ISOLEMENT DE LA PROTÉINE 120.000 MARQUÉE PAR LE DFP

---

### A/ ÉLECTROPHORESE PRÉPARATIVE ET ÉLUTION

---

L'isolement de la protéine de poids moléculaire 120 000 marquée par le DFP au stade tardif et migrant comme l'hexon en gel de polyacrylamide -SDS est réalisé directement en découpant les bandes de gel colorées après électrophorèses préparatives effectuées dans les conditions habituelles. Les protéines du gel sont éluées électrophorétiquement dans un système Gradipore. La radioactivité totale de l'extrait cellulaire infecté marqué au stade tardif et déposé sur 2 gels préparatifs est de  $8,2 \times 10^6$  cpm (matériel acido-précipitable) et celle de l'éluat recueilli après élution des bandes de gel correspondant à l'hexon est de 18 000 cpm (soit 0,22 %).

### B/ CONTRÔLE ÉLECTROPHORÉTIQUE DE L'ÉLUAT

---

Les protéines de l'éluat sont analysées en gel de polyacrylamide 17,5 % -SDS. Une seule protéine colorée et marquée est visible. Elle a la même migration que le polypeptide hexon (Fig. 31).

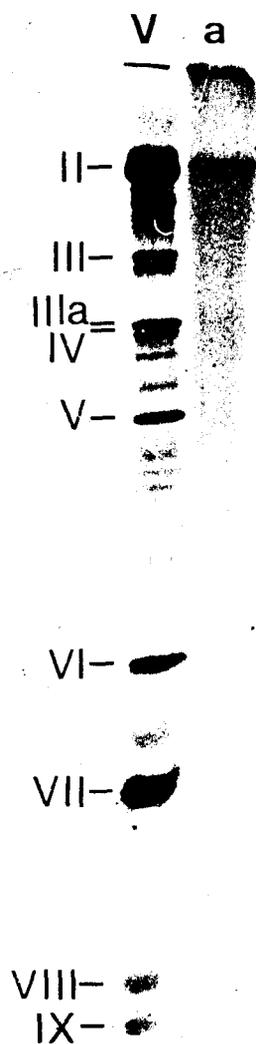


FIGURE 31

Isolement d'une protéine de 120 000 daltons marquée au  $^{32}\text{P}$  - DFP  
 par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide -SDS et élution  
 électrophorétique dans une cuve Gradipore.

a. contrôle électrophorétique de l'éluat de la bande de gel  
 migrant comme l'hexon.

V. protéines de l'adénovirus dissocié en SDS .

## DISCUSSION DE LA TROISIEME PARTIE

-----

Le di iso-propyl-fluorophosphate (DFP) se lie de façon covalente exclusivement avec une sérine active c'est-à-dire avec une sérine située dans un environnement électronique tel que l'hydrogène de son groupe OH soit mobile. Le marquage avec le DFP  $^3\text{H}$  ou  $^{32}\text{P}$  des extraits de cellules infectées ou non par de l'adénovirus de type 2 aux stades précoce et tardif montre que deux des protéines ayant réagi avec le DFP sont d'origine virale (ou du moins stimulée par l'infection virale). Une protéine de poids moléculaire 19 000 est marquée au stade précoce, elle n'est visible qu'après purification partielle des extraits sur gradient de sucrose. Elle pourrait correspondre à la protéine précoce 19-21 K décrite par WALTER et MAIZEL en 1974 (121) et par HARTER et coll. en 1976 (122), mais aucune preuve ne peut être apportée à cette hypothèse. Une protéine de poids moléculaire 120 000 est marquée au stade tardif ; elle a la même migration en gel de polyacrylamide dissociant que la sous-unité de l'hexon. Nous avons pris pour hypothèse de travail l'identité possible entre la protéine 120 000 marquée au DFP et le polypeptide de l'hexon et nous avons étudié à quel niveau de la transformation de la chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée en capsomère hexon, puis en virus, un résidu de sérine pouvait être actif et jouer un rôle critique.

Les immunoprécipitations en présence de sérums anti-protéines de l'adénovirus de type 2 et anti-hexon n'entraînent pas la protéine 120 000. S'il s'agit d'une protéine virale, le ou les site(s) antigénique(s) de cette protéine peuvent ne pas être accessibles lorsque le DFP est lié de façon covalente à la protéine, ou bien la protéine n'a pas encore atteint sa conformation définitive et ne possède pas encore de sites antigéniques capables de réagir avec les anticorps du sérum. En particulier, le polypeptide de l'hexon (monomère) ne réagit pas avec le sérum anti-hexon. Par fractionnement sur

gradient de sucrose 25-40 % nous avons montré que la protéine 120.000 marquée au DFP ne se retrouve ni dans les virions immatures ou "jeunes virions" qui contiennent encore les précurseurs P-VI, P-VII et P-VIII non clivés, ni dans les virus matures. De plus les protéines virales obtenues par dissociation du virus par congélations et décongélations successives ne sont pas réactives vis-à-vis du DFP. En revanche, la protéine marquée du DFP migrant comme l'hexon en gel dissociant se retrouve dans les fractions du sommet du gradient contenant les protéines virales solubles, non assemblées. Si la protéine marquée au DFP est bien l'hexon, celui-ci ne semble donc pas actif après assemblage ni en "jeunes virions" ni en virus matures.

Pour déterminer si le site actif se trouve dans la chaîne polypeptidique de 120 000 ou dans le trimère, nous avons étudié le poids moléculaire de la protéine marquée au DFP à l'état natif par analyse d'un gel non dissociant et par sédimentation en gradient de sucrose 5-20 %. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide 5 % non dissociant de l'extrait de cellules infectées marquées au stade tardif montre que toutes les protéines marquées au DFP migrent avec le front de migration et qu'aucune n'est visible au niveau du marqueur de l'hexon natif. D'autre part, en gradient de sucrose, l'hexon monomère (120 000) a une constante de sédimentation de 3,4 S et l'hexon natif trimère (360 000) une constante de 12 S. L'extrait de cellules infectées marquées au stade tardif est analysé en gradient de sucrose : l'essentiel de la radioactivité se retrouve à la position du marqueur 3,4 S. L'analyse électrophorétique en milieu SDS montre que la protéine marquée au DFP et spécifique des cellules infectées est localisée à la position 3,4 S dans le gradient et non pas à la position 12 S.

Si nous gardons l'hypothèse de travail que la protéine marquée spécifiquement au DFP au stade tardif du cycle dans les cellules infectées et co-migrant en gel de polyacrylamide dissociant avec le polypeptide de l'hexon correspond bien à l'hexon, les résultats obtenus nous permettent de dire que l'hexon réactif au DFP n'est pas actif immunologiquement, qu'il n'est pas actif lorsqu'il est assemblé en "jeune virion" et en virus mature

et qu'il est sous forme monomérique lorsqu'il se lie covalentement avec le DFP. Le résidu de sérine actif sur le monomère devient non réactif dans le trimère.

Ces résultats suggèrent l'hypothèse suivante : le DFP marquerait une sérine active sur la chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée qui n'a pas encore atteint sa conformation spatiale ou n'est pas assemblée en trimère. Le site actif à sérine pourrait :

1. permettre le repliement de la chaîne polypeptidique en une conformation convenable pour son assemblage en capsomère. La formation du trimère immunologiquement actif s'accompagnerait donc d'un changement de conformation de la chaîne polypeptidique avec modification du site actif contenant une sérine.
2. intervenir directement dans les interactions entre les chaînes polypeptidiques dans les capsomères.
3. posséder une activité enzymatique (par exemple : protéasique) permettant l'assemblage. Un clivage protéolytique limité précéderait l'assemblage en trimère. Cette activité disparaîtrait après assemblage complet du capsomère.

Les hypothèses proposées prennent pour principe l'identité de l'hexon et de la protéine 120 000 marquée au DFP. Il est donc indispensable d'apporter la preuve de cette identité. Pour cela nous nous proposons de comparer les protéines marquées au DFP lors de l'infection par des adénovirus de plusieurs sérotypes. Les hexons des sérotypes 5 et 12 ont une chaîne polypeptidique plus légère que l'hexon de type 2 (120 000) : 98 700 pour l'hexon d'adénovirus de type 5 et 93 400 pour l'hexon d'adénovirus de type 12 (MARUSYK, communication personnelle). En utilisant ces trois sérotypes nous pourrions voir si la protéine marquée au  $^{32}\text{P}$ -DFP migre toujours comme une protéine de 120 000 en gel de polyacrylamide dissociant ou si son poids moléculaire varie en fonction du sérotype. De plus une localisation de la sérine marquée sur la chaîne polypeptidique de l'hexon

par "finger-prints" serait intéressante : pour cela nous envisageons d'étudier les peptides de l'hexon après digestion par une enzyme (chymotrypsine ou trypsine), ou après coupure des liaisons méthionyles par le bromure de cyanogène, de la protéine 120 000 marquée au  $^{32}\text{P}$ -DFP isolée par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide-SDS. Les peptides obtenus seront analysés par co-chromatographie sur échangeur d'ions ("finger prints" sur colonne de Chromobeads - P) avec les peptides de l'hexon témoin marqués aux acides aminés  $^3\text{H}$ . Les techniques classiques d'électrochromatographies sur couche mince ne sont pas applicables ici car l'addition du diisopropylfluorophosphate à un peptide change l'affinité de celui-ci pour les solvants organiques de chromatographie.

---

CONCLUSION      GENERALE

---

L'étude d'une protéine telle que l'hexon comportant une séquence de près de 1 000 acides aminés par sous-unité et une extrémité N-terminale bloquée par acétylation n'est pas facile à aborder. La mise en évidence d'une classe particulière d'hexons, les "hexons lents", nous apparaissait donc comme une voie d'approche intéressante pour l'étude de la structure et de la physiologie des capsomères hexons. La maturation par clivage protéolytique des protéines de structure semble un processus très général chez les bactériophages comme chez les virus animaux. La présence de deux populations d'hexons dans la cellule infectée par l'adénovirus de type 2 orientait donc nos recherches dans trois directions :

1. la caractérisation de la classe mineure d'hexons lents et la détermination du type d'hexons encapsidés dans la particule virale ;
2. la mise en évidence des interactions entre molécules d'hexons et polypeptides de connexion à l'intérieur des groupes de 9 hexons formant les faces et une partie des arêtes de la capsid virale ;
3. la recherche d'une activité protéolytique associée à l'hexon.

Notre travail a conduit à un certain nombre de résultats. Les hexons lents correspondent à un clivage protéolytique à l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique d'hexons normaux qui la prive d'une cinquantaine de résidus. Certaines données expérimentales suggèrent qu'une faible fraction des chaînes polypeptidiques des hexons ne sont pas N-acétylées et semblent

donc plus sensibles à une protéolyse. Ceci confirme le rôle protecteur de la N-acétylation vis-à-vis de certaines protéines de structure comme le suggérait JÖRNVALL (1975) (123) dans une revue générale récente. Mais ces hexons lents ne servent pas à former la capsid virale qui est constituée d'hexons à sous-unités polypeptidiques normales. Les hexons sont maintenus dans les faces de l'icosaèdre par des liaisons hydrophobes assez résistantes (puisque'elles résistent au désoxycholate, à la pyridine et aux faibles concentrations de SDS) dans lesquelles sont impliqués des résidus de tryptophane.

Bien qu'il ne semble pas que la maturation par clivage protéolytique soit nécessaire pour l'assemblage des hexons en capsides virales, nous avons mis en évidence une protéine possédant une sérine active capable de fixer le di iso-propyl-fluorophosphate au stade tardif du cycle infectieux. L'étude préliminaire de cette protéine nous fait penser qu'il s'agit de la chaîne polypeptidique de l'hexon. Le blocage de cette sérine empêcherait le polypeptide de se replier et/ou de s'assembler en trimère ayant la conformation spatiale nécessaire à son activité antigénique. Aucune sérine active n'est retrouvée dans la particule virale assemblée et aucune activité protéolytique n'est associée aux capsomères hexons.

L'étude de certains mutants thermosensibles d'adénovirus de type 2 portant une lésion sur le polypeptide de l'hexon pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme de repliement et d'assemblage des sous-unités polypeptidiques du capsomère hexon.

---

A P P E N D I C E      T E C H N I Q U E

---

TECHNIQUES    PREPARATIVES

TECHNIQUES    ANALYTIQUES

## L E X I Q U E

=====

c p m	:	coups par minute
D F P	:	Di-iso-propyl-fluorophosphate
D N A	:	Acide désoxy ribonucléique
D O 260	:	Densité optique à 260 nm
D O C	:	désoycholate de sodium
E D T A	:	Acide éthylène diamine tétracétique
P P O	:	2,5 paradiphényl oxazole
P O P O P	:	(1,4 - di (2,5) - phényl oxazolyl) benzène
P B S	:	Tampon phosphate isotonique
R N A	:	Acide ribonucléique
S	:	Constante de sédimentation en unité Svedberg
S D S	:	Dodécyl sulfate de sodium
T C A	:	Acide trichloracétique
T E M E D	:	N, N, N', N' tétraméthylène diamine
T R I S	:	Amino -2 -hydroxyméthyl -2 -propanediol 1,3



## UNITÉS DE MESURE

LONGUEUR			
m		mètre	
cm		centimètre	$(10^{-2} \text{ m})$
mm		millimètre	$(10^{-3} \text{ m})$
$\mu \text{ m}$		micromètre	$(10^{-6} \text{ m})$
nm		nanomètre	$(10^{-9} \text{ m})$

MOLARITÉ			
M		Mole	
mM		millimole	$(10^{-3} \text{ M})$
$\mu \text{ M}$		micromole	$(10^{-6} \text{ M})$
nM		nanomole	$(10^{-9} \text{ M})$
p M		picomole	$(10^{-12} \text{ M})$

RADIOACTIVITÉ			
Ci		Curie	
mCi		millicurie	$(10^{-3} \text{ Ci})$
$\mu \text{ Ci}$		microcurie	$(10^{-6} \text{ Ci})$

TEMPS			
h		heure	
mn		minute	
s		seconde	

VOLUME			
l		litre	
ml		millilitre	$(10^{-3} \text{ l})$
$\mu \text{ l}$		microlitre	$(10^{-6} \text{ l})$



## TECHNIQUES PREPARATIVES

## I - CULTURES DE CELLULES

## A/ CELLULES KB EN SUSPENSION

Les cellules KB en suspension sont maintenues en phase exponentielle de croissance à 37°C sous une agitation de 300 tours/mn dans du milieu de Eagle modifié par Joklik (Grand Island biological Co) additionné de 5 % de sérum de cheval inactivé préalablement 30 mn à 56° .

## B/ CELLULES HELA EN MONOCOUCHE

Les cellules Hela sont cultivées en monocouche dans des flacons Falcon à + 37°C dans un milieu minimum essentiel (MEM) additionné de 10 % de sérum de veau. L'infection se fait lorsque les cellules sont à confluence, il y a alors environ  $15 \times 10^6$  cellules par flacon de 250 ml.

## II - PREPARATION DU VIRUS

## A/ INFECTION

Les cellules KB en suspension sont concentrées à  $10^7$  cellules par ml de milieu de Joklik et infectées à 10-20 particules infectieuses par cellule.

Après 1 heure d'absorption à 37°C, la concentration cellulaire est ramenée à  $3 \times 10^5$  cellules par ml en ajoutant du milieu de culture frais. Les cellules sont laissées à 37° pendant 36 h, la durée du cycle de multiplication virale dans les cellules KB en suspension étant de 36 à 40 h.

## B/ EXTRACTION

---

Toutes les opérations suivantes sont effectuées à + 4°C.

Les cellules sont centrifugées (10 mn, 600 g), lavées avec du P.B.S. (tampon phosphate de sodium, isotonique) et remises en suspension dans un tampon hypotonique (Tris 0,01 M, pH 6,8, EDTA 1 mM : 10 ml pour 1 litre de cellules). La suspension cellulaire est soumise à une série de trois congélations et décongélations successives (passages de - 70° à + 37°C). Les particules virales sont extraites par homogénéisation en présence de 1 volume de fréon 113 (trifluoroéthane) dans un homogénéisateur Ultra Turax, puis centrifugées (25 mn, 700 g).

La phase aqueuse est déposée sur un coussin de 1 ml de chlorure de césium (CsCl) de densité 1,43 et centrifugée 1 h à 20.000 tours/mn dans le rotor SW 27 d'une centrifugeuse Spinco. La bande opalescente, contenant le virus, formée au-dessus du coussin de CsCl est recueillie, ajustée à la densité 1,34 par addition de CsCl solide et centrifugée (20 h, 30.000 tours/mn dans un rotor SW 50). Un gradient de CsCl se forme durant la centrifugation et la bande virale opalescente se trouve à la densité 1,34. Cette bande est recueillie, dialysée pour éliminer le CsCl et conservée à - 20°C dans du glycérol 50 % pour éviter l'inactivation du virus par congélation et pour inhiber l'activité endonucléasique associée au penton.

## C/ PREPARATION DE VIRUS MARQUES A LA VALINE <sup>14</sup>C

---

Les cellules sont infectées dans les mêmes conditions, la valine <sup>14</sup>C (280 mCi/mMol., Amersham) est ajoutée à la 18ème heure après l'infection (1  $\mu$  Ci/ml).

L'extraction et la purification sont identiques à celles décrites précédemment.

### III - PURIFICATION DES PROTEINES SOLUBLES DE L'ADENOVIRUS

---

Lors de la purification du virus, après la première centrifugation sur coussin de CsCl, le surnageant au-dessus de la bande virale opalescente contient l'excès de protéines virales solubles synthétisées par la cellule.

#### A/ PREPARATION DES HEXONS NORMAUX ET LENTS

---

Les protéines du surnageant sont purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium à 55 % de saturation et à pH 6,5 (18 h, + 4°C). Le précipité formé est centrifugé (5.000 tours/mn, 15 mn), redissous dans du phosphate de sodium 0,05 M, pH 6,8 et dialysé contre ce même tampon. Les protéines (200 à 300 mg) sont alors déposées sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals) de 2,5 x 25 cm, équilibrée en phosphate de Na 0,05 M, pH 6,8 et réfrigérée à + 4°C. La résine est lavée avec le tampon de départ puis un gradient linéaire de phosphate de Na 0,05 M, pH 6,8 contenant du NaCl de 0 à 0,5 M (volume total : 500 ml) est appliqué au sommet de la colonne. La vitesse d'écoulement de la colonne est de 12 ml/h et des fractions de 3 ml sont collectées. L'absorption à 278 nm de chaque fraction est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss. De même la force ionique de chaque fraction est déterminée par conductimétrie. Les fractions correspondant à chaque pic d'absorption sont recueillies et purifiées par une seconde chromatographie sur DEAE-Sephadex dans les mêmes conditions.

## B/ PREPARATION D'HEXONS NORMAUX ET LENTS MARQUES A $^{125}$ IODE

---

2  $\mu$  g d'hexons normaux et 2  $\mu$  g d'hexons lents natifs (purifiés suivant la technique décrite ci-dessus) sont marqués à l' $^{125}$ Iode par la méthode à la chloramine T de HUNTER et GREENWOOD en 1962 (124).

2 à 5  $\mu$  g de protéines dissous dans 0,025 ml de phosphate de Na 0,05 M, pH 7,5 sont mélangés à l' $^{125}$ Iode en présence de 100  $\gamma$  de chloramine T (Eastman Kodak) comme agent oxydant. Après 1 mn d'agitation à température ordinaire on ajoute 0,1 ml de métabisulfite de Na (2,4 mg/ml de phosphate de Na 0,05 M, pH 7,5) pour arrêter la réaction en convertissant l'iode en iodure. Cet iodure est dilué avec de l'iodure de potassium (0,2 ml d'une solution à 10 mg/ml dans du phosphate de Na). Les protéines sont séparées des réactifs par passage sur une colonne de Sephadex G-50 (10 ml).

## C/ PURIFICATION SUPPLEMENTAIRE DES HEXONS SUR HYDROXYAPATITE

---

Pour les mesures optiques les hexons utilisés sont soumis à une étape supplémentaire de purification : adsorption sur hydroxyapatite préparé suivant la technique de MAIN et coll. (1959) (125). Les fractions de DEAE-Sephadex correspondant à l'hexon sont rassemblées et dialysées contre du phosphate de K 10 mM, pH 6,8. La colonne d'hydroxyapatite (1 x 20 cm) est équilibrée dans le même tampon et réfrigérée à +4°C. 25 à 30 mg sont déposés au sommet de la colonne et lavés avec le tampon phosphate de K 10 mM. Un gradient linéaire de molarité croissante en phosphate de K pH 6,8 de 10 à 300 mM (volume final : 120 ml) permet d'éluer l'hexon à 0,180 M.

## IV - ISOLEMENT DES GROUPES DE 9 HEXONS

-----

Les groupes de 9 sont isolés à partir des particules virales purifiées en CsCl (densité 1,34). Les virus de la bande opalescente sont dialysés contre un tampon Tris-HCl 5 mM, pH 7,8 et dissociés par chauffage à 56°C durant 90 secondes en présence de DOC (désoxycholate de sodium) 0,5 % (poids/volume). La dissociation est mise en évidence par la soudaine disparition de l'opalescence de la suspension virale (RUSSELL et coll., 1971 126). Les constituants de la suspension virale sont purifiés sur gradient de glycérol de 10 à 40 % (poids/volume) dans un tampon Tris-HCl 5 mM, pH 7,8. Chaque gradient est réalisé sur un coussin de 1 ml de glycérol 80 % (volume final : 12 ml) et centrifugé à 35.000 tours/mn à +4°C durant 80 mn dans un rotor SW 41. Les gradients sont recueillis en fractions de 0,6 ml et la mesure de leur absorption à 260 et 280 nm permet de définir plusieurs pics qui sont séparés et examinés en microscopie électronique. Chaque fraction est analysée en électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS après réduction par le 2-mercaptoéthanol et dénaturation en présence de SDS et d'Urée à 100°C. Les fractions contenant les groupes de 9 sont rassemblées, dialysées contre du tampon phosphate de Na 50 mM, pH 6,8 et chromatographiées sur DEAE Sephadex A-50 équilibrée dans le même tampon.

Un gradient de NaCl de 0 à 0,6 M dans le tampon d'équilibration permet de séparer les groupes de 9 et les hexons libres qui pourraient encore contaminer la préparation. Les groupes de 9 exclus du gel de Sephadex sont élués dans le volume mort de la colonne.

Pour obtenir une préparation de groupes de 9 marqués, la purification se fait à partir de virus marqués à la valine <sup>14</sup>C.

V - PREPARATION DE PROTEINES MARQUEES AU  $^{32}\text{P}$ -DFP

## A/ INFECTION

Des boîtes Falcon contenant des cellules Hela à confluence sont utilisées. Ces cellules sont infectées à une multiplicité d'infection de 50 particules par cellule.

Les cellules sont recueillies dans du tampon isotonique (PBS), centrifugées à 2.000 tours/mn puis reprises dans 0,5 ml de tampon hypotonique (Tris-HCl, pH 7,8, EDTA 2 mM). Après une série de 3 congélations et décongélations (passages de  $-70^{\circ}$  à  $+37^{\circ}$ ), les cellules sont rompues par sonication 15 secondes à l'aide d'un générateur à ultra-sons (Branson Sonifier Model B 12) et centrifugées à 10.000 tours/mn (15.000 g) 15 mn à  $+4^{\circ}$ .

## B/ MARQUAGE

Le surnageant est immédiatement mis en contact avec le  $^{32}\text{P}$ -DFP (diisopropylfluorophosphate). Le  $^{32}\text{P}$ -DFP sec (0,410 mCi/mg soit 87 mCi/mmol, Amersham) est repris par du propylène glycol. Chaque extrait cellulaire infecté ou non est marqué avec 1,6 mg soit 680  $\mu\text{Ci}$  de  $^{32}\text{P}$ -DFP. Le mélange réactif est laissé à température ambiante avec une agitation douce durant 1 h 30. Les extraits sont alors congelés à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

D'autres préparations ont été marquées au  $^3\text{H}$ -DFP (3400 mCi/mmol, soit 300  $\mu\text{Ci}$  par boîte). La décroissance très lente de la radioactivité du tritium permet des manipulations plus longues.

### C/ FRACTIONNEMENT SUR GRADIENT DE SUCROSE 25-40 %

---

Après dialyse contre un tampon borate de Na 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, pH 8, les extraits cellulaires marqués au  $^3\text{H}$ -DFP sont déposés sur des gradients linéaires de sucrose 25 à 40 % dans un tampon identique au tampon de dialyse (volume du gradient : 11 ml). Les gradients sont centrifugés 95 mn à 22.000 tours/mn (+ 4°C) dans le rotor SW 41 d'une centrifugeuse Spinco. Chaque fraction du gradient (0,6 ml) est analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 17,5 % - SDS après dénaturation.

### D/ ELECTROPHORESE PREPARATIVE ET ELUTION D'UNE PROTEINE

---

#### DE 120.000 DALTONS

---

L'extrait cellulaire infecté recueilli au stade tardif est précipité au TCA 10 % froid. Le précipité est centrifugé (5 mn, 5.000 tours/mn), lavé au TCA 0,1 % et repris par 500  $\mu$  l de tampon de dépôt (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contenant 2 % de SDS, 5 % de mercaptoéthanol, 3 M Urée et 0,001 % de bleu de bromophénol), dénaturé par la chaleur 2 mn à 100°C et déposé sur deux gels de polyacrylamide 17,5 % - SDS en plaque (conditions habituelles : voir Techniques analytiques). Les protéines du virus et 10  $\mu$  l de l'extrait cellulaire non infecté sont déposés sur le gel comme témoins.

Les gels sont colorés au bleu de Coomassie et les bandes correspondant à l'hexon sont découpées dans le gel à l'aide d'un scalpel, mises en suspension dans du tampon de dépôt et transférées dans une cuve Gradipore permettant l'élution de ces bandes de gel par entraînement électrophorétique des protéines à pH 8,9 durant 30 heures sous un voltage constant de 100 volts.

L'éluat est lyophilisé après dialyse contre de l'eau distillée.

---

## TECHNIQUES ANALYTIQUES

## I - METHODES DE DOSAGE

## A/ DOSAGE DES PROTEINES

La concentration en protéines des différentes préparations est déterminée par la méthode de LOWRY et coll., 1951 (127). Une gamme étalon de sérum albumine sert à tracer une courbe de référence.

## B/ DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE DES ECHANTILLONS

La radioactivité des échantillons a été évaluée :

1. soit par comptage direct d'une aliquote dans la solution scintillante de BRAY, 1960 (128) contenant 60 g de naphthalène, 4 g de PPO (2,5 - diphényloxazole), 0,2 g de POPOP (1,4 - di(2,5) - phényloxazolylbenzène), 20 g d'éthylèneglycol, 100 ml d'éthanol et du dioxanne pour faire 1.000 ml.
2. soit après précipitation des protéines au TCA 10 % durant 30 mn à froid. Les précipités sont recueillis sur filtres en fibre de verre, lavés 3 fois au TCA 0,2 % froid et 2 fois à l'éthanol froid. Après séchage, les filtres sont comptés dans 5 ml de milieu scintillant contenant 5 g de PPO et 0,3 g de POPOP dissous dans 1.000 ml de toluène.

## II - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les échantillons sont colorés avec du formiate d'uranyl 1 % et examinés à l'aide d'un microscope électronique Hitachi HU-12.

### III - ÉLECTROPHORESES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

---

#### A/ ÉTUDE DES PROTÉINES NATIVES EN MILIEU NON DISSOCIANT

---

L'électrophorèse est réalisée sur plaque de gel de polyacrylamide 5 % de 1,5 mm d'épaisseur, 10 cm de hauteur et 15 cm de largeur, dans un système tampon discontinu dérivé de celui de DAVIS (1964) (129) :

1. Echantillons : Les protéines natives sont équilibrées dans un tampon pH 6,8 non dissociant.
2. Gel de résolution : 30 ml d'une solution contenant 5 % d'acrylamide (rapport acrylamide - bisacrylamide, 30 : 0,8) et 0,375 M de Tris - HCl pH 8,9 sont polymérisés chimiquement par addition de 0,05 % (volume-volume) de TEMED (Tétraméthylène - diamine) et de 0,1 % de persulfate d'ammonium fraîchement préparé.
3. Gel d'espacement : Le gel de résolution est recouvert par un gel d'espacement contenant 3 % d'acrylamide (rapport acrylamide-bisacrylamide, 10 : 2,5) et 0,125 M Tris - HCl pH 6,8 polymérisés dans les mêmes conditions que le gel de résolution.
4. Electrophorèse : L'électrophorèse est effectuée à l'aide d'un tampon Tris 0,05, glyco-colle 0,384 M, pH 8,3, sous un voltage constant de 30 volts. Le bleu de bromophénol est utilisé comme marqueur de migration.

#### B/ ÉTUDE DES POLYPEPTIDES EN MILIEU DISSOCIANT

---

L'électrophorèse est réalisée sur plaque de gel de polyacrylamide 15,5 % ou 17,5 % (1,5 mm x 10 cm x 15 cm) dans le système tampon discontinu de LAEMMLI (1970) (130).

1. Echantillons : Les protéines sont dénaturées par chauffage à 100°, 2 mn dans un volume égal de tampon de dépôt (Tris - HCl 0,125 M, pH 6,8) contenant 4 % de SDS, 10 % de 2-mercaptoéthanol, 6 M urée et 0,001 % de bleu de bromophénol.

2. Gel de résolution : 30 ml d'une solution contenant 15,5 % d'acrylamide (rapport acrylamide-bisacrylamide, 50 : 0,235), 0,375 M de Tris-HCl pH 8,9 et 0,1 % de SDS, sont polymérisés chimiquement comme le gel non dissociant.
3. Gel d'espacement : Le gel d'espacement contient 5 % d'acrylamide (rapport acrylamide-bisacrylamide, 50 : 1,33), 0,125 M de Tris-HCl pH 6,8 et 0,1 % de SDS.
4. Electrophorèse : Le tampon d'électrophorèse (Tris 0,025 M, glycine 0,192 M, pH 8,3) contient 0,1 % de SDS. L'électrophorèse est effectuée sous un voltage constant de 30 volts (3 volts/cm) durant 16 h.

#### C/ COLORATION DES GELS

---

Les gels sont colorés avec du bleu de Coomassie (5 g/litre de mélange acide acétique/méthanol/eau, 2 : 5 : 10) durant 30 mn, puis l'excès de colorant est enlevé par plusieurs lavages dans un mélange acide acétique/méthanol/eau, 2 : 5 : 10).

#### D/ AUTORADIOGRAPHIES DES GELS

---

Lorsque des protéines marquées ( $^{32}\text{P}$  ou  $^{14}\text{C}$ ) sont déposées sur gel, celui-ci est coloré, séché sous vide (système Biorad) et autoradiographié sur film Kodirex (Kodak). Si la radioactivité des protéines est faible ou si un isotope à faible énergie est utilisé ( $^3\text{H}$ ), le rayonnement émis est amplifié par fluorographie suivant la technique de BONNER et LASKEY (1974) (131). Les gels sont déshydratés dans du DMSO (diméthylsulfoxyde), traités pendant trois heures dans une solution de PPO (2,5 - diphényl oxazole : scintillant primaire) à 20 % dans du DMSO, puis réhydratés une heure dans de l'eau distillée. Les gels sont séchés sous vide et autoradiographiés sur film Royal X-OMat (Kodak) à  $-70^\circ\text{C}$ .

#### IV - ISOELECTROFOCALISATION

-----

Les points isoélectriques (pHi) des hexons normaux et lents sont déterminés par isoélectrofocalisation dans un appareil LKB 2117 Multiflor. L'électrofocalisation est réalisée sur plaque de gel de polyacrylamide à 5 % (rapport acrylamide-bisacrylamide 29 : 0,9) contenant 10 % d'ampholines pH 4-6. La polymérisation est une réaction photochimique catalysée par de la riboflavine (2,5 µg/100 ml). L'échantillon est déposé sur le gel par l'intermédiaire d'un papier whatman I (0,5 x 1 cm). Un courant de 600 volts est appliqué aux extrémités du gel durant 16 h. A la fin de l'isofocalisation le gradient de pH est contrôlé à l'aide de microélectrodes de contact. La fixation et la coloration du gel sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment.

#### V - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

-----

##### A/ ANTISERUMS

1. Un sérum anti-hexon d'adénovirus de type 2 est préparé par injections répétées (6 injections à 10 jours d'intervalle) d'une solution d'hexons purifiés à partir d'un surnageant de culture infectée. Ce sérum réagit avec les adénovirus de type 2 et de type 5. Il est spécifique des déterminants de type et de groupe des hexons de type 2.
2. Un sérum anti-hexon de type 5 est préparé par injections d'une solution d'hexons purifiés de type 5. Il ne réagit qu'avec les déterminants de groupe des hexons de type 2.
3. Un sérum anti-déterminants de type des hexons de type 2 est préparé par injections répétées à un lapin, d'une solution d'hexons de type 2 préalablement digérés par la papaine (0,1 mg/ml, rapport enzyme-substrat 1:25) 48 h à 37°C dans un tampon phosphate de sodium pH 6,8 contenant 15 mM de 2-mercaptoéthanol.

Cette digestion détruit les déterminants de groupe mais laisse intacts les déterminants de type. En effet le sérum ne réagit pas avec les hexons de type 5 mais réagit avec les hexons de type 2.

4. Un sérum anti-polypeptide IX de l'adénovirus de type 2 est préparé par injections au lapin, de polypeptides IX purifiés à partir des groupes de 9 (préparés par traitement au DOC) dissociés en présence d'urée et chromatographiés sur QAE-sephadex A-25 (EVERITT et PHILIPSON, 1974 - 132).
5. Les sérums anti-polypeptide VI et anti-polypeptide VIII ont été préparés par le Dr. L. PHILIPSON (Uppsala).

#### B/ IMMUNODIFFUSION (TECHNIQUE D'OUCHTERLONY)

---

Antigènes et sérums (environ 10  $\mu$ l) sont déposés dans des puits creusés dans de l'agarose 1 % (tampon véronal pH 8,6). Les protéines diffusent en 16 h à température ambiante, dans une atmosphère humide.

#### C/ IMMUNOELECTROPHORESE

---

L'immunoélectrophorèse est réalisée sur des plaques d'agarose 1 % (Indubiose A-37, Industrie biologique française) dans un tampon véronal 0,02 M pH 8,6. Les antigènes sont déposés dans des puits de 2 mm de diamètre et migrent 2 h sous un voltage de 3 volts par cm. Une gouttière est ensuite creusée dans l'agarose et remplie avec l'anti-sérum. Les arcs de précipitation sont observés après 16 h de diffusion à température ambiante, dans une atmosphère humide.

#### D/ IMMUNOELECTROPHORESE EN DOUBLE DIMENSION

---

La technique utilisée est la technique de base de LAURELL (1965) (133) développée et modifiée par WEEKE en 1973 (134) et adaptée aux protéines de l'adénovirus par MARTIN et coll. en 1975 (135).

1. La première migration est effectuée dans un gel d'agarose 1 % (tampon véronal 0,02 M, pH 8,6). Quatre extraits antigéniques (10 à 20  $\mu$ l) peuvent être déposés sur une plaque de 9 x 11 cm. L'électrophorèse se déroule pendant 60 à 70 mn à 10 volts/cm dans une cuve réfrigérée à 13°C.
2. Chaque bande de gel correspondant à un dépôt (2 x 10 cm) est transférée sur une plaque de verre de 10 x 10 cm et le reste de la plaque est recouvert par de l'agarose 1 % contenant l'antisérum. La seconde migration s'effectue durant la nuit à 3 volts/cm dans un tampon véronal pH 8,6.
3. Les gels sont lavés à l'eau physiologique pour éliminer les anticorps non fixés, séchés et colorés au bleu de Coomassie 0,5 % dans un mélange éthanol 95°/acide acétique/eau (50 : 10 : 40) et décolorés dans le même mélange.

Les immunoélectrophorèses bidimensionnelles en tandem sont réalisées suivant KRØLL (1973) (136). Les dépôts sont disposés à environ 5 mm de distance.

#### E/ IMMUNOPRECIPITATIONS AVEC LA PROTEINE A

---

#### DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

---

La formation de complexes antigènes-anticorps n'est pas toujours visible (complexes solubles). L'addition de protéines A de *Staphylococcus Aureus* (FORSGREN et SJÖQUIST, 1966 - 137) se fixant sur les portions Fc des immunoglobulines provoque l'apparition d'un précipité qui peut être dissocié. Les antigènes spécifiquement précipités par le sérum sont alors analysés par électrophorèse sur de polyacrylamide-SDS.

Suivant la technique de CRAWFORD et LANE en 1977 (138) 10 à 25  $\mu$ l d'extrait cellulaire et 10 à 25  $\mu$ l de sérum sont mis en contact dans 50  $\mu$ l de tampon NET (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM et EDTA 5 mM) additionné de 0,05 % de Nonidet - P 40 (NP-40) et de 1 mg/ml de sérum albumine bovine. Après agitation le mélange est laissé 20 h à

+ 4°C, puis 10  $\mu$ l de la suspension de Staphylococcus Aureus BL-5018 (Bios Laboratories, Carfax Horsham, Sussex) sont alors ajoutés. Le mélange est agité et laissé 30 mn à température ambiante. Le précipité formé est lavé trois fois en tampon NET-NP 40 0,5 %, puis repris par 25  $\mu$ l de tampon de dépôt (SDS, Urée et 2-mercaptoéthanol).

## VI - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

-----

### A/ COMPOSITION EN ACIDES AMINES

---

1. Hydrolyse acide : 1 à 2 mg de protéines sont hydrolysées par de l'HCl 5,6 N à 110° durant 24 et 72 h dans des tubes scellés sous azote. De la tryptamine (1 mg/ml) est ajoutée avant l'hydrolyse pour éviter la dégradation du tryptophane (LIU et CHANG, 1971 - 139).
2. Hydrolyse enzymatique totale : 1 à 2 mg de protéines sont traitées par la pronase (1 %) durant 24 h puis par la leucine amino peptidase (1 %) durant 24 h supplémentaires.
3. L'analyse des hydrolysats acide et enzymatique est réalisée par un auto-analyseur Jeol modèle JLC 5-AH.
4. La composition en acides aminés est exprimée en moles pour 100 moles d'acides aminés totaux.
5. Le contenu en amides est calculé à partir de la différence existant entre les valeurs trouvées pour les acides dicarboxyliques dans l'hydrolysate acide (les amides sont désamidées et comptées avec les acides) et dans l'hydrolysate enzymatique.

## B/ HYDROLYSES ENZYMATIQUES SPECIFIQUES

---

1. L'hydrolyse chymotrypsique est réalisée à 37°C durant 24 h dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,05 M, pH 8,3 avec 0,1 mg/ml de chymotrypsine (recristallisée trois fois, Worthington).
2. La carboxypeptidase A (Worthington) agit à 37°C durant 24 h dans un tampon phosphate de sodium pH 6,5, 0,05 M (rapport enzyme-substrat de 1 : 25).
3. L'aminopeptidase M (aminoacid arylamidase, Boehringer) agit 24 h à 37°C dans un tampon phosphate de Na 0,05 M, pH 6,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM (Rapport enzyme-substrat 1 : 25).

## C/ CARTES POLYPEPTIDIQUES : ELECTROCHROMATOGRAPHIES

---

Les protéines marquées à l'<sup>125</sup>Iode sont hydrolysées par la chymotrypsine. Les hydrolysats sont lyophilisés, redissous dans de l'acide acétique 10 % et déposés sur plaques de cellulose de 20 x 20 cm. Une électrophorèse est réalisée dans la première dimension en présence d'un tampon acide acétique/acide formique/eau (8 : 2 : 90) pH 1,9 durant 50 mn à 900 volts. La plaque est séchée et la chromatographie est effectuée dans la seconde dimension avec un solvant pyridine/acide acétique/n-butanol/eau (100 : 30 : 150 : 120).

Les plaques sont séchées et autoradiographiées sur film Kodirex (Kodak). Une exposition de 24 h à température ambiante est suffisante.

## D/ DETERMINATION DE L'ACIDE AMINE N-TERMINAL PAR DANSYLATION

---

Le résidu N-terminal est déterminé par une modification de la technique de CASOLA et coll. (1974) (140) utilisant le chlorure de dansyl marqué <sup>14</sup>C (DNS - Cl, activité spécifique 104 mCi/mM ; 0,5 mCi/ml, CEA Saclay).

1. Dansylation : 33  $\mu$  g de protéines (correspondant à 300 pM de protéines dénaturées) sont dénaturées par la chaleur à 100° durant 5 mn en présence de SDS 0,5 %. La réaction est réalisée dans des microtubes. Le mélange réactionnel contient :

10  $\mu$  l de protéines dénaturées en milieu SDS (33  $\mu$  g)  
 5  $\mu$  l de bicarbonate d'ammonium 2 M, pH 9,6  
 5  $\mu$  l de  $^{14}$ C-DNS-Cl en solution dans de l'acétone (correspond à un excès de 100 fois).

Les microtubes sont agités à l'aide d'un agitateur électrique (Vortex) et incubés 18 h à 37° C.

2. Hydrolyse acide : les protéines sont ensuite précipitées par 25  $\mu$  l d'acide trichloroacétique froid (TCA 20 %) en présence de 5  $\mu$  l de sérum albumine bovine (10 mg/ml) comme entraîneur. La précipitation se fait en 1 h à 0°. Après centrifugation les précipités sont lavés deux fois avec 50  $\mu$  l d'HCl N et repris avec 25  $\mu$  l d'HCl 5,6 N. Les microtubes sont placés dans des tubes à essai contenant 2 ml d'HCl 5,6 N qui seront scellés et laissés 16 h à 110° C.

3. Extraction du DNS-acide aminé : Les hydrolysats sont séchés sous vide dans un dessiccateur et extraits 4 fois avec de l'éther neutralisé et redistillé. Les extraits étherés sont redissous dans 3  $\mu$  l du mélange Acétone/acide acétique (2 : 1) et déposés sur une plaque de polyamide de 5 x 5 cm (SCHLEICHER et SCHÜLL).

4. Chromatographie : elle est effectuée dans les 2 ou 3 systèmes solvants successifs décrits par HARTLEY en 1970 (141). La première migration a lieu dans de l'acide formique 1,5 % en 10 mn, la deuxième migration, perpendiculaire à la première, dans un solvant benzène/acide acétique (90 : 10) en 15 à 20 mn environ. Une troisième dimension dans le même sens peut être nécessaire pour séparer certains groupes de dansyl-amino acides tels que : DNS-Ser et DNS-Thr, DNS-Asx et DNS-Glx, DNS-His, DNS-Lys et DNS-Arg. Elle utilise un solvant acétate d'éthyle/méthanol/acide acétique (20 : 1 : 1) et dure environ 15 mn.

Les plaques sont séchées et autoradiographiées sur film Kodirex (Kodak).

## VII - MESURE DES SPECTRES DICHROÏQUES

---

### A/ PRINCIPE DU DICHROÏSME CIRCULAIRE

---

Quand les composantes de la lumière circulairement polarisées droite et gauche traversent une substance optiquement active (chromophore), elles ne sont pas absorbées de la même manière. Cette différence d'absorption représente le dichroïsme circulaire. Toute molécule dépourvue de centre ou de plan de symétrie est optiquement active.

### B/ APPAREIL ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

---

Les spectres dichroïques des hexons libres et assemblés en groupe de 9 sont déterminés à l'aide d'un dichrographe Jobin et Yvon R. J. Mack III à 24°C sous un courant d'azote avec des cellules permettant un parcours optique de 0,01 ; 0,5 et 0,1 cm.

Les capsomères hexons et les groupes de 9 hexons sont dissous dans un tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6,8. Les concentrations protéiques sont ajustées de façon à donner une absorption entre 0,5 et 1,0 unité de densité optique.

### C/ EXPRESSION DES RESULTATS

---

Pour chaque longueur d'onde on définit l'ellipticité molaire ( $\theta$ ) qui est exprimée en degrés x cm x d mole<sup>-1</sup>. Cette ellipticité est une fonction de la différence des coefficients d'absorption dichroïques

$$\Delta \epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D .$$

Il a été montré que  $\theta = 3300 \Delta \epsilon$ .

Le dichrographe fournit directement la différence de densité optique  $A_G - A_D$  à la sortie de l'échantillon pour les composantes circulairement polarisées Gauche et Droite. La différence  $A_G - A_D$  est mesurée sur le spectre en mm : elle est retranchée de la ligne de base (due au solvant) :

$$\Delta \epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D = \frac{M}{C \cdot L} \times (A_G - A_D) \times S$$

M = Masse moyenne d'un résidu en gramme .

Pour l'hexon la masse moyenne est obtenue par la composition en acides aminés = 111.

C = Concentration du soluté en g/l ; déterminée par le spectre d'absorption à 280 nm en UV.

L = Epaisseur de la cellule (0,01 - 0,5 - 0,1 cm).

S = Sensibilité de l'appareil en  $\text{mm}^{-1}$  ( $2 \times 10^{-4}$  à  $10^{-6}$ ).

#### D/ INTERPRETATION DU SPECTRE

---

L'origine de l'activité optique d'une molécule provient de transitions électroniques permises par le déplacement linéaire de charges électroniques (moment électrique) ou par la rotation de charges électroniques autour d'un axe (moment magnétique). Dans le cas des protéines l'asymétrie qui engendre l'activité optique peut être due au carbone asymétrique de chaque acide aminé (sauf la glycine), à la structure secondaire et à la structure tertiaire. Cette activité optique est très sensible aux changements de conformation. Ceux-ci sont mesurables sur les spectres dichroïques au niveau des bandes d'absorption des chromophores.

Deux zones sont distinguées sur le spectre :

- la zone intrinsèque (ultra violet lointain de 180 à 250 nm)

-----  
qui correspond à la région d'absorption de la liaison peptidique  $-\text{CO}-\text{NH}-$  .

Elle donne des indications sur la structure secondaire de la protéine. Des études expérimentales et théoriques sur la poly L-lysine permettent d'obtenir les spectres dichroïques de chaque structure caractéristique de la structure secondaire :

- l'hélice  $\alpha$  présente des bandes négatives à 222 nm (transition  $n \rightarrow \pi^*$ , maximum  $(\theta) = -35.000$ ) et à 209 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice) et une bande positive à 190 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée perpendiculairement à l'axe de l'hélice).
- la structure  $\beta$  présente une bande négative à 215 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ) et une bande positive vers 190 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ).
- la structure inordonnée présente une bande négative à 198 nm et une bande positive à 217 nm.

Pour une protéine inconnue le spectre obtenu est une résultante du mélange des 3 structures : il faut pour le résoudre calculer à chaque longueur d'onde caractéristique le pourcentage de chaque structure. Un programme (NLG = nonlin program) est utilisé pour résoudre les maxima du spectre dichroïque en bandes gaussiennes.

- la zone extrinsèque (ultra violet proche de 250 à 300 nm)

-----  
 qui correspond à la région d'absorption des acides aminés aromatiques. Elle donne des renseignements sur la structure tertiaire (repliement de la chaîne par des liaisons hydrophobes).

BIBLIOGRAPHIE

---

Les références figurent par ordre alphabétique de leurs auteurs.

Les Numéros indiquent leur ordre d'apparition dans le texte.

ANDERSON, C.W., BAUM, P.R. et R.F. GESTELAND, 1973. J. Virol. 12, 241-252.	12 - 111
-----	
BALLS, A.K. et E.F. JANSEN, 1952. Adv. Enzymology. 13, 321-342.	113
-----	
BARETT, A.J. 1967. Biochem. J. 104, 601-608.	119
-----	
BERGET, S.M., MOORE, C. et P.A. SHARP, 1977. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3171-3180.	80
-----	
BISERTE, G., SAMAILLE, J., DAUTREVAUX, M., BOULANGER, P.A., SAUTIERE, P., RINGEL, J. et R. WAROCQUIER, 1966. C.R. Acad. Sci. Paris, 263, 1648-1649.	32
-----	
BONNER, W.H. et R.A. LASKEY, 1974. Eur. J. Biochem. 46, 83-88.	131
-----	
BOULANGER, P.A. 1975. J. Virol. 16, 1678-1682.	57 - 96
-----	
BOULANGER, P.A., FLAMENCOURT, P. et G. BISERTE, 1969. Eur. J. Biochem. 10, 116-131.	17 - 34
-----	
BOULANGER, P.A. et M.H. LOUCHEUX, 1972 Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 194-201.	30
-----	



BOULANGER, P.A. et F. PUVION, 1973. Eur. J. Biochem. 39, 37-42.	20 - 84 - 100
BOULANGER, P.A. et F. PUVION, 1974. Eur. J. Biochem. 43, 465-470.	56 - 97 - 120
BRAY, G.A. 1960. Anal. Biochem. 1, 279-285.	128
BURLINGHAM, B., DOERFLER, W., PETERSSON, U. et L. PHILIPSON, 1971. J. Mol. Biol. 60, 45-64.	112
CASOLA, L., DI MATTEO, G., DI PRISCO, G. et F. CERVONE, 1974. Anal. Biochem. 57, 38-45.	140
CHEN, Y.H., YANG J.J. et K.H. CHAU, 1974. Biochemistry 13, 3350-3359.	101
CHOW, L.T., ROBERTS, J.M., LEWIS, J.B. et T.R. BROKER, 1977. Cell 11, 819-836.	69
CORNICK, G., SIGLER, P.B. et H.S. GINSBERG, 1973. J. Mol. Biol. 73, 533-537.	24
CRAWFORD, L.V. et D.P. LANE, 1977. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 323-328.	116 - 138
CROWTHER, R.A. et M.R. FRANKLIN, 1972. J. Mol. Biol. 68, 181-184.	55
DAVIS, B.J. 1964. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.	129
DAY, L.A., FRANKLIN, R.M., PETERSSON, U. et L. PHILIPSON, 1972. Eur. J. Biochem. 29, 537-541.	31



- D'HALLUIN, J.C., BOULANGER, P.A. et G. MARTIN, 1978<sub>a</sub>. 50  
 J. Virol. sous presse
- 
- D'HALLUIN, J.C., MARTIN, G., TORPIER, G. et  
 P.A. BOULANGER, 1978<sub>b</sub>. 79  
 J. Virol. sous presse
- 
- EVERITT, E., LUTTER, L. et L. PHILIPSON, 1975. 68-108  
 Virology 67, 197-205.
- 
- EVERITT, E. et L. PHILIPSON, 1974. 131  
 Virology 62, 253-269.
- 
- EVERITT, E., SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U. et  
 L. PHILIPSON, 1973. 11-67-86-103  
 Virology 52, 130-147.
- 
- FORSGREN, A. et J. SJÖQUIST, 1966. 137  
 J. Immun. 97, 822-827.
- 
- FRANKLIN, R.M., HARRISON, S.C., PETTERSSON, U.,  
 PHILIPSON, L., BRANDEN, C.I. et P.E. WERNER, 1972. 62-110  
 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 503-510.
- 
- FRANKLIN, R.M., PETTERSSON, U., AKERVALL, R.,  
 STRANDBERG, B. et L. PHILIPSON, 1971. 21-25-29  
 J. Mol. Biol. 57, 383-395.
- 
- FREEMAN, A.E., BLACK, P.H., VANDERPOOL, E.A.,  
 HENRY, P.H., AUSTIN, J.B. et R.J. HUEBNER, 1967. 4  
 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1205-1212.
- 
- GINSBERG, H.S. et C.S.H. YOUNG, 1977. 71  
 Comprehensive Virology Vol. 9, 27-88.
- 
- GREEN, M. et M. PINA, 1963. 15  
 Virology 20, 199-207.
- 



GRÜTTER, M. et R.M. FRANKLIN, 1974. J. Mol. Biol. 89, 163-178.	26
-----	
HARTER, M.L., SHANMUGAM, G., WOLD, W.S.M. et M. GREEN, 1976. J. Virol. 19, 232-240.	122
-----	
HARTLEY, B.J., 1970. Biochem. J. 119, 805-815.	141
-----	
HORNE, R.W., BRENNER, S., WATERSON, A.P. et P. WILDLY, 1959. J. Mol. Biol. 1, 275-291.	5 - 59
-----	
HUEBNER, R.J., ROWE, W.P. et W.T. LANE, 1962. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 2051-2058.	3
-----	
HUNTER, W.M. et F.C. GREENWOOD, 1962. Nature 194, 495-498.	124
-----	
ISHIBACHI, M. et J.V. MAIZEL Jr., 1974. Virology 57, 409-424.	117
-----	
JÖRNVALL, H., 1975. J. Theor. Biol. 55, 1-12.	95 -123
-----	
JÖRNVALL, H., OHLSSON, H. et L. PHILIPSON, 1974 <sub>b</sub> . Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 304-310.	39-40-92
-----	
JÖRNVALL, H., PETTERSSON, U. et L. PHILIPSON, 1974 <sub>a</sub> . Eur. J. Biochem. 48, 179-192.	27 - 91
-----	
KAUFFMAN, R.S. et H.S. GINSBERG, 1976. J. Virol. 19, 643-650.	74 - 77
-----	
KHITTOO, G. et J. WEBER, 1977. Virology 81, 126-136.	78
-----	



KRØLL, J. , 1973. Scand. J. Immunol. 2, 57-59.	88 - 136
LAEMMLI, U.K., 1970. Nature 227, 680-685.	130
LAURELL, C.B., 1965. Anal. Biochem. 10, 358-361.	87 - 133
LAVER, W.G., 1970. Virology 41, 488-500.	35 - 37
LIU, T.Y. et Y.H. CHANG , 1971. J. Biol. Chem. 246, 2842-2848.	139
LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et R.J. RANDALL, 1951. J. Mol. Biol. 193, 265-275.	127
MAIN, R.K., WILKINS, M.J. et L.J. COLE , 1959. J. Am. Chem. Soc. 81, 6490-6495.	125
MAIZEL, J.V. Jr., WHITE, D.O. et M.D. SHARFF, 1968. Virology 36, 126-136.	9 - 22
MARTIN, G., WAROQUIER, R. et P.A. BOULANGER, 1975. Intervirology 5, 162-172.	90 - 135
NERMUT, M.V. , 1975. Virology 65, 480-485.	64- 66-109
NORRBY, E. , 1969 . Virology 37, 565-576.	41 - 46
NORRBY, E. , 1966 . Virology 30, 608-617.	42



- PEREIRA, H.G. et J.J. SKEHEL, 1971. 10- 52-105  
 J. Gen. Virol. 12, 13-24.
- 
- PEREIRA, H.G., VALENTINE, R.C. et W.C. RUSSELL, 1968. 28  
 Nature (London) 219, 946-947.
- 
- PEREIRA, H.G. et N.G. WRIGLEY, 1974. 54-58-65-107  
 J. Mol. Biol. 85, 617-631.
- 
- PETTERSSON, U., 1970. 23 - 38  
 Thèse Université d'Uppsala, Suède.
- 
- PETTERSSON, U., 1971. 36-43-44-83  
 Virology 43, 123-136. -85-93-94
- 
- PETTERSSON, U., PHILIPSON, L. et HÖGLUND, S. 1967. 16 - 33  
 Virology 33, 575-590.
- 
- PHILIPSON, L. et U. PETTERSSON, 1973. 7 - 14  
 Prog. Exp. Tumor Virus Res. 18, 1-55.
- 
- PRAGE, N., PETTERSSON, U., HÖGLUND, S.,  
 LONBERG-HOLM, K. et L. PHILIPSON, 1970. 51- 81- 98  
 Virology 42, 341-358.
- 
- ROBINSON, A.J., YOUNGHUSBAND, H.B. et  
 A.J.D. BELLETT, 1973. 8  
 Virology 56, 54-69.
- 
- ROSEN, L., 1960. 13  
 Am. J. Hyg. 71, 120-128.
- 
- ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROT, R.H.  
 et I.G. WARD. 1953. 1  
 Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 84, 570-573.
- 
- RUSSELL, W.C., DOORMASHKN, R., NERMUT, M.V.,  
 PEREIRA, H.G., SKEHEL, J.J. et J.F. WILLIAMS, 1973. 63  
 Advances in Biosciences 11, 149-163.



RUSSELL, W.C., MAC INTOSH, K. et J.J. SKEHEL, 1971. J. Gen. Virol. 11, 35-45.	53-99-104-126
RUSSELL, W.C., NEWMAN, C. et J.F. WILLIAMS, 1972. J. Gen. Virol. 17, 265-270.	72 - 73
SCHAFFER, N.K., MAY, S.C. Jr. et W.H. SUMMERSON, 1953. J. Biol. Chem. 202, 67-76.	114
SCHAFFER, N.K., MAY, S.C. Jr. et W.H. SUMMERSON, 1954. J. Biol. Chem. 206, 201-207.	115
SHORTRIDGE, K.F. et F. BIDDLE, 1970. Arch. Ges. Virusforsch 29, 1-24.	19 - 82
STINSKI, M. et H.S. GINSBERG, 1975. J. Virol. 15, 898-905.	48
STRICKLAND, E.H., 1974. Crit. Rev. Biochem. 2, 113-175.	102
SUNDQVIST, B., EVERITT, E., PHILIPSON, L. et S. HÖGLUND, 1973. J. Virol. 11, 449-459.	49
TRENTIN, J.J., YALE, Y. et G. TAYLOR, 1962. Science 137, 835-841.	2
VALENTINE, R.C. et H.G. PEREIRA, 1965. J. Molec. Biol. 13, 13-20.	6 - 60
VELICER, L.F. et H.S. GINSBERG, 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 1264-1271.	75
VELICER, L.F. et H.S. GINSBERG, 1970. J. Virol. 5, 338-352.	76-118



VOGEL, D. et R. JAENICKE , 1976. Eur. J. Biochem. 61, 423-431.	106
-----	-----
WADELL, G. , 1970. Thèse Karolinska institutet, Stockholm, Suède.	18
-----	-----
WADELL, G. , 1972. J. Immunol. 108, 622-630.	47
-----	-----
WALL, R., PHILIPSON, L. et J.E. DARNELL , 1972. Virology 50, 27-33.	70
-----	-----
WALTER, G. et J.V. MAIZEL Jr., 1974. Virology 57, 402-408.	121
-----	-----
WEEKE, B. , 1973. Scand. J. Immunol. 2, 47-56.	89 - 134
-----	-----
WILCOX, W.C. et H.S. GINSBERG, 1963. J. Exp. Med. 118, 295-306.	61
-----	-----
WILLCOX, N. et V. MAUTNER , 1976. J. Immunol. 116, 25-29.	45
-----	-----

